

## TESIS DOCTORAL

# DESARROLLO, OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD Y DE LA INMUNOGENICIDAD DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS. CORRELACIÓN CON LA RESPUESTA CLÍNICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

*Autor: Sergio Martín González*

*Directoras: Rosaura Navarro / Ainhoa Ruiz del Agua*

*Departamento: Fisiología*

*Centro: Facultad de Medicina y Enfermería*

*Leioa, Abril 2017*





La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en colaboración Universidad - Empresa en el Dpto. de Fisiología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU) y en Progenika Biopharma, a Grifols Company.

Durante el periodo de realización de esta Tesis Doctoral he sido beneficiario de un contrato predoctoral para la formación de personal investigador en un entorno social y productivo en el marco de la convocatoria Zabalduz 2012, concedida por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Asimismo, he sido miembro de un Grupo de Investigación consolidado del Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación, Ref. IT687-13), habiendo recibido financiación para participar en diferentes actividades científicas y formativas relacionadas con la Tesis Doctoral.

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Progenika Biopharma

GRIFOLS



EUSKO JAURLARITZA  
GOBIERNO VASCO

HEZKUNTZA, UNIBERTSITATE  
ETA IKERKETA SAILA

DEPARTAMENTO DE EDUCACIÓN,  
UNIVERSIDADES E INVESTIGACIÓN



BASURTUKO OSPITALEA  
HOSPITAL DE BASURTO



IdiPAZ  
Instituto de Investigación  
Hospital Universitario La Paz



En la realización de esta Tesis Doctoral agradecemos la inestimable ayuda del Dr. Jesús María Careaga Alzaga y de la Dra. Rosa María Izu Belloso del Hospital Universitario de Basurto en Bizkaia y del Dr. Alejandro Balsa y de la Dra. Dora Pascual-Salcedo del Hospital de La Paz en Madrid, por su participación en los estudios clínicos desarrollados, así como a los miembros de sus respectivos equipos que atendieron a los/as pacientes.

Asimismo, nuestro agradecimiento más sincero a todos los/as pacientes que con su participación anónima han hecho posible este trabajo. Desde aquí nuestros mejores deseos para ellos/as.



Cómo agradecer a las personas que han intervenido de alguna u otra forma en este trabajo...cada una de ellas ha aportado lo que estaba en su mano para apoyarme y para guiarme a lo largo de estos 4 cuatro años con el objetivo final de elaborar una Tesis Doctoral de calidad.

Por el camino he experimentado miedo, incertidumbre, derrota, resurgimiento, frustración, arrepentimiento, euforia, seguridad, inseguridad, entusiasmo, motivación, envidia, competitividad, alegría, tristeza, motivación, expectación, asombro...y sobre todo, ilusión por crear y difundir conocimiento a través de este manuscrito.

A mis directoras de tesis, Ainhoa y Rosaura, les debo una gratitud infinita. Sin ellas este trabajo no hubiera llegado a su fin. Me enorgullezco de la labor de complementación entre ambas, por un lado **Ainhoa** me ha transmitido todo su conocimiento en la materia así como las herramientas críticas para consolidarme como investigador, la seguridad que necesitaba para darme cuenta de que iba a ser capaz de realizar un buen trabajo y al mismo tiempo la tranquilidad requerida en los momentos en los que creía que todo era un caos. Por otro lado, **Rosaura** ha reforzado mis ganas de luchar por lo que uno cree que es justo pese a las adversidades inherentes al mundo de la investigación, tan competitivo, donde muchos/as se mueven por intereses propios. Su paciencia y afán por entender nuevos retos son admirables, así como su capacidad de expresión y simplificación junto con su uso meticuloso del lenguaje que me convirtió en un visitante asiduo de [www.rae.es](http://www.rae.es).

**Begoña, Nerea, Amagoia y Dani.** Siempre me han ayudado en los momentos más oportunos con sus críticas constructivas y consejos, que han conseguido devolver la fluidez a mis investigaciones y rescatarme en varias ocasiones de un punto estancado y siempre para mejorar con esa gran frase tan sabia: “darle una vuelta”.

Desde la perspectiva más básica de mi trabajo, en mi llegada a la extinta Proteomika S.L.U., tuve que aprender desde cero a hacer un ELISA, mi mono-técnica, y de quién mejor que de los técnicos expertos, **Javi, Aina y Lore**, todo lo que conozco de los ELISA es gracias a ellos. Sabían bien como crear el mejor ambiente de trabajo, con sus lecciones simplificadas para ser entendidas por inexpertos como yo, sus divertidas anécdotas donde las carcajadas estaban aseguradas y ese microambiente sonoro en bucle proveniente del “cassette” mas rudimentario de la empresa, que no siempre era una animación al 100% pero que **Sheila** decía que para que los experimentos salieran bien lo primero que había que hacer nada más entrar en el labo era encenderlo, y tenía razón, así me he convertido, a parte de en todo un experto en la música contemporánea de los 40 principales, en

otro experto de los ELISA, con mas de 10 placas procesando a la vez, pero aun tengo que escuchar más música para poder llegar a pretapizar 100 placas y conservar los dedos para contarlos.

En mis pocos ratos de ocio, he de destacar la compañía que me han brindado otros compañeros que gracias a sus distracciones he tenido momentos de liberación, como por ejemplo **Ángela** y sus conversaciones un poco locas y ese visionado de fotos que nunca hubiera creído que entrarían tantas en un móvil y/o pc; **Esther** y su predisposición para llevarme a Barakaldo a pesar de sacarle de su ruta de A a B para incorporar un nuevo punto en su trayecto, el B'; **Majo** y el desahogo que hemos tenido juntos por encontrarnos ambos en la misma situación, y ya se sabe que siempre se lleva todo mejor si alguien entiende por lo que estas pasando; y finalmente **Joana** y esas meriendas tan sanas (no siempre) que nos pegábamos para no desfallecer en el trabajo y que me alejaban momentáneamente de mis jornadas de duración XXL. Gracias a ella no morí de inanición.

Al encontrarme entre 2 tierras, PGK y UPV (a veces en tierra de nadie más o menos como en el limbo), he tenido el placer de estar en el departamento de Fisiología donde tenía hasta un hueco en el despacho....super-guay?. Allí he convivido (sí, sí, demasiadas horas) entre compañeras, todas tesisas, de las que he aprendido a relajarme ante el peligro, a renovarse y acumular cursos y a dar cada día un poco más de mí. En especial a **Susana**, por sus ratos de humor humoral y visceral y a **Oihana**, por enseñarme el maravilloso mundo de los *Western Blot* y conseguir mis bandas de antígeno-anticuerpo en lugar de las Caras de Bélmez de los inicios.

A mis aitas, gran apoyo incondicional. No ha habido ni una sola vez en la que haya visto a mi **aita** y no me haya preguntado por la tesis. Al margen de la relación monotemática Sergio=tesis, siempre ha mostrado interés para que en cada sesión reforzara mi confianza en el gran logro, que cada vez estaba mas cerca. Mi **ama**, tal vez lo haya llevado más por dentro, pero no me cabe duda del orgullo implícito y la seguridad aférrima que tenía en mí para lograrme un buen porvenir.

Mi **hermana** es un modelo de superación, esfuerzo y constancia hasta conseguir lo que uno se propone. La confianza que ha depositado en mis aptitudes me ha llevado a reconsiderar todo mi potencial y al mismo tiempo tomar conciencia del curso natural del proyecto. Todo a su debido tiempo. Gracias también a mi **cuñado** por el interés mostrado desde el principio hasta el final.

En el terreno de la amistad, han estado conmigo mis omnipresentes “**powers** y **bollos**” a las que agradezco su compañía física y espiritual, con esas ganas de que terminara y saliera un poco más

de mi claustro personal. Por último, y no por ello menos importante, agradecer a mi **cuadrilla** de **Sopuerta** los momentos de desconexión y que hayan tenido que aguantar mis numerosas ausencias que por otro lado compensadas con mi presencia esporádica en el mejor día de la semana, el jueves de pintxo-pote. Gracias a sus insistencias y recomendaciones por desconectar que hicieron que retomara posteriormente mi trabajo con más ganas.

Era broma, no había terminado. Aun quedan mis amigos/as del alma, tan especiales, que nunca han dejado de estar conmigo y sobre los que las palabras sobran. Mis neskas, **Eva** y **Esti**, que durante todo este viaje científico han velado por mi bienestar y nos hemos compenetrado para estar juntos sin estar. Esa es nuestra esencia. Y a mi mutil, **Dani Mañiko**, mi compañero vital, porque nadie mejor que él ha sentido mi más horroroso sufrimiento y mi más efusivo júbilo durante cada uno de los días de mi temporada mas dura y fluctuante. Gracias por aguantar mi montaña rusa que viajaba a la velocidad de la luz y sin frenos. Maite zaituztet!.

*Para Rosa*



# **ÍNDICE**

---



---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Sistema inmunitario: tolerancia y autoinmunidad	3
1.2. Enfermedades autoinmunes	5
1.2.1. Enfermedades reumáticas	7
1.2.1.1. Artritis reumatoide (AR)	8
1.2.1.2. Espondiloartritis (EspA)	14
1.2.1.2.1. Espondilitis anquilosante (EA)	14
1.2.1.2.2. Artritis psoriásica (APs)	16
1.2.1.2.3. Artritis asociadas a enfermedad inflamatoria intestinal (ArEII)	18
1.2.2. Enfermedades dermatológicas	19
1.2.2.1. Psoriasis (PsO)	19
1.2.3. Tratamientos de las enfermedades autoinmunes	23
1.2.3.1. Tratamiento de la AR y de las EspA	23
1.2.3.2. Tratamiento de la PsO	26
1.3. Terapias biológicas del estudio	30
1.3.1. Golimumab (GLM)	30
1.3.2. Tocilizumab (TCZ)	33
1.3.3. Ustekinumab (UTK)	36
1.4. Inmunogenicidad asociada a las terapias biológicas	39
1.5. Tecnología aplicada a la monitorización de terapias biológicas	41
1.6. Impacto económico de la monitorización de terapias biológicas	47
<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
3.1. Materiales	57
3.1.1. Reactivos y material accesorio	57
3.1.2. Equipamiento	61

3.2. Métodos	62
3.2.1. Poblaciones de estudio	62
3.2.2. Obtención de las muestras de suero	64
3.2.3. Preparación de los fármacos biológicos	64
3.2.4. Obtención de los anticuerpos monoclonales (AcM) antifármaco	65
3.2.5. Dializado de los fármacos biológicos y de los AcM antifármaco	66
3.2.6. Marcaje de los fármacos biológicos y de los AcM antifármaco con HRP	67
3.2.7. Obtención de los anticuerpos policlonales (AcP) antifármaco	68
3.2.8. Purificación de los AcP antifármaco por cromatografía de afinidad	68
3.2.9. Determinación de la concentración de proteínas totales por el método del BCA	70
3.2.10. Análisis de la pureza de proteínas separadas por SDS-PAGE	71
3.2.11. Verificación de la especificidad antígeno-anticuerpo por transferencia Western	73
3.2.12. Desarrollo y optimización de los inmunoensayos ELISA	75
3.2.12.1. Selección de los AcM antifármaco	76
3.2.12.2. Optimización de los inmunoensayos ELISA	77
3.2.13. Validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos ELISA	80
3.2.13.1. Ruido de fondo	81
3.2.13.2. Límite de cuantificación	82
3.2.13.3. Precisión	82
3.2.13.4. Linealidad	85
3.2.13.5. Efectos interferentes	86
3.2.14. Correlación de los inmunoensayos ELISA con otras metodologías	88
3.2.15. Correlación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica	89
3.2.16. Análisis estadístico	94

---

**RESULTADOS** **97**

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>99</b>
4.1. Obtención y selección preliminar de los AcM antifármaco	99
4.2. Selección de los AcM para los inmunoensayos de biodisponibilidad	100
4.2.1. ELISA sándwich (GLM, TCZ y UTK)	100
4.2.2. Elisa de captura vía TNF $\alpha$ (GLM)	104

4.3. Obtención y verificación de la funcionalidad de los AcP antifármaco	105
4.4. Desarrollo y optimización de los inmunoensayos ELISA	106
4.5. Estandarización de las unidades de los inmunoensayos de inmunogenicidad	135
4.6. Validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos ELISA	140
4.6.1. Ruido de fondo	140
4.6.2. Límite de cuantificación	141
4.6.3. Precisión	145
4.6.4. Linealidad	146
4.6.5. Efectos interferentes	148
4.7. Correlación de los inmunoensayos ELISA con otras metodologías	151
4.8. Correlación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica	156
4.8.1. Correlación de los niveles de GLM y de anticuerpos anti-GLM con la respuesta clínica en pacientes con EspA	156
4.8.2. Correlación de los niveles de TCZ y de anticuerpos anti-TCZ con la respuesta clínica en pacientes con AR	165
4.8.3. Correlación de los niveles de UTK y de anticuerpos anti-UTK con la respuesta clínica en pacientes con PsO	174
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>183</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>185</b>
5.1. Diseño, desarrollo y optimización de los inmunoensayos ELISA	185
5.2. Escalado industrial y validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos ELISA	205
5.3. Correlación de los inmunoensayos ELISA con otras metodologías	213
5.4. Correlación de los niveles de fármaco con la respuesta clínica	219
5.5. Correlación de los niveles de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica	228
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>235</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>237</b>

**ANEXOS** **239**

**7. ANEXOS** **241**

7.1. Anexo 1: Modelo de consentimiento informado del HUB 241

7.2. Anexo 2: Tabla  $t$  de Student 249

**BIBLIOGRAFÍA** **251**

**8. BIBLIOGRAFÍA** **253**

# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>AcM</b>	anticuerpo monoclonal
<b>AcP</b>	anticuerpo policlonal
<b>ACPA</b>	anticuerpos antipéptidos citrulinados
<b>ACR</b>	<i>American College of Rheumatology</i>
<b>ADCC</b>	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
<b>ADL</b>	adalimumab
<b>AIJ</b>	artritis idiopática juvenil
<b>AINES</b>	antiinflamatorios no esteroideos
<b>AJC</b>	artritis juvenil crónica
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b>APs</b>	artritis psoriásica
<b>AR</b>	artritis reumatoide
<b>ArEII</b>	artritis asociadas a enfermedad intestinal inflamatoria
<b>ASAS</b>	<i>The Assessment of SpondyloArthritis international Society</i>
<b>ASDAS</b>	índice de actividad de la EA
<b>AZA</b>	azatioprina
<b>BCA</b>	ácido bicinconánico
<b>BGG</b>	gammaglobulina bovina
<b>CAL</b>	calibrador
<b>CASPAR</b>	criterios de clasificación de la APs
<b>CDC</b>	citotoxicidad dependiente del complemento
<b>CE</b>	conformidad europea
<b>CFA</b>	ciclofosfamida
<b>Cs</b>	ciclosporina
<b>CsA</b>	ciclosporina A
<b>CLSI</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMH</b>	complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CN</b>	control negativo
<b>CP</b>	control positivo
<b>CU</b>	colitis ulcerosa
<b>CV</b>	coeficiente de variación
<b>CV<sub>r</sub></b>	coeficiente de variación de repetitibilidad
<b>CV<sub>T</sub></b>	coeficiente de variación total
<b>CZP</b>	certolizumab pegol
<b>DAS28</b>	índice de actividad de la AR
<b>DE</b>	desviación estándar
<b>DE<sub>r</sub></b>	desviación estándar de repetitibilidad
<b>DE<sub>T</sub></b>	desviación estándar total
<b>EA</b>	espondilitis anquilosante
<b>EC</b>	enfermedad de Crohn
<b>ECLIA</b>	inmunoensayo de electroquimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraácetico
<b>EII</b>	enfermedad inflamatoria intestinal
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>EspA</b>	espondiloartritis
<b>EspAi</b>	espondiloartritis indiferenciada
<b>ET</b>	error total

<b>ETN</b>	etanercept
<b>EULAR</b>	<i>European League Against Rheumatism</i>
<b>EVA</b>	escala visual analógica
<b>FAME</b>	fármaco antirreumático modificador de la enfermedad
<b>FDA</b>	<i>Food &amp; Drug Administration</i>
<b>FR</b>	factor reumatoide
<b>GC</b>	glucocorticoide
<b>GLM</b>	golimumab
<b>HLA</b>	antígeno leucocitario humano
<b>HQA-DI</b>	cuestionario de salud para evaluar el índice de discapacidad
<b>HUB</b>	Hospital Universitario Basurto
<b>HULP</b>	Hospital Universitario La Paz
<b>HRP</b>	peroxidasa de rábano picante
<b>HSMA</b>	ensayo de cambio homogéneo de movilidad
<b>ICAM</b>	molécula de adhesión intracelular
<b>IFX</b>	infliximab
<b>IL</b>	interleuquina
<b>IQR</b>	rango intercuartílico
<b>LCE</b>	envoltura cornificada tardía
<b>LEF</b>	leflunomida
<b>LoQ</b>	limite de cuantificación
<b>MMP</b>	metaloproteasas
<b>MTX</b>	metotrexato
<b>NK</b>	asesina natural
<b>PASI</b>	índice de severidad y área de PsO
<b>PCR</b>	proteína C reactiva
<b>PsO</b>	psoriasis
<b>PVDF</b>	difluoruro de polivinilideno
<b>RIA</b>	radioinmunoanálisis
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear
<b>ROC</b>	característica operativa del receptor
<b>RTX</b>	rituximab
<b>SDS-PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>SE-HPLC</b>	cromatografía de alto rendimiento asociada a exclusión por tamaño
<b>SJC</b>	recuento de articulaciones inflamadas
<b>SSZ</b>	sulfasalazina
<b>Tc</b>	linfocitos T citotóxicos
<b>TCZ</b>	tocilizumab
<b>Th</b>	linfocitos T cooperadores
<b>TJC</b>	recuento de articulaciones tumefactas
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>UTK</b>	ustekinumab
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>VDZ</b>	vedolizumab
<b>VSG</b>	velocidad de sedimentación globular

# **INTRODUCCIÓN**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. SISTEMA INMUNITARIO: TOLERANCIA Y AUTOINMUNIDAD

El sistema inmunitario está constituido por células (componente celular) y moléculas (componente humoral) cuya finalidad es defender al organismo de agentes externos (infecciones y/o sustancias tóxicas) e internos (células neoplásicas). El sistema inmunitario presenta 2 mecanismos funcionales defensivos en el reconocimiento del antígeno y generación de una respuesta frente a él (Iwasaki y cols. 2010): la inmunidad natural o innata y la inmunidad adquirida o específica. La inmunidad natural o innata, carente de especificidad y memoria, es la primera línea de defensa contra patógenos. Está constituida por barreras físicas, como la piel y el mucus, barreras químicas y macrófagos, monocitos, linfocitos polimorfonucleares y células NK (asesina natural) que actúan a través de receptores de reconocimiento de patrones (Pollard y cols. 2013) y responden a patógenos de forma genérica sin conferir inmunidad o protección a largo plazo. Además, intervienen moléculas solubles como el sistema del complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas. En la inmunidad adquirida o específica, de mayor complejidad, el componente celular son los linfocitos T y B mientras que el componente humoral son los anticuerpos. Esta respuesta, aunque se genera frente a una gran variedad de patógenos, posee especificidad y memoria, es decir, tras la primera exposición al antígeno se generan células de memoria de forma que en exposiciones sucesivas al mismo antígeno la respuesta será más rápida e intensa (Pollard y cols. 2013), de tal forma que no solo actúan como segunda línea de defensa sino que ofrecen protección contra reexposiciones al mismo patógeno.

La tolerancia se define como la falta o la disminución de respuesta del sistema inmunitario frente a antígenos externos y/o internos, inducida por el contacto previo con el antígeno, por lo que es un proceso específico con memoria inmunológica. En el mantenimiento de la tolerancia inmune intervienen los linfocitos T reguladores (Treg). La tolerancia central se lleva a cabo durante la diferenciación de los linfocitos en los órganos linfoides primarios (medula ósea y timo) y solo cuando falla se inician mecanismos de tolerancia periférica sobre las células ya maduras (Van Parijs y cols. 1998). Los mecanismos por los que se induce tolerancia consisten en (Goodnow y cols. 2005):

- **Delección clonal:** se eliminan los linfocitos autorreactivos que reconocen antígenos propios induciendo apoptosis durante su maduración, mayoritariamente a través de la vía de las caspasas por activación del receptor Fas-Fas ligando.

- **Edición del receptor:** los linfocitos cambian su receptor autorreactivo por recombinación genética o por hipermutación somática para conseguir un receptor no autorreactivo.

- **Anergia clonal:** las células autorreactivas sufren cambios intrínsecos bioquímicos y de expresión génica que provocan una estimulación incompleta del linfocito para que no responda al antígeno.

- **Ignorancia clonal o silencio inmunológico:** las células autorreactivas no se activan porque el antígeno se encuentra a baja concentración y/o es reconocido con baja afinidad, es procesado por células presentadoras con baja concentración de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) o es inaccesible por barreras anatómicas.

La autoinmunidad es la pérdida o ineficacia de los mecanismos naturales de tolerancia de forma que se produce una respuesta inmune frente a antígenos propios. En condiciones normales los mecanismos de tolerancia no son efectivos al 100% sino que incluso en individuos sanos existen pequeñas cantidades de células autorreactivas y autoanticuerpos implicados en funciones homeostáticas de defensa frente a agentes externos, limpieza de células senescentes y eliminación de formaciones indeseadas de inmunocomplejos (Grabar 1983), por lo que la autoinmunidad debe contemplarse como un proceso fisiológico (Dighiero y cols. 1999). Solamente en personas genéticamente susceptibles y ante determinados estímulos ambientales, esta reacción autorreactiva se descontrola, se pierde la capacidad para discriminar lo propio de lo extraño y se perpetúa en el tiempo provocando una respuesta inmune frente a antígenos propios y, por lo tanto, daño tisular que puede originar en última instancia una enfermedad autoinmune caracterizada por un estado de inflamación crónico.

La inflamación es un proceso fisiológico complejo que se origina como respuesta a un ataque por patógenos externos y/o para la remodelación de tejidos dañados, a través de la liberación de células del sistema inmune y de componentes humorales, como mediadores solubles inflamatorios.

El proceso inflamatorio se caracteriza por extravasación de líquido al sitio donde se produce el daño y está asociado a los históricamente conocidos Cuatro Signos Cardinales de Celso que son edema (tumor), aumento del flujo sanguíneo (rubor), aumento de la temperatura local (calor) y activación de terminales aferentes (dolor). Posteriormente Galeno introdujo el 5º Signo, la pérdida de la función local, aunque algunos autores atribuyen dicho descubrimiento a Sydenham y Virchow (Rather 1971).

La inflamación puede clasificarse atendiendo a su duración en aguda o crónica. La inflamación aguda es de corta duración e indispensable para la reparación del tejido dañado a través de la vasodilatación (con un aumento de la permeabilidad vascular para proteínas plasmáticas) y de la migración y activación de leucocitos, generalmente neutrófilos, al sitio de inflamación. Cuando el estímulo que provocó el daño tisular persiste sin resolución satisfactoria de la inflamación se produce la inflamación crónica, caracterizada por la extravasación de linfocitos y macrófagos y formación de fibrosis tisular.

La inflamación puede ser producida también por otros agentes externos físicos (traumas) o químicos (tóxicos) y por agentes propios del organismo. En este caso, las células involucradas en la inflamación son células del tejido conectivo donde se produce la lesión, como fibroblastos, mastocitos, macrófagos y linfocitos polimorfonucleares, y células circulantes, como monocitos, basófilos, eosinófilos y plaquetas.

La inflamación puede ser controlada por mecanismos de retroalimentación negativa que permiten restablecer la homeostasis del organismo, pero si la inflamación no se resuelve adecuadamente puede conllevar a la aparición de enfermedades autoinmunes.

## **1.2. ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

Las enfermedades autoinmunes son un conjunto heterogéneo de enfermedades producidas por la pérdida o ineficacia de los mecanismos de tolerancia y por el desequilibrio de la autoinmunidad fisiológica.

Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar, en función del órgano afectado, en organoespecíficas, cuando se pierde la tolerancia a autoantígenos dirigidos contra órganos específicos sin pérdida de control del sistema inmune en su conjunto, y en sistémicas, cuando existe un fallo global del sistema inmune con autoanticuerpos no dirigidos contra ningún órgano diana específico. Son enfermedades multifactoriales originadas por interacción de factores genéticos, alteraciones del propio sistema inmune y factores ambientales (Davidson y cols. 2001).

Existen diversos factores que pueden influir en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes como ciertos genes de susceptibilidad (Ramos y cols. 2015), aunque el hecho de encontrar una alta variabilidad en la concordancia entre gemelos, sugiere que el componente genético por sí solo no es suficiente para explicar la aparición de estas enfermedades complejas, sino que también hay que considerar el componente ambiental (Bogdanos y cols. 2012). Los agentes ambientales infecciosos pueden iniciar la autorreactividad a través de fenómenos de activación policlonal, liberación de otros antígenos previamente secuestrados y mimetismo molecular donde los anticuerpos generados frente al patógeno interactúan de forma cruzada con otras moléculas endógenas, de manera que los autoantígenos son los que mantienen la activación persistente de los linfocitos una vez erradicada la infección como ocurre en la fiebre reumática (Galvin y cols. 2000) o en el Síndrome de Guillain-Barré (Koga y cols. 1998). Otros factores pueden estar relacionados con el dimorfismo sexual en la respuesta inmune, al observarse que las mujeres normalmente son más propensas a padecer estas enfermedades debido a la capacidad inductora de los estrógenos (Bynoe y cols. 2000), con ciertos fármacos, como la procainimida que induce la aparición de anticuerpos antinucleares promoviendo el desarrollo de síndromes tipo lupus (Rubin y cols. 1992), y con otras sustancias extrañas que pueden actuar como haptenos promoviendo la inmunogenicidad de autoantígenos, como es el caso de la penicilina y la cefalosporina, que introducen neoepítomos en los eritrocitos causando anemia hemolítica.

La progresión de una enfermedad autoinmune a estados crónicos se produce por un aumento del número de autoantígenos dirigidos contra linfocitos T y anticuerpos, lo que se conoce como expansión del epítipo (Sokolove y cols. 2012) y en algunos casos, hay cambios en las células que participan en la respuesta inmune, en los mediadores de la inflamación y en las citoquinas involucradas, ya que presentan diferentes efectos en función de la etapa de la enfermedad.

El daño tisular se produce a través de citólisis mediada por perforinas y granzimas, por la señalización intracelular iniciada por el receptor Fas-Fas ligando (Fujihara y cols. 1999; Kreuwel y cols. 1999) y por los autoanticuerpos a través de la formación de inmunocomplejos, citólisis o fagocitosis de células diana e interferencias con la homeostasis celular (Balasa y cols. 2000).

### **1.2.1. ENFERMEDADES REUMÁTICAS**

Las enfermedades reumáticas incluyen al conjunto de dolencias médicas que afectan al aparato locomotor, básicamente articulaciones, tendones, músculos y ligamentos, enfermedades del tejido conectivo y del metabolismo del hueso. Estas enfermedades tienen un curso clínico prolongado, a menudo subclínico y con largos periodos de latencia, lo que hace que el diseño experimental para establecer relaciones causales y de pronóstico sea complejo.

La progresión de estas enfermedades suele acompañarse de un daño estructural irreversible que, junto al dolor y la discapacidad, limitan la capacidad de movimiento y la interrelación social de los/as pacientes, consolidándose estas enfermedades como la primera causa de morbilidad en la población general con enfermedades crónicas. Algunas de ellas, especialmente las que presentan un fuerte componente inflamatorio, pueden ser mortales (Gabriel y cols. 2009).

La clasificación de las enfermedades reumáticas es compleja. Atendiendo fundamentalmente a factores etiopatogénicos y de acuerdo al órgano diana principalmente afectado se diferencian 4 grandes grupos: la artrosis (cartílago articular), la artritis (membrana sinovial), reumatismos de partes blandas (tendones, bursa y músculos) y enfermedades metabólicas óseas (hueso).

Las enfermedades reumáticas pueden estar causadas por procesos degenerativos de origen mecánico y por fenómenos inflamatorios relacionados con procesos autoinmunes, como es el caso de la artritis reumatoide (AR) y las espondiloartritis (EspA), las cuales serán tratadas en esta Tesis Doctoral por ser las patologías que presentan algunos/as de los/as pacientes de nuestro estudio.

### **1.2.1.1. ARTRITIS REUMATOIDE**

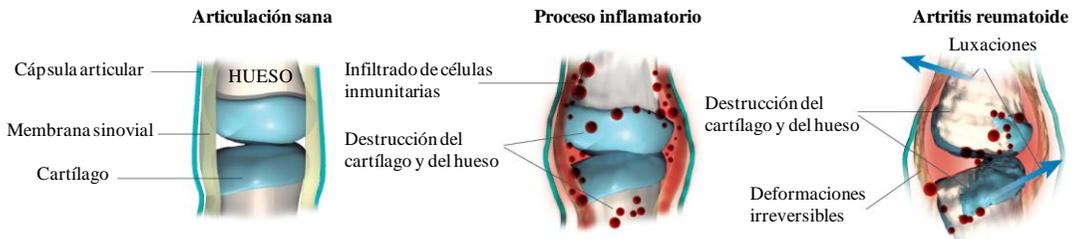
La AR es una enfermedad compleja caracterizada por la inflamación crónica de la membrana sinovial de las articulaciones causando deterioro tisular y una discapacidad funcional importante (Chung y cols. 2016).

Presenta una distribución geográfica universal aunque existe una asociación inexplicable entre el sexo, la etnia y la prevalencia. El rango de prevalencia se sitúa entre 0,2% y 1,0% y la incidencia media anual para la población total observada en Europa cubre un rango de 16,5 a 29 casos por cada 100.000 habitantes. Las mujeres padecen más esta enfermedad que los hombres a razón de 3:1 (Alamanos y cols. 2006).

La mortalidad en los/as pacientes con AR es significativamente superior a la esperada en la población general, estableciéndose como factores predictivos la presencia de manifestaciones extraarticulares y comorbilidades con enfermedades cardiovasculares, renales, hepáticas o cáncer (Gabriel y cols. 2003), factores socioeconómicos y factores relacionados con la enfermedad como la edad de comienzo, la duración y la gravedad, la discapacidad asociada, la presencia del factor reumatoide (FR) y de nódulos reumatoides y el uso prolongado de prednisona. El pronóstico a largo plazo de la AR es incierto aunque aproximadamente el 80% de los/as pacientes presentarán discapacidad importante en el plazo de 20 años desde el comienzo de las manifestaciones de la enfermedad viéndose su esperanza de vida reducida entre 3 y 18 años.

La AR se manifiesta como poliartritis simétricas de pequeñas articulaciones (manos y muñecas) que progresa hasta la afectación de articulaciones mayores (pies y tobillos, codos, rodillas, hombros, caderas y columna vertebral) lo que conlleva una limitación de movimientos y, por tanto, mayor dificultad para realizar actividades cotidianas. En esta inflamación crónica de múltiples articulaciones la membrana sinovial que recubre la cavidad articular es el tejido más específicamente afectado, aunque también se ven comprometidos órganos internos, de ahí que se considere a la AR una enfermedad sistémica. Las manifestaciones clínicas habituales de la AR son dolor inflamatorio articular continuo que incrementa en reposo, aumento del volumen de las articulaciones por extravasación del líquido sinovial o hipertrofia sinovial, rigidez articular por acumulación de

infiltrado inflamatorio, debilidad muscular y atrofia de las articulaciones en fases avanzadas por engrosamiento y luxaciones óseas (**figura 1.1**).



**Figura 1.1. Progresión del daño articular en la AR.** El sistema inmunitario reconoce como extraño el tejido articular destruyendo la membrana sinovial que se inflama desencadenando procesos de erosión del hueso y de tejidos adyacentes. La inflamación sostenida produce cambios estructurales con luxaciones y deformaciones irreversibles.

También existen manifestaciones extraarticulares directamente relacionadas con la afectación sistémica de la AR (Cojocar y cols. 2010), principalmente cutáneas (Sayah y cols. 2005) y oculares (Vignesh y cols. 2015). Asimismo, los/as pacientes con AR pueden padecer afectaciones pulmonares (Suda 2015), cardíacas (Voskuyl 2006) y del sistema nervioso (Hart y cols. 1960).

Aunque se desconocen los factores etiológicos de la AR, se considera la posibilidad de una interacción combinada entre factores ambientales y genéticos (Karlson y cols. 2013).

Los agentes infecciosos se han establecido como potenciales agentes causales de AR debido a su poderosa influencia sobre el sistema inmune. Se han realizado numerosas observaciones que relacionan la AR con agentes infecciosos, como el virus de Epstein-Barr (Roudier y cols. 1989), el parvovirus B19 (Nikkari y cols. 1995), las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal (Wegner y cols. 2010), las micobacterias (Holoshitz y cols. 1989) y las bacterias causantes de infecciones urinarias como *Proteus mirabilis* (Ebringer y Rashid 2014), entre otros. Aunque no existan pruebas epidemiológicas ni microbiológicas suficientes para explicar un efecto de causalidad, no se descarta que la exposición a agentes infecciosos contribuya de alguna manera al desarrollo de la AR e incluso alternativamente, es posible también que la relación con estos agentes infecciosos sea consecuencia y no causa de la AR.

La incidencia de la AR aumenta en familiares y de manera más notable en gemelos monocigóticos, con una concordancia de 12-15% (Aho y cols. 1986), frente a un 4% en dicigóticos (Silman y cols. 1993), lo que sugiere un componente genético que sigue un modelo de herencia poligénico, contribuyendo en un 60% a la predisposición a padecer AR (MacGregor y cols. 2000). Los análisis de marcadores genéticos han identificado múltiples genes de susceptibilidad a AR, sobre todo el gen del antígeno leucocitario humano (HLA) HLA-DRB1, concretamente los alelos DR1 y DR4 (Wordsworth y cols. 1989), para los que se ha encontrado una correlación directa con la gravedad de la enfermedad asociada con la presencia del FR, nódulos reumatoides y erosiones articulares (Ollier y cols. 1995). Ambos alelos codifican moléculas del CMH de clase II que comparten una secuencia de aminoácidos común (glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina, QKRAA) denominada epítipo compartido y situada en el dominio de unión y presentación de antígenos al receptor de linfocitos T, lo que sugiere que la presentación antigénica juega un papel importante en la fisiopatología de la AR con la implicación de células T CD4 de memoria, como demuestra la abundancia de estas células en los infiltrados sinoviales (Kohem y cols. 1996).

La AR se considera una enfermedad autoinmune en la que la mayoría de los/as pacientes presenta linfocitos B autorreactivos productores de autoanticuerpos frente a autoantígenos como el FR, que reconoce la región constante de inmunoglobulinas de isotipo G, y los anticuerpos antipeptidos citrulinados (ACPA) que reconocen proteínas que han sufrido una deiminación o citrulinación de sus residuos de arginina transformándose en citrulina (Song y cols. 2010). En la inflamación articular crónica, los inmunocomplejos formados por autoanticuerpos y autoantígenos se acumularían en las articulaciones activándose factores del complemento y células efectoras.

La hiperplasia característica de los sinoviocitos fibroblásticos y macrófagos provoca una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL) IL-1 e IL-6, con angiogénesis aumentada de vasos especializados (vénulas endoteliales altas) en el reclutamiento e infiltración de células inflamatorias sobre todo células T, B, macrófagos y, en menor medida, mastocitos y células dendríticas. Estas citoquinas inducen la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$  y la síntesis de enzimas proteolíticas que provocan, junto con los osteoclastos activados, destrucción progresiva del hueso y del cartílago adyacente. El carácter inflamatorio del sinovio articular está condicionado por el desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (El-Kady y cols. 2008) como

las interleuquinas IL-4 e IL-10 (van Roon y cols. 1996). La IL-4 es producida por linfocitos T cooperadores (Th, CD4+) de clase 2 (Th<sub>2</sub>) y participa en la diferenciación de linfocitos B. Asimismo, es capaz de inhibir la activación de linfocitos Th de clase 1 (Th<sub>1</sub>) lo que conlleva a una disminución en la producción de IL-1 y TNF $\alpha$  inhibiendo en última instancia la destrucción del cartílago articular (van Roon y cols. 1995).

El diagnóstico precoz de la AR es fundamental ya que el daño articular y la pérdida de la función se producen en una fase temprana del proceso de la enfermedad. El tratamiento precoz mejora los síntomas de la AR y conduce a una menor progresión radiográfica (Nell y cols. 2004). No solo es importante instaurar un tratamiento lo antes posible sino que también ha de ser suficientemente agresivo para reducir la inflamación en una fase temprana e inducir la remisión para evitar el daño estructural, la incapacidad y las comorbilidades a largo plazo. El diagnóstico de la AR debería ser confirmado o excluido en los 2 primeros meses después del inicio de los síntomas.

Los criterios para establecer el diagnóstico de AR están basados en la anamnesis del/la paciente y la exploración física, en parámetros de laboratorio y en la exclusión de otros diagnósticos. Los primeros criterios utilizados para el diagnóstico de la AR fueron los criterios del *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987 (**tabla 1.1**) definidos para distinguir los pacientes con AR establecida de los que presentaban otras formas de artropatía inflamatoria (Arnett y cols. 1988).

**Tabla 1.1. Criterios de la ACR para la clasificación de AR (1987).** El/la paciente será clasificado/a con AR si satisface al menos 4 de los 7 criterios recogidos. Los criterios 1 a 4 deben estar presentes durante al menos 6 semanas y los criterios 2 y 5 deben ser objetivados por un médico. IFP: interfalángicas proximales; MCF: metacarpofalángicas.

<b>Criterio</b>	<b>Definición</b>
1. Rigidez matutina	Dolor e inmovilidad en las articulaciones tras despertarse y durante al menos 1 h
2. Artritis de 3 o más áreas articulares	Al menos 3 áreas articulares presentan tumefacción de partes blandas o derrame
3. Artritis manos	Tumefacción de al menos una articulación: muñeca, IFP o MCF
4. Artritis simétrica	Afectación de las mismas áreas articulares en los 2 lados del cuerpo
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas, regiones extensoras o yuxtaarticulares
6. FR sérico	Demostración de aumento anormal del FR sérico
7. Cambios radiológicos	Erosiones o descalcificación ósea en las articulaciones de manos y muñecas

Los criterios de la ACR de 1987, aunque constituyen un método preciso con una alta sensibilidad y especificidad en la clasificación de la AR, no son adecuados para el diagnóstico de la AR precoz, por lo que en 2010 la ACR y la *European League Against Rheumatism* (EULAR) consensuaron nuevos criterios (**tabla 1.2**) (Aletaha y cols. 2010).

**Tabla 1.2. Criterios de la ACR/EULAR para la clasificación de la AR (2010).** Los criterios de clasificación para la AR se obtienen a través de un algoritmo basado en la puntuación obtenida en los apartados A-D, necesitándose una puntuación  $\geq 6/10$  para la clasificación de la AR establecida. ACPA: anticuerpos antipéptidos citrulinados; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular.

Población diana	Puntuación
1) Sinovitis (inflamación) establecida en al menos 1 articulación	
2) Sinovitis no explicada por otra enfermedad	
<b>A) Afectación articular<sup>a</sup></b>	
1 articulación grande	0
2-10 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de articulaciones grandes)	3
> 10 articulaciones (al menos 1 pequeña) <sup>b</sup>	5
<b>B) Serología</b> (se necesita al menos una puntuación positiva para la clasificación) <sup>c</sup>	
ACPA y FR negativos	0
ACPA o FR positivo (títulos bajos)	2
ACPA o FR positivo (títulos altos)	3
<b>C) Reactantes de fase aguda</b>	
PCR y VSG normales	0
PCR o VSG elevada	1
<b>D) Duración de los síntomas</b>	
< 6 semanas	0
$\geq 6$ semanas	1

<sup>a</sup>La afectación articular se refiere a cualquier articulación dolorosa o inflamada en la exploración que pueda ser confirmada por pruebas de imagen. Las articulaciones interfalángicas distales, primeras carpometacarpianas y primeras metatarsofalángicas quedan excluidas de la valoración. Las articulaciones grandes se refieren a hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos y las pequeñas a metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, 2<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> metatarsofalángicas, interfalángicas del pulgar y muñecas.

<sup>b</sup>Puede incluir combinaciones de articulaciones grandes y pequeñas así como otras articulaciones en distintas localizaciones (temporomandibular, acromioclavicular, esternoclavicular, etc).

<sup>c</sup>Se considera un resultado negativo a los valores menores o iguales al límite superior de la normalidad, títulos bajos a los valores  $\leq 3$  veces mayores que el límite superior de la normalidad y títulos altos a los valores  $>3$  veces el límite superior de la normalidad. En caso de que solo se conozca si el FR es positivo o negativo (sin título), un resultado positivo se puntuará como positivo-bajo.

La elaboración de estos nuevos criterios no fue con fines diagnósticos sino para identificar entre los/as pacientes con sinovitis indiferenciada precoz aquellos/as con mayor riesgo de presentar enfermedad persistente y/o erosiva y, por consiguiente, detectar a los/as pacientes con mayor predisposición a un beneficio terapéutico con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) de inicio temprano. La presencia de erosiones óseas indica que el daño estructural ya ha aparecido por lo que directamente se clasifica la enfermedad como AR. Los nuevos criterios dan más peso a las variables serológicas y omiten la afectación simétrica, la duración de la rigidez matutina y la presencia de nódulos reumatoides por no presentar suficiente valor predictivo en las fases iniciales. Con los nuevos criterios se incrementa la sensibilidad pero se pierde especificidad diagnóstica (van der Helm-van Mil y cols. 2012).

Los biomarcadores biológicos son una fuente de información del estado de la enfermedad. La presencia de autoanticuerpos pueden preceder a la sintomatología de la AR durante varios años como en el caso de los ACPA, el FR (Aho y cols. 1991), los anticuerpos antifilagrina y el factor perinuclear (Vincent y cols. 1999). El FR es un autoanticuerpo de tipo IgM dirigido contra la fracción Fc de las IgG, considerado como un importante predictor del desenlace de la enfermedad aunque no es específico de la AR. La seropositividad del FR precoz en el curso de la AR se asocia con persistencia de la enfermedad en un 85% de los casos. Los ACPA son los mejores marcadores predictivos del curso clínico en la AR con una mayor especificidad que el FR (Mimori 2005). No solo su presencia sino también el valor de su título se relacionan con la gravedad y la progresión radiográfica. Los reactantes de fase aguda, como la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG) se utilizan como marcadores asociados a inflamación en AR. Aunque la especificidad de la VSG es cuestionable, el aumento sostenido de los niveles de PCR sí se correlaciona con la actividad de la enfermedad, la progresión radiológica y la respuesta a la terapia.

Las pruebas de imagen son importantes para detectar erosiones cuya presencia es específicamente discriminatoria de la artritis persistente y a la vez es un factor predictivo de la progresión de la enfermedad. La ecografía y la resonancia magnética han demostrado mayor sensibilidad que la exploración física y la radiografía convencional para detectar sinovitis. Además, para evaluar el daño estructural se utilizan los índices y las escalas de Larsen y de Sharp/Van der Heijde (Sharp y cols. 1971; Landewé y van der Heijde 2005).

### **1.2.1.2. ESPONDILOARTRITIS**

Las EspA son un conjunto de enfermedades semejantes, interrelacionadas y con bases genéticas comunes pero con diferentes manifestaciones clínicas. Las EspA tratadas en esta Tesis Doctoral se clasifican en espondilitis anquilosante (EA), artritis psoriásica (APs), artritis asociadas a la enfermedad intestinal inflamatoria (ArEII) y espondiloartritis indiferenciada (EspAi).

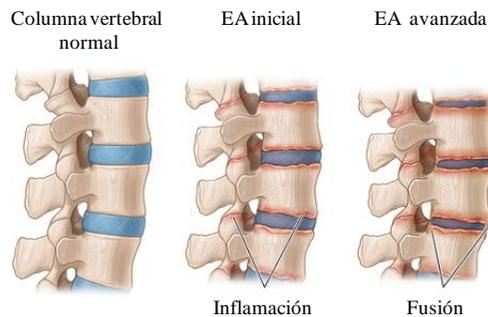
#### **1.2.1.2.1. Espondilitis anquilosante**

La EA es una enfermedad reumática inflamatoria crónica en la que hay afectación del esqueleto axial (columna vertebral y articulaciones sacroilíacas), de las entesis y de grandes articulaciones periféricas. Es más frecuente en varones que en mujeres (2,5:1) con un comienzo alrededor de los 30 años y una prevalencia del 1% (Ghasemi-Rad y *cols.* 2015).

La EA es una enfermedad poligénica y se ha demostrado que el mayor factor de susceptibilidad son ciertos polimorfismos del HLA-B27 (Rysnik y *cols.* 2016) para el que es positivo cerca del 90% de los/as pacientes con EA. Otros genes del CMH como HLA-B60 (Wei y *cols.* 2015) y HLA-DRB1\*0101 contribuyen al incremento del riesgo para el desarrollo de la enfermedad. Al margen del CMH, existen otros genes implicados no solo en la predisposición sino también en la edad de comienzo y en la gravedad. Entre estos genes se encuentran el gen de la aminopeptidasa 1 del retículo endoplasmático (Cortes y *cols.* 2015), que contribuye en un 26% al riesgo de padecer la enfermedad debido a algunos polimorfismos relacionados con la preparación del péptido a presentar por CMH, y el gen del receptor de IL-23 (Xu y *cols.* 2015), lo que explicaría las fuertes relaciones de EA con las enfermedades intestinales inflamatorias crónicas y con la psoriasis sobre todo, con un claro efecto sobre las entesis donde existen células específicas de IL-23 (Wright y *cols.* 2016).

La patogenia de la EA está mediada por linfocitos T en particular por los citotóxicos (Tc, CD8+) ya que reconocen péptidos presentados por HLA-B27. Las citoquinas están involucradas tanto en la actividad inflamatoria (TNF $\alpha$ , IL-6) como en la progresión del daño estructural (IL-17, IL-23) y se postula que determinadas infecciones, sobre todo las producidas por bacterias gramnegativas, pueden presentar un papel desencadenante de la EA, aunque no se han demostrado relaciones directas

entre infección y enfermedad. La afectación más importante de la EA es la inflamación de la médula ósea subcondral de las articulaciones sacroilíacas, de la unidad discovertebral y de las entesis. La inflamación de estas estructuras conlleva a la erosión del cartílago y del hueso con la aparición de puentes óseos (sindesmofitos) entre vertebrales adyacentes de la columna vertebral y osificación y anquilosis fibrosa de las articulaciones sacroilíacas (**figura 1.2**).



**Figura 1.2. Progresión del daño estructural de la columna vertebral en la EA.** En la EA de inicio existe inflamación de las articulaciones y uniones intervertebrales que progresan a osificación y fibrosis modificando la curvatura normal de la columna vertebral.

El diagnóstico de EA se basa en la aplicación de los criterios de Nueva York modificados, útiles para identificar pacientes con EA pero no para la detección precoz de la enfermedad (Goie The y cols. 1985) (**tabla 1.3**).

**Tabla 1.3. Criterios de Nueva York modificados para el diagnóstico de la EA.** Se considera una EA definida si el criterio radiológico se asocia como mínimo a uno de los criterios clínicos. Se considera una EA probable cuando existen los 3 criterios clínicos sin el criterio radiológico o el criterio radiológico sin ningún criterio clínico.

---

**Criterios clínicos**

---

- 1) Dolor y rigidez lumbar de más de 3 meses de duración, que mejora con el ejercicio y que no se alivia con el reposo
  - 2) Limitación del movimiento de la columna lumbar en los planos sagital y frontal
  - 3) Limitación de la expansión torácica con respecto a los valores normales corregidos para edad y sexo (< 2,5 cm)
- 

**Criterio radiológico**

---

- 1) Sacroileítis bilateral de al menos grado 2 o unilateral de grado 3-4
-

Las pruebas complementarias para el diagnóstico de la EA se basan en pruebas de laboratorio y pruebas radiológicas de las articulaciones sacroilíacas, raquis y cadera. El antígeno HLA-B27 se ha identificado como el único marcador analítico sanguíneo, siendo de especial interés en el seguimiento de la enfermedad la PCR y VSG, ya que correlacionan con la actividad inflamatoria. El FR es negativo en los/as pacientes con EA.

#### **1.2.1.2.2. Artritis psoriásica**

La APs es una artritis seronegativa para el FR asociada a psoriasis cutánea y/o ungueal. Presenta un amplio espectro fenotípico con 5 subtipos principales: oligoartritis, poliartritis, afectación de las articulaciones interfalángicas distales, espondilitis y formas mutilantes (Veale y cols. 1994).

El rango de incidencia anual de APs en función de la población local varía desde 0,1 (Japón) a 23,1 (Finlandia) casos por cada 100.000 habitantes, con un rango de prevalencia desde 0,001% (Japón) a 0,42% (Italia) (Liu y cols. 2014). Los varones sufren esta enfermedad con una frecuencia similar a las mujeres, aunque sí hay diferencias en el subtipo de enfermedad ya que las formas axiales son más frecuentes en los hombres y las poliarticulares en las mujeres.

La APs es una enfermedad compleja que surge como interacción entre componentes genéticos hereditarios, inmunológicos y ambientales. Estudios de ligamiento genético han revelado distintos grupos de genes de enfermedad designados como determinantes genéticos de la psoriasis (PSORS1 hasta PSORS13) con la mayor carga genética (30-50%) para PSORS1. El análisis de la distribución de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a lo largo del genoma, posibilitó la construcción de un modelo patogénico integrado que afecta a la función barrera de la piel (*LCE3*, *DEFB4*, *GJB2*), a la respuesta inmune innata a través de la señalización del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (*TNFAIP3*, *TNIP1*, *NFKBIA*, *REL*, *FBXL19*, *TYK2*, *NOS2*, *CARD14*) y a la respuesta inmune adaptativa implicando a linfocitos CD8+ y a la ruta de señalización de la IL-23/IL-17 (*HLA-C*, *IL12B*, *IL23R*, *IL23A*, *TRAF3IP2*, *ERAP1*) (Rahman y Elder 2012). A pesar de todos los genes anteriores, la mayor carga genética asociada a la psoriasis y al riesgo artritogénico reside en CMH de clase I encargado de presentar péptidos a los linfocitos Tc, concretamente en los alelos HLA-C\*06, HLA-B27 y HLA-B39.

En la inmunopatología de la APs intervienen los linfocitos Tc y las subpoblaciones de linfocitos Th<sub>1</sub> y Th<sub>17</sub>. El TNF $\alpha$  producido de forma crónica por macrófagos activados por linfocitos Th<sub>1</sub> autorreactivos juega un papel importante en la perpetuación de la enfermedad, observándose asociación entre la susceptibilidad a APs y el gen codificante de TNF $\alpha$  y otros relacionados con la respuesta a esta citoquina. Asimismo, los linfocitos Th<sub>17</sub> y las IL liberadas (IL-17, IL-21, IL-22) pueden contribuir a la inflamación y a la destrucción tisular. Entre los inductores ambientales de APs más importantes se encuentran los traumas, el tabaquismo y la obesidad, con una relación dosis-respuesta.

La membrana sinovial de los pacientes con APs presenta hipertrofia celular, neoangiogénesis y linfocitogénesis con infiltración de sinoviocitos de tipo fibroblastos y macrófagos, productores de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-23 y metaloproteasas de la matriz (MMP), y de mastocitos y neutrófilos, productores de IL-17.

**Tabla 1.4. Criterios de clasificación CASPAR de la APs.** Para el cumplimiento de los criterios CASPAR un/a paciente debe tener inflamación (articulaciones, columna o entesis) con al menos 3 puntos de los 5 siguientes.

- 
- 1) Evidencia, historia personal o familiar de psoriasis. La evidencia actual de psoriasis se define como la presencia de lesiones psoriásicas en piel o cuero cabelludo evaluadas por un reumatólogo o dermatólogo. Una historia personal de psoriasis se define como una historia de psoriasis que puede obtenerse de un/a paciente, médico de familia, reumatólogo, dermatólogo o cualquier otro profesional de la salud. Una historia familiar de psoriasis se define como una historia de psoriasis en una relación de primer o segundo grado de acuerdo con el informe del/la paciente

---

  - 2) Distrofia psoriásica común en las uñas incluyendo onicólisis, perforaciones e hiperqueratosis

---

  - 3) Resultado negativo para el FR determinado por cualquier método excepto por aglutinación en partículas de latex siendo más recomendable por ELISA o por nefelometría

---

  - 4) Dactilitis manifiesta definida como inflamación de la totalidad de un dedo o una historia de dactilitis evaluada por un reumatólogo

---

  - 5) Evidencia, por radiografías simples de la mano o del pie, de la formación de nuevo hueso yuxtaarticular manifestándose como osificación patológica próxima a los márgenes de unión (excluyendo la formación de osteofitos)
- 

El cuadro clínico de APs suele ser claro en la mayoría de los/as pacientes, aunque en algunos casos hay que establecer un diagnóstico diferencial con otras poliartritis y en los casos

monoarticulares ha de descartarse infecciones microcristalinas o tumorales. El diagnóstico es sencillo en los casos de psoriasis con clara manifestación artrítica, sin embargo en el 15% de los/as pacientes de APs existen síntomas radiológicos sugestivos de APs pero sin psoriasis. A veces los criterios de clasificación de Moll y Wright no son adecuados en las situaciones en que el/la paciente solo presenta entesitis o tiene títulos bajos de FR como en la APs precoz, por lo que se elaboraron los criterios de Clasificación de la Artritis Psoriásica (CASPAR, *Classification Criteria of Psoriatic Arthritis*) (Taylor y cols. 2006) (**tabla 1.4**) para poder etiquetar correctamente un caso de APs de forma precoz y con una sensibilidad (87,4%) y especificidad (99,1%) elevadas (Coates y cols. 2012).

### **1.2.1.2.3. Artritis asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal**

Las ArEII son un conjunto heterogéneo de reumatismos con una reacción inmunológica inflamatoria y afectación de la mucosa intestinal por pérdida de la tolerancia antigénica.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). La EII es más común en el norte de Europa y Norteamérica con una incidencia de 1,2-13,2 casos por cada 100.000 habitantes al año y una prevalencia de 30-128 casos por cada 100.000 habitantes entre los 20-50 años.

Aunque la etiopatogenia es desconocida, existe una susceptibilidad de base genética con una asociación de HLA-B27 en la afectación axial y de HLA-DRB1\*0103, HLA-B35, HLA-B24 y HLA-B44 en la afectación periférica. En cuanto a la inmunopatogenia de la EII se sabe que el aumento de la permeabilidad intestinal permite el paso de antígenos, sobre todo de origen bacteriano, desencadenando una respuesta inflamatoria excesiva por la presencia de linfocitos T con la misma memoria antigénica en intestino y articulaciones y aumentando selectivamente los macrófagos CD163. En esta respuesta inflamatoria multilocalizada interviene el eje IL-23/IL-17.

La afectación articular es la manifestación extraintestinal más frecuente en la EII con una prevalencia de artritis periférica del 9-53%, de afectación axial del 1-26% y de sacroileítis radiológica asintomática del 14-61%.

El diagnóstico se basa en la presencia de manifestaciones articulares axiales o periféricas en pacientes con EII aplicando los criterios de clasificación de *The Assessment of SpondyloArthritis international Society* (ASAS) para EspA. Las pruebas de laboratorio no son útiles para detectar componente articular ya que estaría enmascarado por el predominio intestinal. La evaluación radiológica tampoco es adecuada ya que cursa con artritis no erosivas, no obstante, en las formas axiales sí que es posible detectar sacroileítis asintomáticas. Otras técnicas de imagen como la ecografía y RMN sí son válidas para detectar inflamación aguda.

Un grupo de EspA sobre el que aún no se dispone de mucha información sería el de las EspA indiferenciadas (EspAi), que son aquellas que cumplen con criterios de EspA periférica no asociada a APs ni a EII.

## **1.2.2. ENFERMEDADES DERMATOLÓGICAS**

### **1.2.2.1. Psoriasis**

La PsO es una enfermedad inflamatoria de carácter autoinmune que afecta a la piel, con una importante alteración del bienestar psicosocial.

La prevalencia e incidencia de la PsO es dependiente de la edad (con mayor frecuencia de aparición entre los 30 y 40 años y entre los 50 y 70 años), de la región geográfica (siendo frecuente en regiones más distantes del ecuador de la Tierra como Europa y Australia), de la etnia (mayor en caucásicos que en individuos de raza negra o asiáticos) y de la metodología de los estudios epidemiológicos (Parisi y cols. 2013). Se podría estimar una prevalencia en adultos entre el 0,91% (EEUU) y el 8,5% (Noruega) con una incidencia anual de 78,9 (EEUU) a 230 (Italia) casos por cada 100.000 habitantes, con la misma frecuencia de aparición en hombres y mujeres, aunque en estas las manifestaciones clínicas suelen aparecer de forma más precoz (Parisi y cols. 2013).

El hecho de encontrar diferencias en la prevalencia e incidencia de la PsO en función de la raza y región geográfica, sugiere que en el desarrollo de la enfermedad intervienen factores genéticos (genes de susceptibilidad) y ambientales (climatología y exposición a agentes externos).

Se ha investigado la base genética de la PsO a través de estudios de agregación familiar y en gemelos, y se ha encontrado que el 50% de los individuos con ambos padres afectados de PsO desarrollan la enfermedad, disminuyendo la prevalencia al 16% cuando solo uno de los padres presenta la enfermedad frente al 8% cuando ninguno de los padres está afectado (Watson y cols. 1972). En el caso de gemelos, la concordancia para los monocigóticos es mayor (70%) que para los dicigóticos (20%) (Brandrup y cols. 1982). También se han encontrado genes de susceptibilidad a PsO a través de estudios de asociación de genoma completo con resultados variables en la reproducibilidad, como ocurre en otras enfermedades complejas, debido a la necesidad de muestras poblacionales grandes, heterogeneidad genética, genes con efecto pequeño, penetrancia incompleta, presencia de fenocopias y fenómenos de epistasia y pleiotropía (Altmuller y cols. 2001). El locus PSORS1 en la región del CMH del cromosoma 6 presenta 3 genes asociados con el 50% de los casos de PsO. Estos genes son HLA-Cw6 (Mallon y cols. 1997), HCR\*WWCC (Asumalahti y cols. 2002) y el gen S asociado a HLA (Allen y cols. 1999). Este último codifica la corneodesmosina, una proteína que interviene en la descamación de la epidermis y cuya expresión en los estratos granuloso y córneo está aumentada en las lesiones psoriásicas, en comparación con individuos sanos o lesiones no psoriásicas de pacientes con PsO (Allen y cols. 2001). También se ha identificado una delección en los genes LEC3B y LEC3C pertenecientes a la familia de genes de la envoltura cornificada tardía (LCE) asociada a PsO con fenómenos de epistasia con HLA-Cw6 (de Cid y cols. 2009) y más recientemente otra delección en LCE3D y LCE3E (Zuo y cols. 2015). Particularmente es interesante destacar la presencia de los genes de susceptibilidad en el locus PSORS2 del factor de transcripción 1 relacionado con Runt, involucrado en el desarrollo de células del sistema inmune y en la biología de la membrana epidérmica (Helms y cols. 2003) y de la proteína 14 con dominios de reclutamiento y activación de caspasas (CARD14) que interviene en la respuesta inflamatoria a través de la regulación de los genes sensibles a NF- $\kappa$ B (Jordan y cols. 2012).

Otros factores que intervienen también en el comienzo y la progresión de la PsO son los procesos de estrés físico y psicológico y los factores medioambientales.

El estrés físico en forma de traumas directos en la piel, lo que se conoce como el fenómeno isomórfico de Koebner, provocaría una hiperproliferación de queratinocitos que expresan el factor de crecimiento nervioso (Raychaudhuri y cols. 2008), el cual es un mitógeno de queratinocitos e induce la angiogénesis y la activación de linfocitos T (Pincelli y cols. 1994), y una liberación de citoquinas

proinflamatorias y enmascaramiento de autoantígenos (Eyre y Krueger. 1982). El estrés psicosocial jugaría un papel importante en la exacerbación de la PsO al inducir una redistribución de leucocitos y una migración de células inflamatorias a la piel (Hunter y cols. 2013).

Los factores medioambientales más importantes son el clima, al observarse que los/as pacientes con PsO mejoraban en verano por el efecto beneficioso de la radiación ultravioleta (UV) y empeoraban en invierno (Osmancevic y cols. 2009), las infecciones por estreptococos (Gudjonsson y cols. 2003) y VIH (De Socio y cols. 2006; Namazi 2004), los hábitos de la salud, como fumar (Naldi y Mercury. 2009), beber alcohol (Dediol y cols. 2009) y la obesidad (Johnston y cols. 2008), y determinados fármacos como beta bloqueantes adrenérgicos, litio y cloroquina (Tsankov y cols. 2000).

Existen distintos tipos de PsO siendo la más frecuente la PsO en placa (85%), seguida de la PsO en gota (10,5%) y de la PsO pustular y eritrodérmica (2,5%) (Biondi Oriente y cols. 1989).



**Figura 1.3. Manifestaciones clínicas de la PsO.** A) PsO en placa, B) PsO inversa, C) PsO en gota, D) PsO pustular, E) PsO eritrodérmica, F) PsO ungueal, G) APs.

La PsO en placa se caracteriza por la presencia de placas escamosas y eritematosas perfectamente delimitadas que aparecen en los codos, rodillas, zona lumbar, cuero cabelludo y, en algunos/as pacientes, en las palmas de pies y manos e incluso en los genitales (**figura 1.3.A**). La PsO

inversa o invertida es similar a la anterior pero las lesiones son más leves y aparecen en zonas de flexión como axilas, fosas antecubital y poplítea, y pliegues inguinales (**figura 1.3.B**). La PsO en gota podría ser la manifestación inicial de la PsO que generalmente se desarrolla tras una infección estreptocócica (Owen y cols. 2000) y está caracterizada por la aparición repentina de abundantes pápulas eritematosas en tronco y extremidades (**figura 1.3.C**). La PsO pustular es una forma rara y bastante grave de PsO por su naturaleza recidivante con zonas eritematosas generalizadas o localizadas en manos y pies sobre las que aparecen lesiones por acumulación de pus (pústulas) (**figura 1.3.D**). La PsO pustular da lugar a la PsO eritrodérmica en la que las lesiones pueden llegar a ocupar el 100% de la superficie corporal (**figura 1.3.E**). Es frecuente la pérdida de las funciones de barrera de la piel, el control de la temperatura y la pérdida de fluidos y nutrientes a través de la piel, lo que convierte al/la paciente en un blanco fácil ante las infecciones, que de no ser tratadas pueden acabar en la muerte por sepsis (Green y cols. 1996). Las uñas suelen estar afectadas en todas las formas de PsO con signos que van desde la presencia de surcos y pérdida del color hasta onicodistrofias severas (**figura 1.3.F**). La manifestación extracutánea más frecuente (5-20%) es el desarrollo de APs (**figura 1.3.G**) (Zachariae 2003).

La primera evidencia de la base inmunológica que presenta la PsO tuvo lugar cuando individuos sin PsO recibieron trasplantes singénicos de médula ósea de donantes con PsO y desarrollaron PsO (Snowden y Heaton 1997) o cuando pacientes con PsO que recibieron trasplantes alogénicos de individuos sanos fueron capaces de resolver su enfermedad (Eedy y cols. 1990). Posteriormente se fueron sumando más evidencias al encontrarse asociación entre la PsO y ciertos alelos del CMH (HLA-B13, HLA-Bw57 y HLA-Cw6) (Feng y cols. 2009), sugiriendo la participación de linfocitos T. La respuesta inmune mediada por los linfocitos T se iniciaría por el reconocimiento, por parte de las células presentadoras de antígenos de la piel (células de Langerhans), de antígenos desconocidos, que podrían ser superantígenos bacterianos (Boehncke 1996) o autoantígenos como la queratina 17, la cual presenta una secuencia similar al péptido estreptocócico M (Gudmundsdottir y cols. 1999). Estas células migrarían a los nódulos linfáticos, donde activarían linfocitos T vírgenes, células dendríticas y macrófagos, produciendo IL-23 inductora de la diferenciación de linfocitos T a la subpoblación Th<sub>17</sub> productora de IL-17 e IL-22. Estos linfocitos (Th y Tc) expresan receptores de quimiocinas como el receptor del antígeno linfocitario cutáneo y el receptor de quimiocinas tipo 4 y se dirigen, junto con monocitos circulantes, al foco de inflamación. Allí las células endoteliales y queratinocitos activados expresan moléculas de adhesión

que facilitan su extravasación y la liberación de citoquinas proinflamatorias de tipo I (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2, IL-17, IL-22 e IL-36), implicadas en un mecanismo de retroalimentación positiva con los linfocitos Th<sub>17</sub> (Carrier y cols. 2011). Estas moléculas de adhesión pertenecen a las familias de las selectinas (E-selectina y P-selectina), de las cadherinas (E-cadherina) y a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1, que interactúan con el antígeno 1 asociado a la función linfocitaria ( $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 integrinas) de los linfocitos T. No solo los linfocitos T son reclutados en las lesiones psoriásicas sino también neutrófilos por la acción de la IL-8. La desregulación en la síntesis de citoquinas proinflamatorias provoca la proliferación de queratinocitos inmaduros y cambios vasculares, como un aumento de la permeabilidad vascular y angiogénesis debido a la sobreexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y de su receptor. Existen también neuropéptidos involucrados en la patogénesis de la PsO como la sustancia P (Kanda y cols. 2002).

En la actualidad no existen criterios diagnósticos o recomendaciones de clasificación de la PsO, por lo que el diagnóstico se basa exclusivamente en la presencia de las manifestaciones clínicas características en forma de descamaciones eritematosas bien definidas en cualquier parte del cuerpo, siendo las primeras en aparecer en cuero cabelludo y glúteos. En la PsO precoz, cuando las lesiones en placa aún no han aparecido, es característico de la enfermedad la presencia de alteraciones en las uñas como pequeños agujeros e hiperqueratosis ungueal (Lebwohl 2003).

## **1.2.3. TRATAMIENTOS DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES**

### **1.2.3.1. Tratamiento de la AR y de las EspA**

El tratamiento global de las enfermedades reumáticas es complejo, siendo cada vez mayor la necesidad de establecer una estrategia para conseguir objetivos terapéuticos en muchos casos multidisciplinar, en función de las características de la enfermedad y del grado de evolución y dependiente de las posibilidades farmacológicas. Esta estrategia se basa en el modelo conceptual del “tratamiento hasta objetivo” (Smolen y cols. 2016) basado en el establecimiento de un objetivo terapéutico adaptándolo de forma protocolizada, periódica y sistemática, hasta lograr una remisión o baja actividad sostenida de la enfermedad. El inicio del tratamiento precoz es importante para

alcanzar la remisión de la enfermedad en términos de ausencia de sintomatología clínica, progresión del daño estructural o discapacidad (Raza y cols. 2006). Durante este periodo de difícil caracterización por la heterogénea definición de la duración de los síntomas, la sinovitis es leve y los procesos patológicos no están desarrollados totalmente.

El objetivo del tratamiento de la AR es reducir la inflamación sinovial, lo que conlleva una reducción del dolor y del daño estructural y una mejoría de la capacidad funcional. Tradicionalmente, la estrategia terapéutica consistía en un tratamiento inicial con analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para aliviar únicamente los síntomas a través de la inhibición de la ciclooxigenasa, enzima encargada de la síntesis de eicosanoides proinflamatorios. Si con los AINES no se conseguía controlar la sintomatología se recurría al tratamiento con glucocorticoides (GC). Los GC son hormonas esteroideas con acción antiinflamatoria e inmunosupresora que pueden ser administrados por vía intravenosa (prednisona y metilprednisona) o subcutánea (acetato-fosfato de parametasona o acetónido de triamcinolona) y que influyen en procesos de la inmunidad innata, adquirida y en los mecanismos de inflamación. Los GC desarrollan su actividad terapéutica disminuyendo tanto el número de células inflamatorias circulatorias y su migración a los focos de inflamación, al inhibir la histamina y disminuir la permeabilidad vascular, como la producción de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios (prostaglandinas y leucotrienos). Constituyen una terapia “puente” para los casos de brotes agudos recurrentes y hasta la administración de FAME.

Estos FAME sí son capaces de modificar el curso de la enfermedad modulando o suprimiendo los mecanismos patogénicos involucrados en la respuesta inmune y retrasando, por tanto, el daño estructural articular.

Los FAME inmunomoduladores de uso más extendido son el metotrexato (MTX), la leflunomida (LEF) y la sulfasalazina (SSZ).

El MTX es el FAME de elección en la AR debido a su perfil de eficacia/seguridad, su coste y su familiaridad de uso entre los reumatólogos. El MTX disminuye la inflamación aumentando los niveles intracelulares de adenosina, inhibe la síntesis de citoquinas y posiblemente, de forma parcial, la función de linfocitos T y B.

La LEF es un profármaco que se transforma en su metabolito activo en la submucosa del tracto gastrointestinal, en el hígado y en el plasma. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de pirimidinas y en la proliferación y activación de los linfocitos T.

La SSZ se desarrolló específicamente para la AR con origen infeccioso, siendo el FAME más utilizado antes de la aparición del MTX. Surge de la combinación de ácido salicílico (antiinflamatorio) y sulfapiridina (antibiótico) que son liberados tras la metabolización de la SSZ por la flora intestinal. La SSZ actúa inhibiendo parcialmente la función de linfocitos T y B y la fosfolipasa C. Se ha visto que el tratamiento con estos FAME conlleva, en un elevado número de pacientes, la aparición de efectos adversos generalmente de tipo gastrointestinal y de toxicidad hepática y medular, por lo que es recomendable su monitorización a través de pruebas de laboratorio como hemograma y perfiles hepático y renal.

Entre los FAME inmunosupresores, los más extendidos son la azatioprina (AZA), la ciclofosfamida (CFA) y la ciclosporina (Cs). Estos fármacos fueron inicialmente utilizados para evitar el rechazo de trasplantes y en oncología. La AZA y la CFA inhiben la proliferación de linfocitos B y T a través de la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y son los fármacos más utilizados en el lupus eritematoso sistémico. La Cs inhibe la calcineurina la cual induce la transcripción de citoquinas proinflamatorias como IL-2, suprimiendo en última instancia la función efectora de linfocitos T. Este fármaco también se utiliza en APs y PsO.

En el caso de que los/as pacientes sean intolerantes a los FAME o de que estos por sí solos no contribuyan a una eficacia adecuada, se utilizan los fármacos biológicos. Los fármacos biológicos han revolucionado el tratamiento de las enfermedades reumáticas como la AR y las EspA. Son anticuerpos monoclonales (AcM) o proteínas de fusión producidas por ingeniería genética que neutralizan de forma específica diversas moléculas como citoquinas, receptores, marcadores superficiales de células inmunitarias o funciones celulares relevantes en la patogenia de estas enfermedades (**tabla 1.5**).

**Tabla 1.5. Fármacos biológicos para el tratamiento de la AR y de las EspA.**

Mecanismo de acción	Fármaco	Estructura (diana terapéutica)
Inhibición de citoquinas proinflamatorias y sus receptores	Infliximab	AcM quimérico (anti-TNF $\alpha$ ) (Costa y cols. 2015)
	Adalimumab	AcM humano (anti-TNF $\alpha$ ) (Furst y cols. 2015)
	Etanercept	Proteína de fusión TNFR <sub>2</sub> -Fc $\gamma$ <sub>1</sub> (anti-TNF $\alpha$ ) (Senabre-Gallego y cols. 2013)
	Certolizumab Pegol	Fab pegilado humanizado (anti-TNF $\alpha$ ) (Weinblatt y cols. 2015)
	<b>Golimumab</b>	AcM humano (anti-TNF $\alpha$ ) (Rossini y cols. 2015)
	Anakinra	IL-1Rr (anti-IL-1) (de La Mata Llord y cols. 2007)
	<b>Tocilizumab</b>	AcM humanizado (anti-IL-6R) (Albattal 2016)
Inhibición de la coestimulación de linfocitos T	Abatacept	Proteína de fusión CTLA4-Fc $\gamma$ 1 (anti-CD80/86) (Korhonen y cols. 2009)
Depleción de linfocitos B	Rituximab	AcM quimérico (anti-CD20) (Binder y cols. 2006)

### 1.2.3.2. Tratamiento de la PsO

Los tratamientos de la PsO dependen de la disponibilidad de terapias eficientes y de la decisión del/la paciente en la elección de las mismas, ya que su preferencia influye notablemente en la adherencia al tratamiento (Bewley y Page 2011). El tratamiento puede variar en función de la gravedad de la enfermedad desde terapias de uso tópico, que funcionan en un 70-80% de los/as pacientes que presentan una forma leve de la enfermedad, hasta el uso de fototerapia o fármacos sistémicos, en las formas más graves de la misma.

Entre las terapias iniciales de uso tópico cabe destacar la denominada terapia de Goeckerman (Gupta y cols. 2013) que consiste en la aplicación de alquitranes de hulla usados generalmente en combinación con luz UV de tipo B (UV-B). No obstante, su uso está limitado debido a la poca efectividad y a la tinción residual de la piel tras cada aplicación. La antralina es un derivado hidroxilado del antraceno (ditrinol) que inhibe la proliferación de los queratinocitos y, en menor medida, de linfocitos, por inhibición de la ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Gottlieb y cols. 1992) y afecta a la estructura y función mitocondrial de los queratinocitos desencadenando su apoptosis (McGill y cols. 2005).

Los corticoides tópicos son una de las opciones de tratamiento más extendidas por su rápido efecto antiinflamatorio, inmunosupresor y antiproliferativo, capaz de inhibir la transcripción de genes proinflamatorios (Hughes y Rustin 1997). A pesar de ser de los tratamientos más efectivos para la PsO, presentan importantes efectos adversos sobre todo en terapias prolongadas llegándose a producir atrofia cutánea, telangiectasia, anomalías en la función adrenal y tolerancia precoz (taquifilaxia) (Federman y cols. 1999).

Como alternativa a los corticoides se encontrarían la forma activa de la vitamina D (vitamina D<sub>3</sub>, calcitriol) y sus análogos sintéticos, como el calcipotriol y el tacalcitol, considerados junto con los corticosteroides la primera línea terapéutica en la PsO. La aplicación de calcitriol sobre las lesiones psoriásicas induce la expresión de involucrinas y transglutaminasas necesarias para la formación de la envoltura cornificada y la correcta restauración de la función barrera de la piel (Pillai y Bikle 1991). Los análogos de la vitamina D inhiben la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-2, interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-6 e IL-8 (Manolagas y cols. 1985). Así por ejemplo, el calcipotriol es un inhibidor de las funciones efectoras de linfocitos T con efectos antiproliferativos sobre los queratinocitos de las lesiones psoriásicas (Brown y Slatopolsky 2008) y aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y de su receptor en queratinocitos (Kang y cols. 1998).

Las terapias de uso tópico desarrolladas posteriormente son los retinoides químicamente relacionados con la vitamina A. El más empleado es el tazaroteno, un profármaco del ácido tazaroténico, que actúa como inmunomodulador de la proliferación y diferenciación celular con actividad antiinflamatoria, demostrando ser efectivo y seguro en monoterapia (Weinstein y cols. 1997).

En los/as pacientes con PsO no respondedores/as a la terapia tópica o con una mayor gravedad de la enfermedad incluyendo lesiones psoriásicas extensas, se consideraría el uso de fototerapia o terapia sistémica.

La fototerapia se utiliza como tratamiento de la PsO con la exposición a rayos UV-B (Coven y cols. 1997). Los mecanismos por los cuales se consigue el beneficio de la utilización de radiación UV-B en la PsO no están del todo claros aunque se ha demostrado que estimula la melanogénesis y reduce los procesos oxidativos (Gu y cols. 2015), disminuye los niveles de la IL-31 (Narbutt y cols.

2013), inhibe las rutas de señalización mediadas por la IL-17 y el IFN de tipo 1 y 2 (Racz y cols. 2011) y provoca la depleción de linfocitos T epidérmicos activados (Krueger y cols. 1995). La fotoquimioterapia constituida por la administración por vía oral o tópica de un éster del ácido fumárico (Psoraleno, P) en combinación con radiación UV-A constituye un tratamiento eficaz de fotoquimioterapia (PUVA) que consigue restaurar el desequilibrio entre los linfocitos Th<sub>17</sub> y los Treg característico de la PsO (Melski y cols. 1989; Furuhashi y cols. 2013). Aunque la radiación UV ha demostrado ser eficaz en la PsO, la terapia PUVA se ha asociado con la aparición de carcinomas de células escamosas (Nataraj y cols. 1997) y melanomas (Stern y cols. 1997), siendo más segura la administración de UV-B (Weischer y cols. 2004).

A los/as pacientes que no responden adecuadamente a la fototerapia se les administraría fármacos sistémicos con actividad supresora sobre las células del sistema inmune o los queratinocitos, como el MTX (Menting y cols. 2016), retinoides en combinación con fototerapia (Oezemir y cols. 2008), Cs (Ellis y cols. 1991) y derivados de la ascomicina como el pimecrolimus, capaz de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias (Rappersberger y cols. 2002). Aunque estos tratamientos han demostrado ser efectivos, su uso está limitado debido a la toxicidad renal, hepática y pulmonar que presentan (Griffiths y cols. 1995) lo que ha llevado a desarrollar otras estrategias terapéuticas.

Los últimos avances en investigación sobre la PsO, junto con la innovación en el campo de la biotecnología, han permitido el desarrollo de fármacos biológicos capaces de modular la respuesta inmune al bloquear específicamente moléculas clave de los mecanismos patogénicos de la PsO (Kupper 2003). La mayoría de estos fármacos (**tabla 1.6**) son AcM, citoquinas y proteínas de fusión, que presentan especificidad dirigida contra células, citoquinas o interacciones entre ligando y receptor, a través de diferentes mecanismos (**figura1.4**).

Tabla 1.6. Fármacos biológicos para el tratamiento de la PsO.

Mecanismo acción	Fármaco	Estructura (diana terapéutica)
Inhibición de la activación de linfocitos T	Alefacept	Proteína de fusión (LFA3-Fc $\gamma_1$ ) (da Silva y cols. 2002).
	Galaximab	AcM quimérico (anti-CD80) (Gottlieb y cols. 2004)
	Siplizumab	AcM humanizado (Anti-CD2) (Bissonnette y cols. 2009)
Reducción de linfocitos T patogénicos	Diftitoxina dinileucina	Proteína de fusión (toxina diftérica-IL-2) (Martin y cols. 2001)
Inhibición de la atracción de leucocitos	Efalizumab	AcM humanizado (anti-CD11a) (Lebwohl y cols. 2003)
	Infliximab	AcM quimérico (anti-TNF $\alpha$ ) (Saraceno y cols. 2009)
	Adalimumab	AcM humano (anti-TNF $\alpha$ ) (Moore y cols. 2010)
	Etanercept	Proteína de fusión (TNFR $_2$ -Fc $\gamma_1$ ) (Papp y cols. 2015b).
	Brodalumab	AcM humano (anti-IL-17AR) (Papp y cols. 2012).
	Secukinumab	AcM humano (anti-IL-17A) (Langley y cols. 2014).
	Ixekizumab	AcM humano (anti-IL-17A) (Leonardi y cols. 2012)
	Briakinumab	AcM humano (anti-IL-12,-IL-23) (Ryan y cols. 2011).
	Guselkumab	AcM humano (anti-IL-23) (Gordon y cols. 2015).
	<b>Ustekinumab</b>	AcM (anti-IL12, -IL-23) (Langley y cols. 2015)
Tildrakizumab	AcM humano (anti-IL23) (Papp y cols. 2015a).	

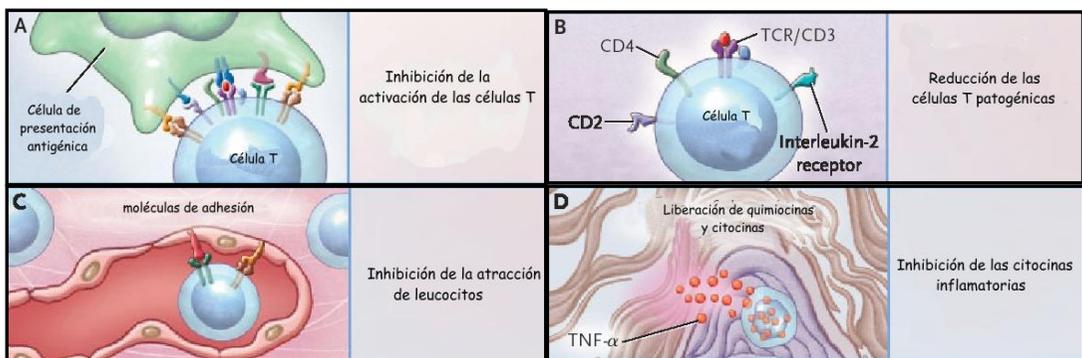


Figura 1.4. Mecanismos moleculares de los fármacos biológicos utilizados en la PsO. (A) Inhibición de la activación de linfocitos T por inhibición de moléculas involucradas en la formación de la sinapsis inmunitaria. (B) Depleción de linfocitos T activados por bloqueo de moléculas que expresan específicamente como el receptor de alta afinidad por IL-2, CD2 o CD4. (C) Inhibición del reclutamiento de leucocitos al foco de inflamación de la piel bloqueando las moléculas de adhesión como selectinas o integrinas. (D) Inhibición de citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$ .

Se sabe que en las enfermedades crónicas la implementación de programas educativos y de autocontrol como el ejercicio físico, la información sobre la enfermedad, los debates grupales y el soporte psicosocial y médico, aportan claros beneficios para el/la paciente (Osborne y cols. 2007). A pesar de que no hay muchas evidencias de los efectos beneficiosos en el caso de la PsO (Larsen y cols. 2014) existen estudios en los que se demuestra que pacientes con PsO experimentan una disminución de la actividad de la enfermedad combinando los programas educativos y de autocontrol con el efecto de la climatoterapia a corto plazo, como la exposición a la radiación natural del sol (Wahl y cols. 2015) y el efecto combinado de esta y sales minerales ricas en iones magnesio como las del Mar Muerto (Abels y Kattanbyron 1985), con potencial inhibitorio sobre las células de Langerhans de las lesiones psoriásicas (Schempp y cols. 2000).

### **1.3. TERAPIAS BIOLÓGICAS DEL ESTUDIO**

#### **1.3.1. GOLIMUMAB**

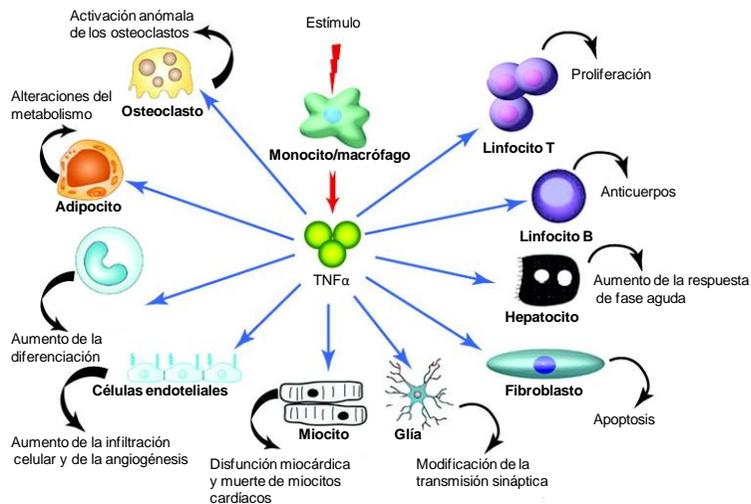
Golimumab (GLM) es un anticuerpo monoclonal humano de isotipo IgG1 $\kappa$  con una masa molecular de 150 KDa que presenta distintos patrones de glucosilación y que se une al TNF $\alpha$  soluble (sTNF $\alpha$ ) y transmembrana (tmTNF $\alpha$ ) (Shealy y cols. 2010). GLM fue desarrollado por la empresa Centocor B.V. (Países Bajos) por tecnología del DNA recombinante en un hibridoma murino y en 2009 fue aprobado en EEUU y en Europa para su utilización en la AR de moderada a grave en combinación con MTX en pacientes adultos cuando la respuesta a FAME, incluido MTX, ha sido inadecuada (Emery y cols. 2009; Kay y cols. 2008; Keystone y cols. 2009; Smolen y cols. 2015), en la APs activa y progresiva tanto en monoterapia como en terapia combinada con MTX en pacientes adultos con respuesta inadecuada a FAME (Kavanaugh y cols. 2009; Xu y cols. 2009) y en EA activa y de carácter severo en pacientes adultos con respuesta inadecuada a tratamientos convencionales previos (Inman y cols. 2008). En 2013 se aprobó para su utilización en CU de moderada a severa en pacientes con dependencia a GC, con respuesta inadecuada o intolerantes a tratamientos previos (Adedokun y cols. 2016).

GLM en disolución (100 mg/ml) presenta una gran estabilidad conformacional y térmica siendo mayores que las de otros antagonistas del TNF $\alpha$  (IFX) o que las de inmunoglobulinas

policlonales con la misma estructura (IgG). El 98% de GLM está en forma monomérica a 25 °C y 5 °C durante un periodo de almacenamiento de 12 y 18 meses respectivamente. La afinidad de GLM por la forma soluble del TNF $\alpha$  es mayor que por la forma transmembrana y ambas mayores que la de otros antagonistas del TNF $\alpha$  (IFX, ADL, ETN) (Shealy y cols. 2010).

Tras una única administración de GLM por vía subcutánea se obtiene una biodisponibilidad del 51% alcanzándose una concentración máxima ( $C_{max}$ ) de  $3,1 \pm 1,4$   $\mu\text{g/ml}$  en un tiempo ( $t_{max}$ ) de entre 2 y 6 días. El tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) es de  $12 \pm 3$  días alcanzándose el estado estacionario a las 12 semanas de tratamiento con unas concentraciones valle o mínimas ( $C_{min}$ ) de  $0,6 \pm 0,4$ ,  $0,5 \pm 0,4$  y  $0,8 \pm 0,4$   $\mu\text{g/ml}$  en pacientes con AR, APs y EA respectivamente [Ficha Técnica de GLM de la Agencia Europea del Medicamento (EMA, *European Medicines Agency*), 2009].

Se ha demostrado que el TNF $\alpha$  es importante en la patogenia de la AR, ya que sus niveles se encuentran elevados en pacientes con esta enfermedad (Tetta y cols. 1990).



**Figura 1.5. Funciones del TNF $\alpha$  en función del tipo celular.**

El TNF $\alpha$  es una proteína homotrimérica soluble de 17 kDa producido principalmente por monocitos y macrófagos y en menor medida por linfocitos B, T y fibroblastos. El TNF $\alpha$  recién sintetizado se inserta en la membrana celular y seguidamente es liberado como una citoquina soluble

tras la degradación del dominio de anclaje a la membrana por una serin proteasa (Black *y cols.* 1997). El TNF $\alpha$  es un estimulador autocrino e inductor paracrino de otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 (Nawroth *y cols.* 1986), IL-6, IL-8 y el factor estimulador de colonias de granulocitos (Haworth *y cols.* 1991). Se une a dos tipos de receptores: el TNFR<sub>1</sub>, que se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, y el TNFR<sub>2</sub>, que es inducible por el TNF $\alpha$ , la IL-1 y el IFN- $\gamma$  (Choi *y cols.* 2005). El TNF $\alpha$  presenta múltiples funciones en distintos tipos celulares pudiendo provocar alteraciones del metabolismo, aumento de la diferenciación, proliferación e infiltración celular y angiogénesis, disfunción miocárdica, modificación de la transmisión sináptica o incluso la apoptosis (figura 1.5).

Además, promueve la inflamación estimulando en fibroblastos la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, implicada en el reclutamiento de leucocitos en la articulación inflamada. Por otro lado, el TNF $\alpha$  a niveles bajos también interviene en funciones beneficiosas para el organismo como el mantenimiento de la homeostasis por regulación del ciclo circadiano ya que disminuye indirectamente la inflamación por estimulación de la liberación de corticotropina desde la hipófisis y consiguiente producción y secreción de cortisol por las glándulas suprarrenales (Karrow *y cols.* 2010).

El principal mecanismo de acción de GLM se basa en el bloqueo directo de las funciones mediadas por TNFR.

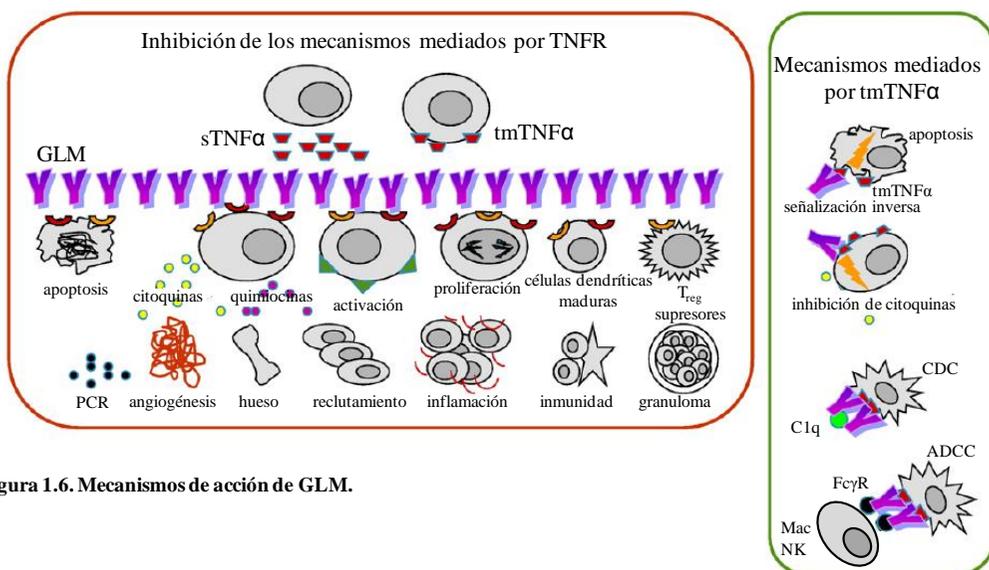


Figura 1.6. Mecanismos de acción de GLM.

GLM se une a sTNF $\alpha$  y tmTNF $\alpha$  inhibiendo su capacidad para unirse tanto a TNFR $_1$  como a TNFR $_2$  y, por lo tanto, previene la transducción de la señal inflamatoria. Además, la unión de GLM a tmTNF $\alpha$  puede desencadenar procesos de señalización inversa o de citotoxicidad. A través de la señalización inversa se inhibe la liberación de citoquinas por parte de la célula productora de TNF $\alpha$  conduciendo incluso a la apoptosis de la misma. La citotoxicidad que promueve GLM se basa en su capacidad para unirse por su fracción Fc a moléculas solubles y receptores celulares. GLM es capaz de activar el sistema del complemento por la vía clásica al unirse a la molécula C1q conllevando la formación de poros y complejos de ataque de membrana y la lisis celular (CDC, citotoxicidad dependiente del complemento). Por otro lado, GLM también se une a los receptores Fc $\gamma$ R de macrófagos y células NK e induce la lisis celular mediada por enzimas (ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) (Tracey y *cols.* 2008) (**figura 1.6**).

GLM en combinación con MTX disminuye la PCR y la VSG así como los niveles de otras moléculas involucradas en la patogenia de la AR como la proteína amiloide A sérica, ICAM-1, IL-6, IL-8, MMP-3 y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y promueve un ligero aumento del colesterol total y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Kirkham y *cols.* 2014). Asimismo, GLM presenta efectos moduladores sobre otras proteínas de fase aguda ( $\alpha$ 1-antitripsina, haptoglobina y factor de von Willebrand), sobre los marcadores inflamatorios IL-6, TNFR $_2$ , proteína 1 $\beta$  inflamatoria de macrófagos (MIP-1 $\beta$ ), inhibidor de metaloproteínasa 1 (TIMP-1) (Wagner y *cols.* 2012), así como sobre quimiocinas derivadas de monocitos y macrófagos, IL-16, calgranulina C y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). Estas variaciones en los niveles de los biomarcadores son consistentes con una mejora de las lesiones y una reducción de la inflamación y del remodelado óseo (Kay y *cols.* 2008; Wagner y *cols.* 2013).

### **1.3.2. TOCILIZUMAB**

Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 $\kappa$ , que fue humanizado insertando en una IgG1 $\kappa$  humana las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo monoclonal de origen murino dirigido contra el receptor humano de la IL-6. TCZ fue originalmente desarrollado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., (Tokio, Japón), aunque Hoffmann-La Roche (Basilea, Suiza) obtuvo los derechos de TCZ en EEUU, para más tarde aliarse y expandir el

medicamento en todos los países excepto Japón, Corea del Sur y Taiwan. A finales del 2007 Roche introdujo TCZ, aprobado por la *Food & Drugs Administration* (FDA) y la EMA, en el mercado europeo y americano como tratamiento de la AR de moderada a severa, en combinación con MTX, en adultos que respondieron inadecuadamente o presentaron intolerancia a terapias previas con uno o más FAME o con antagonistas del TNF $\alpha$ .

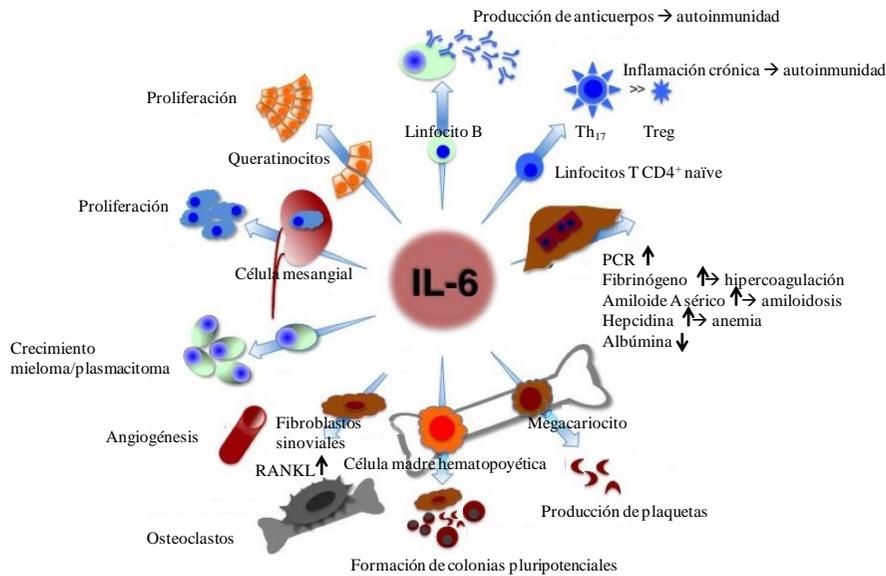
La pauta de administración de TCZ es de 8 mg/kg/4 semanas por vía intravenosa (Emery y *cols.* 2008), con la que se obtiene una  $C_{\max}$  de  $183,0 \pm 85,6$   $\mu\text{g/ml}$  y una  $C_{\min}$  de  $9,74 \pm 10,50$   $\mu\text{g/ml}$ . El  $t_{1/2}$  es dependiente de la concentración, estimado en un rango de 8 - 14 días (Ficha Técnica de TCZ, EMA 2009).

La IL-6 es una glucoproteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos, cuya liberación esta inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF $\alpha$ . La IL-6 se puede unir a un receptor transmembrana o a un receptor soluble, lo que permite que esta IL tenga acción sobre células que no expresan constitutivamente el receptor de membrana.

En estudios preclínicos y ensayos con humanos, se ha demostrado la influencia de la IL-6 en procesos característicos de la AR como la activación de linfocitos T, la hiperproliferación de fibroblastos sinoviales, la diferenciación de osteoclastos y la inflamación crónica de la membrana sinovial. La IL-6 es una citoquina pleiotrópica (Tanaka y Kishimoto 2012) que contribuye a la inflamación en enfermedades autoinmunes como la AR (Kishimoto 2006) y la PsO (Grossman y *cols.* 1989).

Entre sus múltiples funciones destacan también la inducción de la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos y de los linfocitos T a la subpoblación Th<sub>17</sub> y la inhibición de la diferenciación de los linfocitos Treg, los cuales son importantes para mantener la homeostasis de la respuesta inflamatoria (Kimura y Kishimoto 2010). Asimismo, induce la expresión por parte de los hepatocitos de las proteínas de fase aguda como la PCR, el fibrinógeno, la proteína amiloide A sérica, la haptoglobina, la antiqumiotripsina y reduce los niveles de albúmina, fibronectina y transferrina (Heinrich y *cols.* 1990). Muestra efectos sobre el sistema hematopoyético, condrocitos y osteoclastos (Tamura y *cols.* 1993) y está involucrada en el desarrollo

de la anemia de las enfermedades crónicas al inducir la expresión de hepcidina, que controla la distribución del hierro plasmático y tisular causando hipoferremia (Nemeth y cols. 2004) (**figura 1.7**).



**Figura 1.7. Funciones de la IL-6.**

TCZ se une a IL-6R tanto a la forma soluble (sIL-6R) como a la transmembrana (mIL-6R). Esta unión provoca la homodimerización de gp130 conformando el complejo funcional IL-6/IL-6R/gp130 con la consiguiente activación de la cascada de señalización intracelular a través de la quinasa de Janus activada (JAK) y de los elementos transductores y activadores de la transcripción (STAT). La unión de TCZ a mIL-6R inhibe la señalización clásica y la unión al sIL-6R la transeñalización, al inhibir la unión de la IL-6 a sus receptores. Esta inhibición interrumpe la activación del sistema JAK/STAT mitigando la acción proinflamatoria y de destrucción ósea que caracteriza a la IL-6 en AR incluyendo la respuesta de fase aguda, la diferenciación de los linfocitos Th<sub>17</sub> y de los osteoclastos y la producción de MMP (Calabrese y Rose-John 2014) (**figura 1.8**).

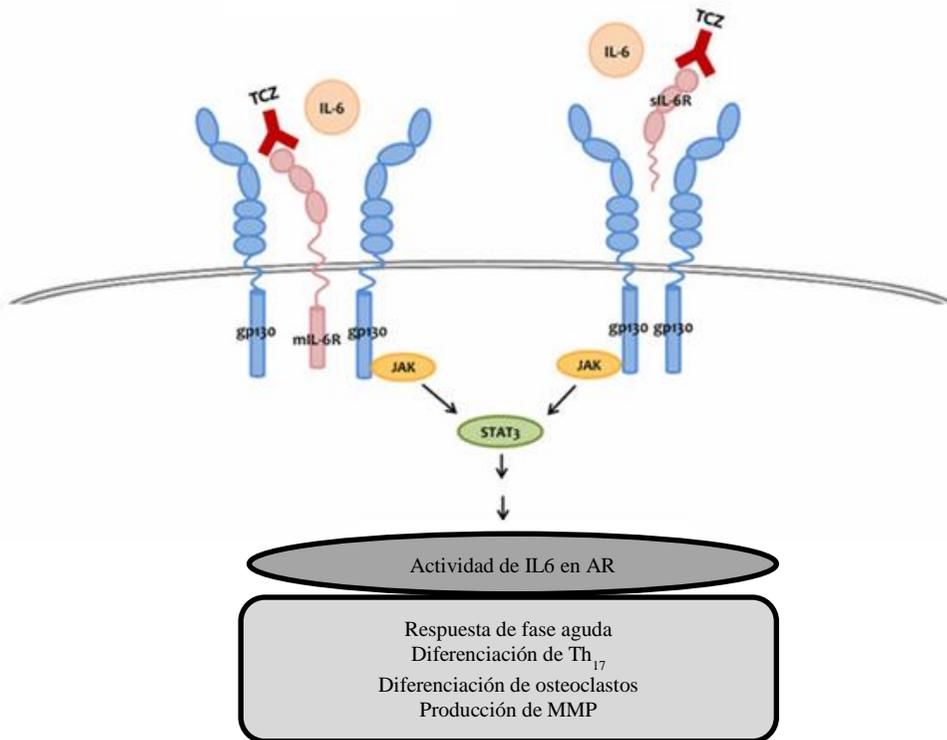


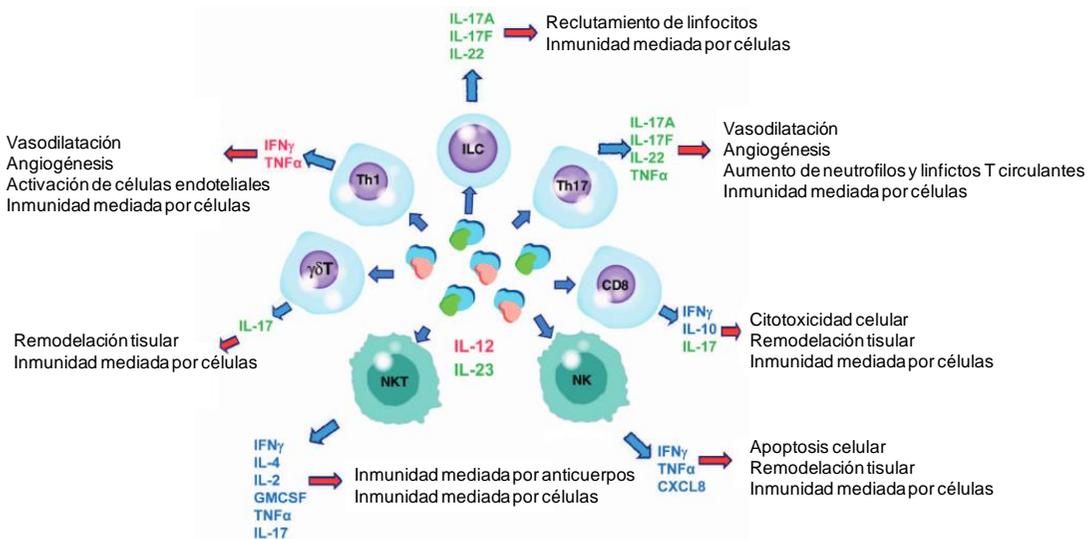
Figura 1.8. Señalización inducida por IL-6R y mecanismo de acción de TCZ.

### 1.3.3. USTEKINUMAB

Ustekinumab (UTK) es un anticuerpo monoclonal humano de isotipo IgG1κ dirigido contra las citoquinas IL-12 e IL-23. Fue producido en una línea celular de mieloma de ratón por tecnología del DNA recombinante y fue lanzado al mercado por Centocor Ortho Biotech, empresa filial del grupo Johnson & Johnson bajo el nombre comercial de Stelara® para el tratamiento de la PsO en placa de moderada a grave en pacientes adultos que no responden, tienen contraindicada o no toleran otros tratamientos sistémicos incluyendo la Cs, MTX o la terapia PUVA. En 2011 fue aprobado en Japón para el tratamiento de la APs solo o en combinación con MTX en pacientes adultos cuando la respuesta a tratamientos no biológicos previos con FAME es inadecuada. UTK también se utiliza como tratamiento para otras patologías como la EC (Sandborn y cols. 2008) y la esclerosis múltiple (EM) (Segal y cols. 2008).

La posología recomendada de UTK consiste en una dosis inicial de 45 mg administrada por vía subcutánea, seguida de otra dosis de 45 mg a las 4 semanas y posteriormente otra de 45 mg cada 12 semanas. El  $t_{max}$  es de 8,5 días después de una sola administración subcutánea de 90 mg con una biodisponibilidad absoluta del 57,2%. El  $t_{1/2}$  es aproximadamente de 3 semanas en los pacientes con PsO y/o APs (Ficha Técnica de UTK, EMA 2013).

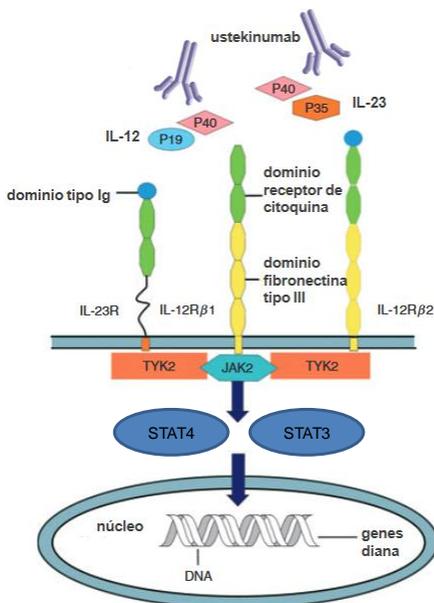
La elevada presencia de la IL-12 (Yawalkar y cols. 1998) y de la IL-23 (Piskin y cols. 2006) en las placas psoriásicas y la asociación existente entre la enfermedad y la presencia de polimorfismos en el gen que codifica la subunidad p40, común a ambas interleucinas, y en el gen del receptor IL-23R (Cargill y cols. 2007), demuestran el papel de estas citoquinas en la inmunopatología de la PsO (Reddy y cols. 2007) (**figura 1.9**).



**Figura 1.9. Funciones de las citoquinas IL-12 e IL-23 en función del tipo celular.** En rojo se muestran las funciones específicas de la IL-12, en verde las de la IL-23 y en azul las funciones compartidas entre ambas. CXCL: quimiocina con motivo C-X-C, IFN $\gamma$ : interferon  $\gamma$ , GMCSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, NKT: células T asesina natural, ILC: células linfoides innatas.

La IL-12 es una glucoproteína proinflamatoria constituida por 2 dominios (p40 y p35) y producida principalmente por macrófagos, monocitos y células dendríticas que promueve la activación de la inmunidad mediada por células al inducir la activación de linfocitos T y células NK. La IL-12 induce la diferenciación de linfocitos T vírgenes a la subpoblación de linfocitos Th<sub>1</sub>

caracterizados por la producción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-2 (Koutruba y cols. 2010). La IL-23 es una citoquina heterodimérica formada por una subunidad p40 y por otra p19 que induce la diferenciación de linfocitos T vírgenes a la subpoblación de linfocitos Th<sub>17</sub> (Aggarwal y cols. 2003) caracterizados por la producción de otras citoquinas inflamatorias como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y TNF $\alpha$  (Langrish y cols. 2005). Ambas citoquinas inducen las funciones efectoras de varios tipos celulares como los linfocitos T CD4+ involucrados en la fisiopatología de la AR y de la PsO, los linfocitos T CD8+,  $\delta\gamma$ T, células NK, NKT y células linfoides innatas (Benson y cols. 2011).



**Figura 1.10. Señalización inducida por IL-12 e IL-23 y mecanismo de acción de UTK.** La unión de UTK a la subunidad p40 de ambas citoquinas impide su unión con los correspondientes receptores en los linfocitos T y células NK inhibiendo la transducción de la señal que conduciría a la activación de factores de transducción de la señal y activadores de la transcripción (STAT) cuya translocación al núcleo provocaría la expresión de genes de mediadores inflamatorios.

UTK se une específicamente y con gran afinidad a la subunidad p40 de las IL-12 e IL-23, bloqueando su unión al receptor IL-12R $\beta$ 1 (Robinson 2015) con la consiguiente inhibición de los linfocitos T efectoras y células NK (Tang y cols. 2012) (**figura 1.10**). El receptor de la IL-12 está formado por la subunidad IL-12R $\beta$ 1 e IL-12R $\beta$ 2 mientras que el receptor de la IL-23 está formado por la subunidad IL-12R $\beta$ 1 y la subunidad IL-23R, que se asemeja a la subunidad IL-12R $\beta$ 2 pero sin los dominios de fibronectina tipo III. La unión de UTK a la subunidad p40 de ambas citoquinas impide su unión con los correspondientes receptores en los linfocitos T y células NK inhibiendo la transducción de la señal que conduciría a la activación de STAT cuya translocación al núcleo

provocaría la expresión de genes de mediadores inflamatorios. La neutralización de IL-12 inhibe la fosforilación de STAT4 impidiendo su translocación al núcleo y por tanto inhibiendo la expresión de marcadores de superficie y la producción de IFN  $\gamma$ , mientras que la neutralización de IL-23 inhibe a STAT3 y la consiguiente producción de IL-17A, IL-17F e IL-22. UTK no reconoce a la IL-12 y a la IL-23 unidas a sus receptores correspondientes lo que probablemente contribuye a que no pueda mediar funciones efectoras a través de su región Fc como la ADCC y la CDC (Benson y cols. 2011; Tang y cols. 2012).

#### **1.4. LA INMUNOGENICIDAD ASOCIADA A LAS TERAPIAS BIOLÓGICAS**

Los fármacos biológicos han demostrado ser eficaces en enfermedades autoinmunes como la AR, EspA y PsO, entre otras, pero por su naturaleza son inmunogénicos. La inmunogenicidad es un fenómeno que ocurre cuando el reconocimiento de una sustancia extraña provoca una respuesta humoral específica dirigida en forma de anticuerpos contra dicha sustancia debido a defectos en los mecanismos de tolerancia. Este fenómeno comienza con la activación de la respuesta innata a través de los receptores de reconocimiento de patrones de las células presentadoras de antígenos (células dendríticas y linfocitos B) que contribuyen posteriormente a la activación de la respuesta adaptativa mediada por linfocitos T (Baker y cols. 2010). Los anticuerpos antifármaco generalmente son policlonales incluyendo diferentes isotipos (IgA, IgM, IgE e IgG) y subclases, cuya habilidad para neutralizar la actividad de la proteína terapéutica dependerá del epítipo procesado por las células B, aunque mayoritariamente son de isotipo IgG1, en el inicio de la respuesta inmune, e IgG4, en exposiciones repetidas al fármaco (Aalberse y cols. 1983), siendo menos frecuentes los IgA, IgM y sobretodo IgE.

Los anticuerpos antiidiotipo contra fármacos biológicos, ya sean humanizados o completamente humanos, son típicamente neutralizantes pudiendo alterar las propiedades farmacocinéticas e incluso comprometer la actividad del fármaco, lo que conlleva la reducción de la respuesta clínica o incluso el fallo total del tratamiento (Baert y cols. 2003; Pascual-Salcedo y cols. 2011; Weinblatt y cols. 2003) y la aparición de efectos adversos como reacciones infusionales en el lugar de inyección (Bertototto 2009).

La prevalencia de anticuerpos antifármaco es variable debido a la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas, al uso de tratamientos concomitantes y a los diferentes tiempos muestrales y pautas de dosificación. La reducción de la eficacia del tratamiento podría deberse a dos mecanismos: por un lado los anticuerpos antiidiotipo neutralizantes, tras su unión al fármaco, pueden bloquear la posterior unión del fármaco a su diana (Kosmac y cols. 2011; van Schouwenburg y cols. 2013) y por otro lado la unión de anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes al fármaco puede aumentar el aclaramiento del fármaco disminuyendo el tiempo de vida media en la circulación sanguínea y por lo tanto el efecto biológico. En estudios preclínicos se ha demostrado que estos inmunocomplejos son rápidamente eliminados de la circulación ya que pueden tener graves consecuencias por riesgo a provocar tromboembolias (Rojas y cols. 2005; van der Laken y cols. 2007; Korswagen y cols. 2011).

Los factores que influyen en la inmunogenicidad se pueden dividir en factores relacionados con el paciente, con la enfermedad y con el tratamiento. El primer factor **relacionado con el paciente** hace referencia al grado de respuesta inmune basal. Se observa un aumento de la producción de anticuerpos antifármaco en individuos con sistemas inmunes altamente activos y/o con infecciones recurrentes, al contrario de lo que ocurre en pacientes inmunocomprometidos (Schellekens 2002). El segundo es la herencia genética ya que existe asociación entre la presencia de ciertas mutaciones y alelos en genes de determinadas citoquinas e inmunoglobulinas y la producción de anticuerpos antifármaco (Barbosa y cols. 2006; Reeves y cols. 1984; Prescott y cols. 1997). Los **factores relacionados con la enfermedad** hacen referencia al estadio de la misma, ya que las fases avanzadas con mayor actividad clínica se traducen en una respuesta inmunogénica más importante siendo dependiente de los mecanismos inmunogénicos subyacentes a cada enfermedad. Los **factores relacionados con el tratamiento** son debidos a las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre las proteínas recombinantes y las endógenas (Modi 1994) y a la naturaleza del fármaco biológico, siendo los más inmunogénicos los de origen totalmente murino. La inmunogenicidad va disminuyendo según se sustituye la contribución de origen animal por humana. Así, los fármacos quiméricos, que presentan un 34% de origen animal y un 66% de origen humano, son los más inmunogénicos siendo los siguientes los humanizados, en los que solo las regiones determinantes de complementariedad son de origen animal (10%). Los menos inmunogénicos son los totalmente humanos (**figura 1.11**).



Figura 1.11. Estructura de los AcM e inmunogenicidad asociada.

Los tratamientos prolongados conllevan un aumento de la inmunogenicidad al existir mayor tiempo de exposición al fármaco, aunque con dosis altas disminuye al inducir tolerancia. Las rutas de administración subcutánea, intradérmica e intramuscular son más inmunogénicas que la intravenosa y a medida que la frecuencia de administración disminuye también lo hace la inmunogenicidad al igual que con tratamientos concomitantes con inmunosupresores. Los procesos de fabricación, manipulación y almacenamiento de los fármacos biológicos pueden conllevar alteraciones en la inmunogenicidad. La introducción de impurezas o ciertos aditivos durante el proceso de fabricación pueden generar una respuesta de anticuerpos contra el fármaco, al igual que cambios en el proceso que conlleven la oxidación, la formación de agregados o la modificación de los patrones de glucosilación del fármaco al introducir nuevos epítopos potencialmente inmunogénicos como ocurre en las proteínas de fusión, con la formación de una nueva región entre la unión de las dos entidades proteicas (Schellekens 2002).

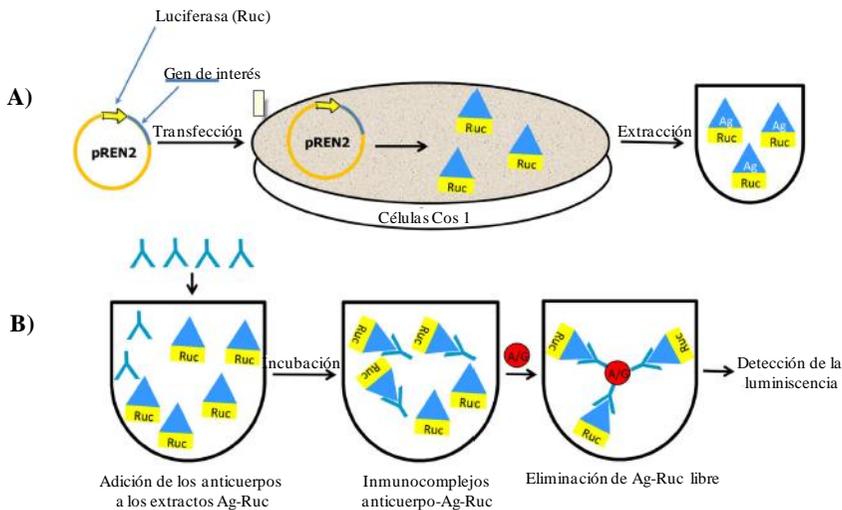
## 1.5. LA TECNOLOGÍA APLICADA A LA MONITORIZACIÓN DE TERAPIAS BIOLÓGICAS

La posología de los fármacos biológicos se establece inicialmente en base a la información obtenida en ensayos clínicos con cohortes grandes y heterogéneas de pacientes (Moreland 2004), sin embargo, en la práctica clínica habitual las características de los/as pacientes pueden ser considerablemente diferentes a las encontradas en dichos ensayos (Flendrie y cols. 2003). La variabilidad en la farmacocinética entre pacientes puede hacer que los niveles de fármaco sean inadecuados entre dosis consecutivas y por consiguiente, que la respuesta clínica sea insuficiente.

Este problema puede exacerbarse si además los pacientes desarrollan anticuerpos antifármaco. Por lo tanto, la monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos sería beneficioso para los/as pacientes para establecer regímenes individualizados de tratamiento y aumentar así su eficacia y tolerabilidad (Bendtzen y cols. 2006).

La monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos se puede llevar a cabo a través de diferentes metodologías como la inmunoprecipitación, los ensayos de cambio homogéneo de movilidad, la resonancia de plasmones de superficie, los bioensayos y los ensayos de unión, entre otros, presentando todos ellos ventajas y desventajas.

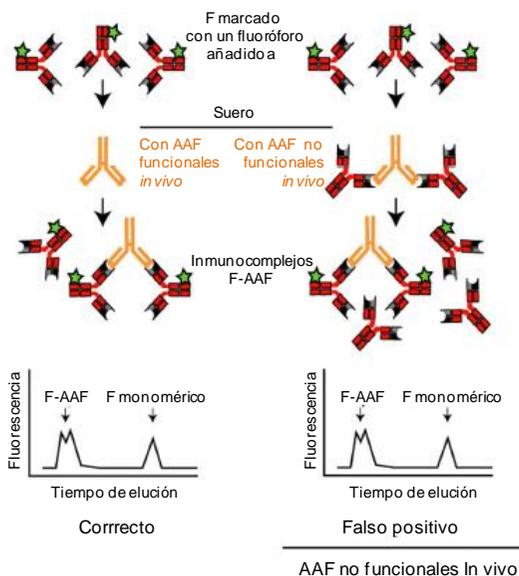
La inmunoprecipitación es un método que posibilita, entre otras aplicaciones, la detección y cuantificación de un antígeno presente en una muestra incubando este con un anticuerpo específico previamente marcado con radioisótopos (radioinmunoprecipitación) (Lawrence y cols. 2003; Tacey y cols. 2003) o con reactivos quimioluminiscentes (Burbelo y cols. 2015). El complejo antígeno/anticuerpo se retira de la muestra y la cantidad de antígeno presente en ella es proporcional a la radiactividad o a la luz emitida (**figura 1.12**).



**Figure 1.12. Esquema general del sistema luciferasa en la inmunoprecipitación de anticuerpos.** (A) La secuencia de DNA del antígeno (Ag) de interés se fusiona con la región C-terminal del gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* (Ruc). Estos plásmidos recombinantes se usan para transfectar células Cos 1 y el lisado celular se recoge sin purificar 48 h después. (B) El extracto único o una mezcla de extractos diferentes con el Ag-Ruc se incuban con las muestras de suero. Los inmunocomplejos Ag-Ruc-anticuerpo son capturados con partículas recubiertas con proteína A/G y se elimina la fracción de Ag-Ruc no unida. La cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra se determina a través de la cantidad de Ag-Ruc unida tras añadir el sustrato de la luciferasa.

Son técnicas de gran sensibilidad y especificidad con un amplio rango dinámico, sin embargo, son procesos largos y de bajo rendimiento debido al escaso número de muestras a analizar en cada tanda. Por la complejidad de los procesos, son difíciles de automatizar y, por lo tanto, de implementar en los laboratorios de rutina clínica.

Los ensayos de cambio homogéneo de movilidad (HSMA, *Homogeneous Mobility Shift Assay*) utilizan la cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC, *Size Exclusion – High Performance Liquid Chromatography*) para determinar cuantitativamente los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco incubando las muestras con el propio fármaco marcado con un fluoróforo, para posteriormente separar los inmunocomplejos de los reactivos marcados en forma monomérica y cuantificar la fluorescencia por SE-HPLC (**figura 1.13**).

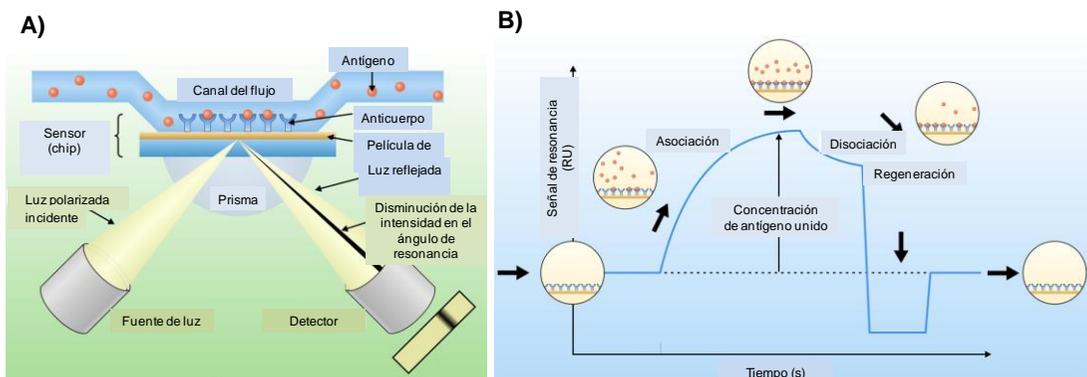


**Figura 1.13. Determinación de anticuerpos antifármaco por HSMA.** El análisis se basa en la asociación del fármaco (F) marcado con un fluoróforo y los anticuerpos antifármaco (AAF) presentes en la muestra de suero y la separación cromatográfica de los AAF unidos y la fracción libre del F marcado (*izquierda*). Los AAF funcionalmente inactivos, que se unen al F *in vivo*, pueden disociarse durante el ensayo y reasociarse con el F marcado antes o durante la cromatografía (*derecha*), reportando resultados similares al anterior caso.

Esta técnica presenta una mayor sensibilidad analítica y tolerancia a la presencia de fármaco en la cuantificación de anticuerpos antifármaco, pudiendo también detectar los anticuerpos antifármaco de baja afinidad y los distintos isotipos incluido las IgG4 (Wang y cols. 2012). A pesar de las grandes ventajas que presenta, cuenta con el inconveniente de que durante el análisis cromatográfico los inmunocomplejos podrían disociarse de forma espontánea lo que conllevaría

reportar la falsa presencia de anticuerpos antifármaco no neutralizantes *in vivo*. Además, su equipamiento costoso limitaría su uso en la rutina clínica (Bendtzen 2015).

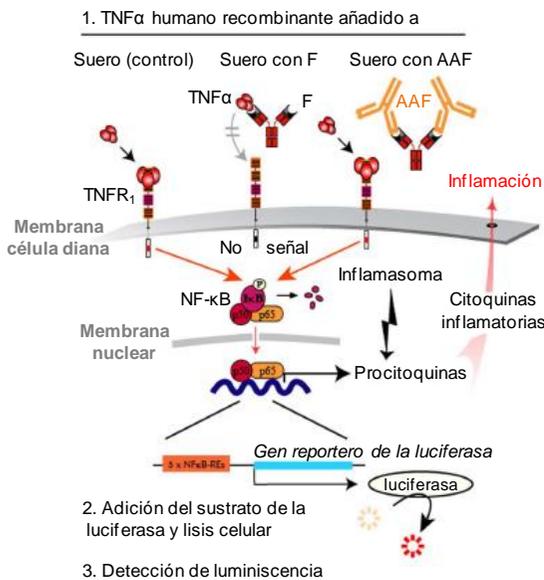
La resonancia de plasmones de superficie (SPR) se basa en la detección, a tiempo real, de los cambios en la luz reflejada como consecuencia de la interacción de antígenos con anticuerpos en un biosensor, eliminando así, la necesidad de un anticuerpo marcado para la detección. Se aplica, sobre todo, a la detección de anticuerpos antifármaco de baja afinidad (Li y cols. 2011) y con ratios de disociación elevados (**figura 1.14**). Este sistema no requiere largas incubaciones, lo que permite obtener resultados en pocos minutos. Su principal desventaja reside en la necesidad de un equipamiento especializado de alto coste, personal altamente cualificado y en la complejidad de la interpretación de los datos.



**Figura 1.14. Determinación de antígenos por SPR.** (A) Los anticuerpos son inmovilizados covalentemente sobre una lámina de oro a través de moléculas de dextrano y la muestra con el antígeno a detectar se aplica en forma de flujo sobre la superficie del sensor uniéndose el antígeno a los anticuerpos inmovilizados. El sensor situado sobre un prisma es irradiado con un haz de luz con un determinado ángulo y reflejado hacia el detector tras la excitación de los electrones libres de la capa de oro, lo que conlleva al fenómeno de resonancia de los plasmones de superficie. Tras la unión del antígeno a la superficie del sensor el índice de refracción local variará afectando a las ondas de los plasmones y provocando un desplazamiento del ángulo de resonancia proporcional a la cantidad de antígeno unido a la superficie del sensor. (B) La constante de asociación se puede determinar por la cinética del cambio de la señal por SPR y la constante de disociación se puede medir lavando la superficie con un tampón sin ligando. El ratio entre ambas proporciona la constante de asociación de equilibrio a través de la cual se obtiene información sobre la energía libre del sistema.

Los bioensayos o ensayos basados en células hacen referencia al uso de células vivas. Son técnicas complejas que conllevan tiempos de ejecución largos, son muy susceptibles a los efectos de la matriz sérica y son difíciles de estandarizar, lo que conlleva una difícil adaptación a los laboratorios de rutina clínica (Gupta y cols. 2007). Sin embargo, estos inconvenientes son subsanados

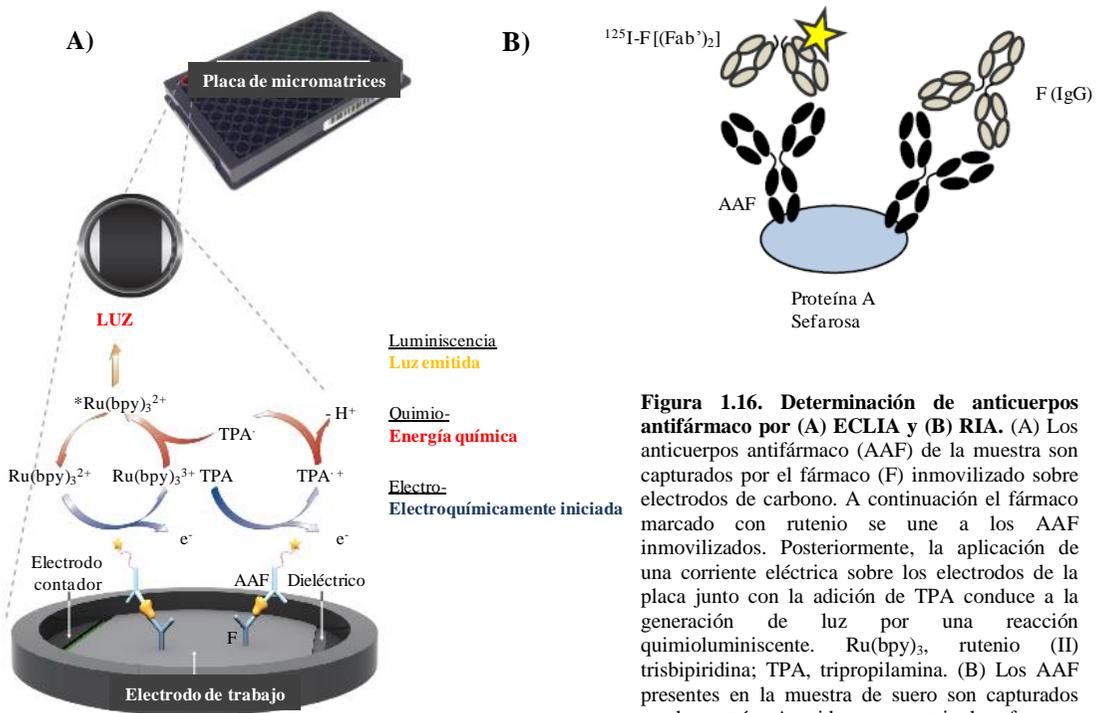
con la aparición del ensayo del gen reportero (RGA, *Reporter-Gene assay*) (Bendtzen 2015), constituyendo uno de los ensayos basados en células mas usado actualmente para la monitorización de terapias con antagonistas del TNF $\alpha$ . En el ensayo del gen reportero se transfectan células con la secuencia codificante del gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el control del promotor del gen cuya expresión se desea estudiar, para determinar los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco indirectamente midiendo la actividad citotóxica del TNF $\alpha$  (Lallemand y cols. 2011) (figura 1.15). La principal ventaja de este ensayo es la determinación simultánea en la misma muestra de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco neutralizantes.



**Figura 1.15. Determinación de anticuerpos antifármaco neutralizantes por RGA.** El TNF $\alpha$  es añadido a las células diana iniciando la señalización intracelular a través del receptor TNFR $_1$  lo que activa el factor nuclear NF- $\kappa$ B que se transloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-Res) en el genoma. A continuación se produce la activación de varios genes entre los que se encuentra el constructo del gen reportero insertado que codifica la enzima luciferasa. Tras la lisis celular y adición de su sustrato, se cuantifica la luz emitida en el proceso catalítico. Cuando el TNF $\alpha$  se preincuba con el suero del/la paciente que contiene fármaco, si este es funcional, neutraliza el efecto del TNF $\alpha$  inhibiéndose la señalización intracelular. Cuando el TNF $\alpha$  se preincuba con el suero del/la paciente que contiene anticuerpos antifármaco neutralizantes y posteriormente se añade a las células, el fármaco no interfiere con la señalización mediada por TNF $\alpha$ , lo que resulta en una señal luminiscente.

Los ensayos de unión se basan en la detección de un antígeno inmovilizado generalmente en una superficie sólida por aplicación de una corriente eléctrica (ECLIA) o utilizando un anticuerpo de detección marcado con un radioisótopo (RIA) o una enzima (ELISA). La reacción ECLIA tiene lugar en la superficie de electrodos de carbono donde se forman los inmunocomplejos con el antígeno a detectar y un anticuerpo de detección marcado con rutenio. Al aplicar una corriente eléctrica y por adición de un reactivo sensible al sistema, la luz generada es directamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Lo y cols. 2011; Bloem y cols. 2015) (figura 1.16.a). El RIA puede llevarse a cabo en fase sólida por medio de una columna de sefarosa con proteína A inmovilizada

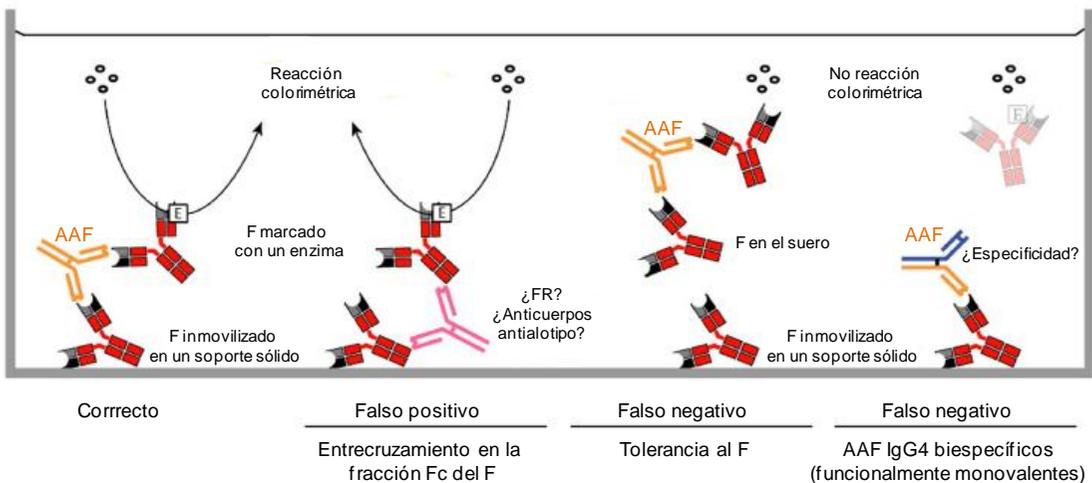
(Wolbink *et al.*, 2006) o en fase líquida (Bendtzen *et al.*, 2006), siendo esta última la mejor manera de reflejar las condiciones *in vivo* (Bendtzen 2015). El fundamento de la técnica se basa en la cuantificación de la radiactividad generada en la detección del antígeno por un anticuerpo marcado con un radioisótopo (**figura 1.16.b**).



**Figura 1.16. Determinación de anticuerpos antifármaco por (A) ECLIA y (B) RIA.** (A) Los anticuerpos antifármaco (AAF) de la muestra son capturados por el fármaco (F) inmovilizado sobre electrodos de carbono. A continuación el fármaco marcado con rutenio se une a los AAF inmovilizados. Posteriormente, la aplicación de una corriente eléctrica sobre los electrodos de la placa junto con la adición de TPA conduce a la generación de luz por una reacción quimioluminiscente. Ru(bpy)<sub>3</sub>, rutenio (II) trisbipiridina; TPA, tripropilamina. (B) Los AAF presentes en la muestra de suero son capturados por la proteína A unida a una matriz de sefrosa y son detectados por el F en formato (Fab')<sub>2</sub> marcado con el radioisótopo <sup>125</sup>I. Si los AAF estaban previamente complejados con el F, no son detectados.

En el ELISA la formación de los inmunocomplejos ocurre sobre una superficie plástica. Los ELISA habitualmente empleados en los laboratorios de rutina clínica son el ELISA sándwich y el ELISA de captura para la determinación de los niveles de fármaco y el ELISA puente para la determinación de niveles de anticuerpos antifármaco (**figura 3.9**). La técnica ELISA presenta un reducido rango dinámico, por lo que es necesario el empleo de diluciones de muestra y el hecho de que el analito deba unirse a un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido conlleva problemas si se produce agregación de estos anticuerpos, ya que se podría producir enmascaramiento del epítipo o formación de neoepítipos (Bendtzen 2012). En cuanto al ELISA puente, es sensible a la presencia de

fármaco y no permite la detección de inmunocomplejos fármaco-anticuerpo originando falsos negativos (Bendtzen 2013; Hart y cols. 2011), por lo que hay que emplear técnicas de disociación ácida para la determinación de los anticuerpos antifármaco (Patton y cols. 2005), no pueden detectarse los anticuerpos antifármaco con isotipo IgG4 debido a su naturaleza biespecífica y es susceptible a interferencias por la presencia del FR, anticuerpos antialotipo y/o anticuerpos de baja afinidad como los heterófilos (Aarden y cols. 2008) (**figura 1.17**). Sin embargo, ya que no requiere equipamientos especiales de alto coste ni personal altamente cualificado, es fácilmente automatizable y permite analizar un gran número de muestras por tanda. El ELISA es la técnica más empleada en los laboratorios de rutina clínica para la determinación de fármacos biológicos y de anticuerpos antifármaco (Bendtzen 2015).

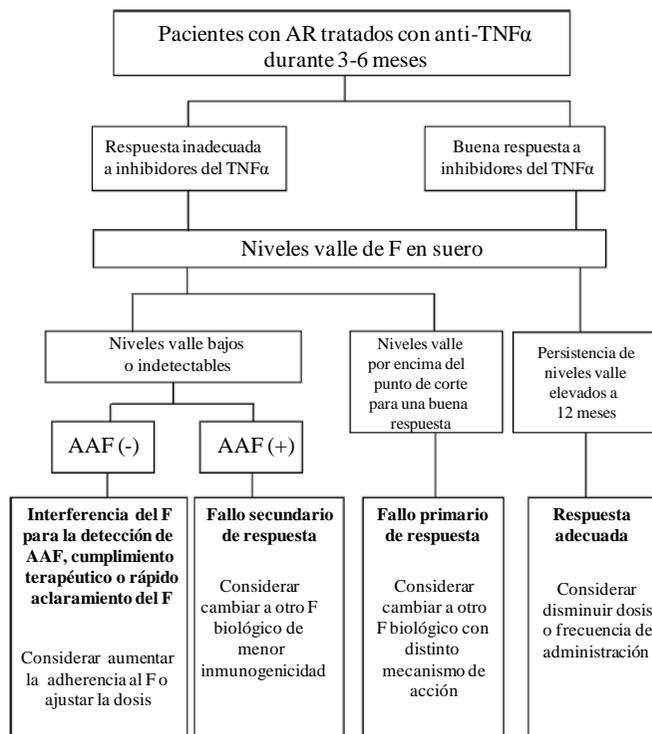


**Figura 1.17. Determinación de anticuerpos antifármaco por ELISA puente.** El ELISA puente se basa en el carácter bivalente de los anticuerpos antifármaco (AAF) de isotipo IgG y la multivalencia de los IgA e IgM y su habilidad para puentear el fármaco (F) adsorbido en un soporte sólido con el F marcado con un enzima (*izquierda*). Los anticuerpos IgG4 son normalmente biespecíficos porque la mitad de la molécula sufre un intercambio tras su síntesis, no siendo detectados por ELISA puente (*derecha*).

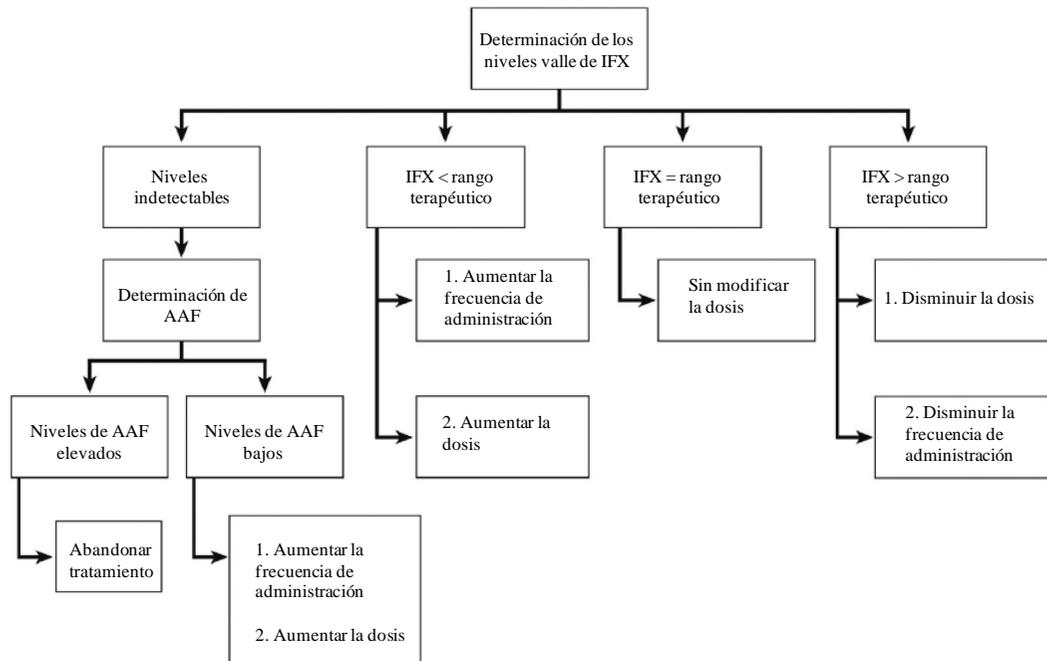
## 1.6. IMPACTO ECONÓMICO DE LA MONITORIZACIÓN DE TERAPIAS BIOLÓGICAS

Los fármacos biológicos son más costosos en términos económicos para el Sistema Sanitario que los tratamientos tradicionales. Así por ejemplo, según el estudio PRAXIS el coste de las terapias biológicas por paciente con AR asciende hasta 15.000 €/año (Rubio-Terres y cols. 2007). El análisis

del impacto económico de las terapias biológicas es de suma importancia y hacer un uso más racional de las mismas supondría reducir los costes derivados de tratamientos ineficaces y mejorar así la calidad de vida de los/as pacientes. Se ha demostrado que la determinación de los niveles de fármacos biológicos y de anticuerpos antifármaco en pacientes con enfermedades reumáticas y PsO consigue un óptimo ajuste de la dosis y/o de la frecuencia de administración en función de las necesidades del/la paciente lo que contribuye a una medicina personalizada y más eficaz (González-Fernández y cols. 2015). Un reciente estudio llevado a cabo en el Hospital Universitario de La Paz (Madrid), concluye que el ajuste de dosis de fármaco biológico en pacientes con AR y EA con DAS28 < 3,2 y BASDAI < 4, reduce hasta un 20% el fármaco administrado al año a estos/as pacientes lo que provoca a su vez una reducción en los costes sin alterar la respuesta al tratamiento y una mejora de la calidad de vida de los/as pacientes (Pascual-Salcedo y cols. 2015; Krieckaert y cols. 2012; Saraux y cols. 2010; Scott y cols. 2016; Krieckaert y cols. 2015).



**Figura 1.18.** Algoritmo de estrategia terapéutica basado en los niveles valle de fármaco y de anticuerpos antifármaco en suero de pacientes con AR con diferente respuesta clínica a inhibidores del TNF $\alpha$ . El valor de concentración valle correspondiente al punto de corte para una buena respuesta clínica en base a los criterios EULAR se determinó por análisis de la curva ROC.



**Figura 1.19.** Algoritmo de estrategia terapéutica basado en los niveles valle de IFX y de anticuerpos anti-IFX en suero de pacientes con AR con diferente respuesta clínica. El rango terapéutico se estableció en 3-7 µg/ml. AAF, anticuerpos antifármaco.

La monitorización de los niveles de fármacos biológicos y anticuerpos antifármaco ha permitido establecer algoritmos (**figuras 1.18-1.19**) para el uso terapéutico de estos tratamientos, que permiten realizar un uso más racional de los mismos, permitiendo modificar la dosis y/o la frecuencia de administración e incluso cambiar a otro fármaco biológico con el mismo o diferente mecanismo de acción (Chen *y cols.* 2015; Scott *y cols.* 2016; Vande Castele *y cols.* 2015). La implementación en la práctica clínica habitual de estos algoritmos para la monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de terapias biológicas mejoraría la toma de decisiones terapéuticas aunque no son de obligado cumplimiento (Laine *y cols.* 2016).



# **OBJETIVOS**

---



## 2. OBJETIVOS

La terapia con fármacos biológicos ha supuesto un gran avance en el tratamiento de las enfermedades sistémicas severas inflamatorias de naturaleza autoinmune como la AR, las EspA, la EC, la CU o la PsO. Los primeros fármacos biológicos que se utilizaron fueron AcM y proteínas de fusión antagonistas del TNF $\alpha$ , citoquina con un papel crítico en la patogénesis de estas enfermedades ya que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria. A pesar del beneficio que estos fármacos biológicos han supuesto, la respuesta individual al tratamiento varía significativamente y en algunos casos el efecto inmunosupresor de estos tratamientos provoca importantes complicaciones secundarias. Por otro lado, aunque las proteínas que constituyen el principio activo de estos fármacos son generalmente bien toleradas, presentan un importante potencial inmunogénico que provoca una respuesta inmune indeseada en los/as pacientes generando anticuerpos antifármaco. Muchos/as pacientes tratados/as con fármacos biológicos anti-TNF $\alpha$ , como infliximab (IFX) y adalimumab (ADL), generan anticuerpos antifármaco, lo cual está directamente relacionado con una menor concentración del fármaco en sangre y un empeoramiento de la enfermedad (Llinares-Tello y cols. 2012). En la mayoría de estos casos se pierde la respuesta clínica total o parcialmente, ya que los anticuerpos antifármaco neutralizan el fármaco circulante. Los resultados de estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación con antagonistas del TNF $\alpha$  muestran una correlación significativa entre los niveles de fármaco y la actividad de la enfermedad y evidencian que la aparición de anticuerpos antifármaco es responsable de bajos o nulos niveles de fármaco en sangre y explican la pérdida de eficacia del tratamiento en una población de pacientes determinada (Pascual-Salcedo y cols. 2011; Plasencia y cols. 2011). Además, estudios prospectivos observacionales posteriores demuestran que la implementación de medidas de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco en la práctica clínica habitual mejora el tratamiento de los pacientes y es coste-eficaz (Krieckaert y cols. 2012).

La presente Tesis Doctoral continúa con esta línea de investigación y propone demostrar que los resultados derivados de los estudios de monitorización de terapias basadas en antagonistas del TNF $\alpha$  no solo son reproducibles en otros fármacos biológicos con la misma diana terapéutica, sino que también son extrapolables a nuevos fármacos biológicos con dianas terapéuticas distintas, aparecidos más recientemente con el fin de solucionar la pérdida de eficacia de los primeros.

Con el fin de desarrollar herramientas con potencial diagnóstico y pronóstico de la respuesta a los tratamientos con GLM (Simponi<sup>®</sup>) y TCZ (Actemra<sup>®</sup>) en pacientes con EspA y AR respectivamente, y con UTK (Stelara<sup>®</sup>) en pacientes con PsO, se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- 1. Desarrollar y optimizar inmunoensayos específicos para la monitorización de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de GLM, TCZ y UTK.** Se utilizaron AcM y AcP antifármaco específicos para desarrollar inmunoensayos ELISA que permitieran detectar, de forma sensible y específica, y cuantificar los niveles de fármaco (biodisponibilidad) y de anticuerpos antifármaco (inmunogenicidad) en suero.
- 2. Validar las prestaciones técnicas de los inmunoensayos siguiendo guías internacionales aplicables a dispositivos sanitarios de diagnóstico *in vitro*.** Se verificaron las características intrínsecas de la metodología de los inmunoensayos en cumplimiento con las especificaciones recomendadas por las guías reguladoras del CLSI y de la FDA.
- 3. Evaluar la viabilidad clínica de los inmunoensayos.** Se analizaron los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco para establecer la correlación y el grado de acuerdo entre los inmunoensayos desarrollados y otros métodos disponibles para la determinación de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos.
- 4. Analizar la correlación existente entre los niveles de fármaco, los niveles de anticuerpos antifármaco y la respuesta clínica al tratamiento.** Se correlacionaron los parámetros analíticos derivados de la monitorización de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de los fármacos biológicos y los índices de actividad de la enfermedad.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Reactivos y material accesorio

A continuación se presentan los reactivos y el material accesorio empleados en el proyecto de Tesis Doctoral ordenados por casas comerciales y orden alfabético:

- **Abd Serotec, a Bio-Rad company (Alemania)**
  - AcM anti-GLM
  - AcM anti-TCZ
  - AcM anti-TNF $\alpha$
  - AcM anti-UTK
- **Agfa (Bélgica)**
  - Casette Curix (35 x 43 cm)
  - Fijador radiográfico G354
  - Revelador/regenerador radiográfico G150
- **Amersham Pharmacia Biotech (Reino Unido)**
  - ECL<sup>TM</sup>
  - Película fotográfica Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>
- **Azurebio S.L. (España)**
  - Estabilizante de proteínas inmovilizadas en placas de 96 pocillos, StabDry
- **Bio-Rad (EEUU)**
  - 30% acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1)
  - Azul brillante de Coomassie
  - Estándares proteicos preteñidos de bajo y alto peso molecular para SDS-PAGE
  - Persulfato amónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (PSA)
  - Tampón de electroforesis Tris-HCl 25 mM:Glicina 192 mM:Dodecilsulfato sódico 0,1%, pH 8,3 (TGS)
  - N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)

- **BolsaPlast S.L. (España)**
  - Bolsa plana de aluminio (13 x 22 cm)
- **Fujifilm (España)**
  - Casette EC-AWU (18 x 24 cm)
- **Fitzgerald (EEUU)**
  - Tampón de alto rendimiento para inmunoensayos ELISA (HPE 5x)
- **GE Healthcare (España)**
  - Kit de reactivos para tinción de proteínas con plata (# 17-1150-01)
- **GenWay Biotech, Inc (EEUU)**
  - Factor reumatoide
- **Hospital Galdakao (España)**
  - Adalimumab (ADL) 50 mg/ml (Humira<sup>®</sup>)
  - Certolizumab Pegol (CZP) 200 mg/ml (Cimzia<sup>®</sup>)
  - Etanercept (ETN) 50 mg/ml (Enbrel<sup>®</sup>)
  - Infliximab (IFX) 10 mg/ml (Remicade<sup>®</sup>)
  - Rituximab (RTX) 10 mg/ml (Rituxan<sup>®</sup>)
- **Hospital Univ. La Paz (España)**
  - Gammaglobulina
- **Macherey-Nagel (Alemania)**
  - Tiras reactivas de pH, PEHANON pH 1 - 12
- **Merck (Alemania)**
  - 2-Mercaptoetanol
- **Millipore (EEUU)**
  - Membranas de transferencia Immobilon<sup>TM</sup>-P (0,45 µm, PVDF)
- **Nunc (España)**
  - Placas de poliestireno transparentes de 96 pocillos rompibles (12 tiras x 8 pocillos) de alta adsorción de proteínas
- **Omni Comercial S.A. (España)**
  - Silica Gel Minipax

• **Panreac (España)**

- 3',3'',5',5''-tetrabromofenol sulfoneftaleína, sal sódica para electroforesis (azul de bromofenol)
- Azida sódica

• **Peptotech EC LTD. (Reino Unido)**

- TNF $\alpha$  humano recombinante

• **Pierce Protein Biology (EEUU)**

- Columnas para diálisis 3,5K MWCO (0,1 ml y 2 ml)
- Kit para el marcaje de proteínas con HRP (#31489)
- Kit para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad (#44894)
- Kit BCA y micro BCA para la determinación de proteínas totales (#23227, #23235)
- Reactivo comercial de azul de Coomassie para tinción de proteínas en gel, Gelcode® Blue Stain Reagent
- Resina de agarosa de acoplamiento para la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad
- Tampón de glicina para la elución de inmunoglobulinas, pH 2,8

• **Progenika Inc. (EEUU)**

- Golimumab (GLM) 100 mg/ml (Simponi®)
- Tocilizumab (TCZ) 20 mg/ml (Actemra®)
- Ustekinumab (UTK) 90 mg/ml (Stelara®)

• **Proquinorte S.A. (España)**

- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)

• **Proteogenix (Francia)**

- Sueros inmunes de conejo anti-ADL, anti-ETN, anti-GLM, anti-IFX, anti-RTX, anti-TCZ y anti-UTK

• **Stereospecific Detection Technologies (Alemania)**

- Bloqueante/diluyente de conjugados de estreptavidina-HRP basado en caseína (UCDB)
- Estabilizante de conjugados de antígenos/anticuerpos-HRP (#AA-1)
- Estabilizante de conjugados de estreptavidina-HRP (#SA1)

- Tampón de bloqueo y estabilización basado en caseína (DBS-C)
- **Sigma-Aldrich (Alemania)**
  - 1-butanol (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O)
  - 2-propanol anhidro (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)
  - Ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)
  - Bilirrubina
  - Dimetilformamida (DMF)
  - Dodecilsulfato sódico (SDS)
  - Glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)
  - Hemoglobina humana
  - Hidróxido sódico (NaOH)
  - Metanol anhidro (CH<sub>4</sub>O)
  - Monohidrogenofosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
  - Suero humano control (NHS)
  - Tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6
  - Tampón fosfato salino (PBS) 1X, pH 7,2
  - Triglicéridos
  - Trizma base
  - 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)
  - Trietilamina (TEA)
  - Tubos de microcentrifuga con baja afinidad por proteínas
  - Tween 20
- **Theradiag (Francia)**
  - Kit para la determinación de niveles de TCZ y de anticuerpos anti-TCZ (LISA-TRACKER Duo TCZ, LTT005)
- **Whatman (Reino Unido)**
  - Papeles de transferencia 3MM CHR

### 3.1.2. Equipamiento

A continuación se enumera el equipamiento empleado en el proyecto de Tesis Doctoral por orden alfabético:

- Agitador magnético, Selecta Agimatic S
- Agitador orbital y horizontal, Selecta Rota-Bit
- Agitador para tubos de ensayo, Heidolph reax top
- Agitador rotatorio, Selecta Móvil-Rod
- Agitador tipo noria SBS MRPI-12
- Balanza analítica, Metler Toledo AB104-S
- Balanza analítica, Metler Toledo XP 205
- Cabina de extracción de gases, Waldner
- Cámara de electrotransferencia semiseca Trans-Blot SD, Bio-Rad
- Centrífuga, Eppendorf 5415 VWR
- Centrífuga refrigerada, Eppendorf 5810R
- Escáner de imágenes, Amersham
- Estufa bacteriológica y de cultivo, Selecta Incudigit 2001248
- Estufa de vacío, Fisher Scientific VT6130M
- Equipo de electroforesis vertical, Bio-Rad Mini-Protean® II
- Fuente de alimentación para electroforesis, Bio-Rad POWER PAC 200
- Lavador de placas ELISA, Biotek 405LSRS
- Lavador de placas ELISA, DAS C2
- Lector de placas ELISA, Biotek Synergy™ HT
- Molecular Imager FX, Bio-Rad
- pHmetro, Crison GLP-21
- Secador de geles, Bio-Rad 538
- Selladora térmica, Comecta
- Software Quantity One, Bio-Rad
- Termobloque seco, Grant Instruments tipo BAA1

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Poblaciones de estudio

Se estudiaron los sueros de pacientes del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Paz (HULP, Madrid, España) para los estudios de GLM (n = 57) y TCZ (n = 34), y pacientes del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Basurto (HUB, Bilbao, España) para el estudio de UTK (n = 37). Los/as pacientes fueron hombres y/o mujeres adultos/as diagnosticados/as de EspA en tratamiento con GLM (50 mg), pacientes diagnosticados/as de AR en tratamiento con TCZ (8 mg/kg) y pacientes diagnosticados/as de PsO en tratamiento con UTK (45 mg).

Los estudios de GLM y TCZ fueron evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del HULP y por el Comité Ético de la Comunidad Autónoma de Madrid y el estudio de UTK fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación del HUB y por el Comité Ético de Euskadi. Asimismo, todos ellos cumplían la normativa ética internacional, en concreto la Declaración de Helsinki en su última versión referente a las normas de Buenas Prácticas Clínicas en los apartados en los que compete y la normativa legal aplicable sobre investigaciones clínicas con productos sanitarios para diagnóstico *in vitro* (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

- Tener más de 18 años.
- Los/as pacientes del estudio de GLM debían ser diagnosticados/as de EspA cumpliendo con los criterios de Nueva York modificados y los criterios de clasificación y diagnóstico del grupo ASAS (*Ankylosing Spondylitis Assessment Study*) y estar en tratamiento activo con GLM. Los/as pacientes del estudio de TCZ debían ser diagnosticados/as de AR cumpliendo con los criterios conjuntos de la ACR y de la EULAR y estar en tratamiento activo con TCZ. Los/as pacientes del estudio de UTK debían ser diagnosticados/as de PsO por un especialista en dermatología y estar en tratamiento activo con UTK.
- Los/as pacientes podían estar en tratamiento concomitante con uno o más medicamentos AINES además de con GLM, TCZ o UTK.

- Los/as pacientes podían haber tenido un tratamiento biológico previo con IFX, ADL, ETN, abatacept o RTX. Estos 2 últimos fármacos solo en el caso de los/as pacientes tratados/as con GLM y TCZ.
- Todos/as los/as pacientes incluidos/as en los estudios debían leer y firmar el consentimiento informado de manera que la donación de la muestra para participar en el estudio fue, en todos los casos, consciente y voluntaria (**anexo 1**).

Para la descripción de la población se recogió información de las siguientes variables manteniendo en todo momento la confidencialidad y el anonimato de los/as pacientes:

- **Variables de identificación**

- Número de historia.
- Fecha de obtención de las muestras.

- **Variables demográficas**

- Fecha de nacimiento/edad.
- Sexo.

- **Variables clínicas**

- Tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad.

- **Variables de tratamiento**

- Dosis de GLM, TCZ o UTK.
- Duración de los tratamientos con GLM, TCZ o UTK.
- Fecha de la última dosis de GLM, TCZ o UTK.
- Tratamientos concomitantes.
- Otros tratamientos biológicos previos y duración de los mismos.

- **Variables de respuesta al tratamiento**

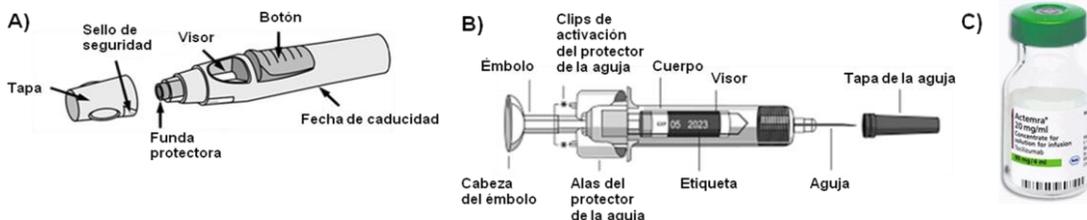
- Índice de Actividad de la EA (ASDAS, *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score*) al inicio del tratamiento con GLM (basal) y en cada visita posterior.
- Índice de Actividad de la AR (DAS28, *Disease Activity Score 28*) al inicio del tratamiento con TCZ (basal) y en cada visita posterior.
- Índice de Severidad y Área de PsO (PASI, *Psoriasis Area Severity Index*) al inicio del tratamiento de UTK (basal) y en cada visita posterior.

### 3.2.2. Obtención de las muestras de suero

Las muestras utilizadas en el estudio fueron sueros obtenidos a partir de sangre total por venopunción en el brazo. La extracción de sangre coincidió con la evaluación clínica para poder disponer del dato de respuesta clínica y se realizó en niveles valle de fármaco, es decir, antes de la administración del fármaco. En tratamientos intravenosos (TCZ) la muestra se tomó el día de la infusión en el Hospital de Día y momentos antes de la misma, y en tratamientos subcutáneos (GLM y UTK) en las 24-72 horas previas a la inyección. Aprovechando la extracción de sangre rutinaria, se obtuvo un tubo adicional para la extracción del suero en un tubo sin anticoagulantes, aditivos ni geles. Se dejó coagular la sangre al menos 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 4.000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C y se recogieron aproximadamente 4 ml del suero sobrenadante. Las muestras fueron congeladas a -20 °C y enviadas al laboratorio de Progenika Biopharma, a Grifols Company, donde se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

### 3.2.3. Preparación de los fármacos biológicos

Los fármacos biológicos GLM (100 mg/ml), TCZ (20 mg/ml) y UTK (90 mg/ml) fueron proporcionados por Progenika Inc. (EEUU) en su formato comercial. Los fármacos con vía de administración subcutánea, GLM y UTK, tenían un formato de pluma precargada (**figura 3.1.A**) y jeringa precargada (**figura 3.1.B**) respectivamente, por lo que para trabajar con ellos fueron transvasados a tubos con baja afinidad por proteínas. TCZ no fue transvasado por estar contenido en un vial (**figura 3.1.C**).

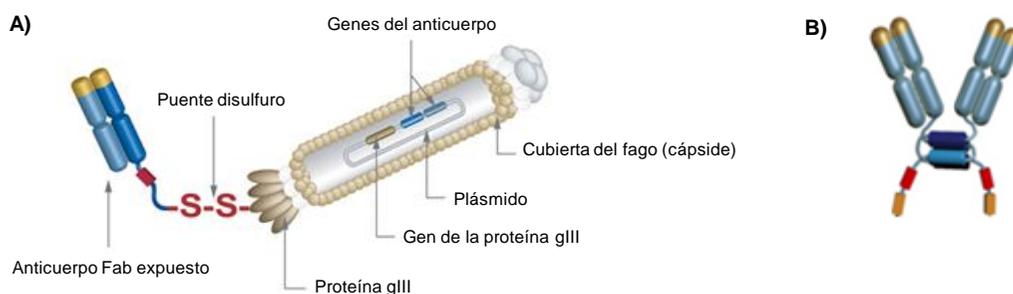


**Figura 3.1. Tipología de presentación de los fármacos.** Los fármacos con vía de administración subcutánea presentan un formato de (A) pluma precargada para GLM y de (B) jeringa precargada para UTK. (C) TCZ se administra como infusión intravenosa del contenido de un vial para inyectables.

Para asegurar una buena calidad de los fármacos y evitar una posible contaminación por microorganismos, a todos ellos se les añadió azida sódica al 5% como conservante con actividad biocida. Los fármacos fueron alicuotados y almacenados a 4 °C.

### 3.2.4. Obtención de AcM antifármaco

Los AcM antifármaco específicos se obtuvieron a través de la empresa AbD Serotec, a Bio-Rad Company (Alemania), por medio de su tecnología de anticuerpos *HuCAL*<sup>®</sup> (*Human Combinatorial Antibody Library*), basada en el método de expresión en fagos (Smith 1985). Esta tecnología de generación de anticuerpos *in vitro* se basa en la utilización de fagos para producir anticuerpos humanos de alta especificidad.



**Figura 3.2. Representación gráfica de la tecnología de expresión en fagos (*HuCAL*<sup>®</sup>).** (A) El fago contiene los genes recombinantes del repertorio de anticuerpos humanos insertados en la región génica codificante de una proteína de la cubierta superficial (gIII) y expresa el anticuerpo sobre su superficie para poder ser reconocido por el antígeno diana. (B) AcM antifármaco en formato bivalente.

Los genes de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos se recombinan con los genes de las regiones de especificidad antigénica (epítomos) y se expresan en fagos generándose más de 45 billones de anticuerpos en forma monovalente (Fab) con distintas especificidades y mimetizando el repertorio de anticuerpos humanos (**figura 3.2.A**). La selección de los anticuerpos específicos se realiza enfrentándolos contra el antígeno en cuestión y los clones positivos son seleccionados, expresados y purificados en *Escherichia. coli*. Finalmente, los fragmentos Fab son transformados en

formato bivalente, F(ab')<sub>2</sub>, unidos por un dominio hélice-giro-hélice (dHLX) con una cola de fusión de 6 residuos de histidina (6xHis) (**figura 3.2.B**).

### **3.2.5. Dializado de los fármacos y de los AcM antifármaco**

El proceso de diálisis se realizó antes de la conjugación a HRP para eliminar posibles interferentes como la azida sódica y otros excipientes con aminas primarias presentes en los fármacos y para realizar el intercambio de tampones en el caso de que el proceso de conjugación a HRP, tanto de los fármacos como de los AcM, se debiera realizar a pH 9,6, ya que inicialmente se encontraban a pH 7,2. La diálisis se llevó a cabo en columnas con una membrana de tamaño nominal de poro de 3,5 KDa y el protocolo de diálisis fue distinto en función de la columna:

- **Dializado en columnas de 10 - 100 µl:**

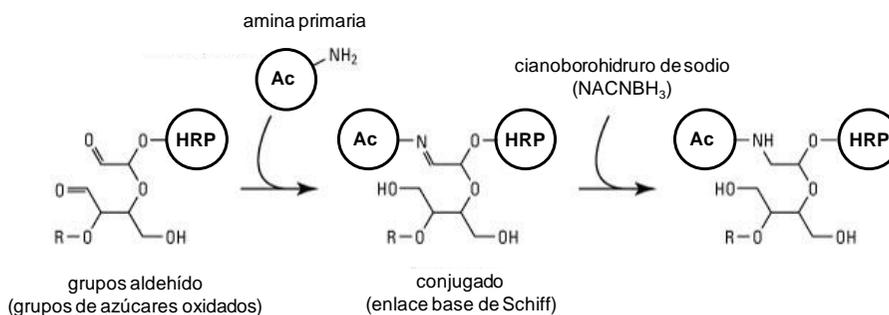
Inicialmente las columnas se sometieron a un pretratamiento por inmersión de la membrana en agua destilada durante 15 min a temperatura ambiente para eliminar el exceso de glicerol. Se añadieron 50 µg del anticuerpo a dializar, la columna se tapó y se sumergió la membrana en 1 l de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) a pH 7,2 o tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6, en función del pH deseado en la disolución final, manteniéndolo en agitación suave durante 30 min a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se repitió el mismo proceso durante otros 30 min con nuevo tampón de diálisis.

- **Dializado en columnas de 0,5 - 2 ml:**

La preparación inicial de la columna consistió en la adición de 2 ml de agua destilada al interior para comprobar la integridad de la membrana, tras lo cual se aclaró con 4 ml del tampón de diálisis (PBS a pH 7,2 o tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6, en función del pH deseado en la disolución final). Se añadieron 0,5 mg del anticuerpo a dializar y la membrana se sumergió en 2 l de tampón de diálisis manteniéndolo en agitación suave durante 6 h a 4 °C.

### 3.2.6. Marcaje de los fármacos y de los AcM con peroxidasa de rábano picante

Los fármacos y los AcM antifármaco seleccionados, de entre todos los AcM generados, para ser empleados como sistema de detección en los inmunoensayos fueron conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP, *Horseradish Peroxidase*) mediante una reacción de aminación reductora con un kit comercial de Pierce (EEUU). El fundamento del proceso se basa en la reacción entre los grupos aldehído de los carbohidratos oxidados de la HRP y las aminas primarias de los anticuerpos (**figura 3.4**). La HRP pretratada con peryodato presenta grupos aldehídos capaces de reaccionar espontáneamente con los grupos amina del anticuerpo originando un producto intermedio en forma de base de Schiff. Este producto intermedio reacciona a su vez con cianoborohidruro sódico ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) para generar un compuesto más estable.



**Figura 3.4.** Reacción de aminación reductora entre un anticuerpo (Ac) y HRP.

La reacción de aminación entre el anticuerpo y la HRP puede tener lugar a pH neutro o básico. Para estudiar el comportamiento del conjugado a distintos pH y a distintas relaciones molares anticuerpo:HRP, se conjugaron los anticuerpos a pH 7,2 y a pH 9,6 y en relaciones molares 1:2, 1:4, 1:6 y 1:8. Tras la diálisis del anticuerpo a marcar se reconstituyó el liófilo de HRP en agua destilada a concentración final de 10 mg/ml. La secuencia de reacción entre el anticuerpo y la HRP fue distinta en función del pH. A pH 7,2 tras añadir la HRP al anticuerpo, se añadió seguidamente un volumen de  $\text{NaCNBH}_3$  10 veces inferior al añadido de HRP y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. A pH 9,6 tras añadir la HRP al anticuerpo se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se añadió el  $\text{NaCNBH}_3$  en la misma proporción que a pH 7,2 y se incubó durante 15

min a temperatura ambiente. Una vez finalizadas las incubaciones con el  $\text{NaCNBH}_3$ , se añadió el tampón de apantallamiento en un volumen doble al de  $\text{NaCNBH}_3$ . Los conjugados se almacenaron a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.7. Obtención de AcP antifármaco**

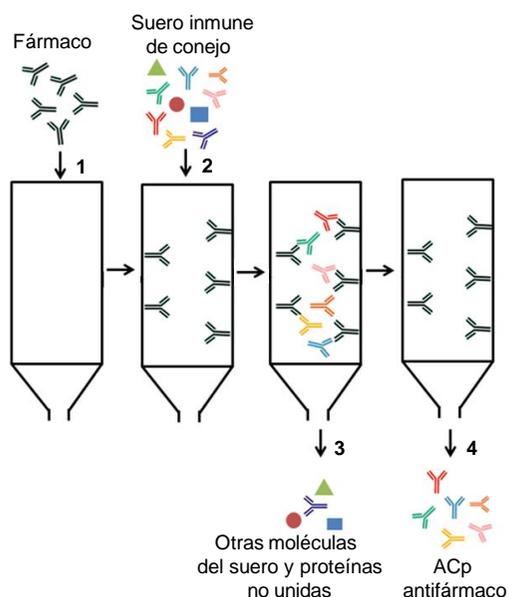
Los AcP antifármaco específicos que se usaron como controles positivos para la construcción de las curvas de calibrado en los inmunoensayos para la determinación de la inmunogenicidad de los fármacos, se obtuvieron por técnicas de inmunización activa en animales llevadas a cabo por la empresa Proteogenix (Francia). El protocolo estándar consistió en la administración intradérmica del fármaco en un conejo *New Zeland* previa obtención de una muestra de suero preinmune. El fármaco se inyectó junto con un adyuvante para una mayor estimulación de la respuesta inmune. Durante un período de 90 días se administraron 4 dosis de recuerdo por vía subcutánea en los días 14, 35, 49 y 56 tras la primera dosis. El día 49 se testó una muestra de sangrado por ELISA estándar con el fin de disponer de una aproximación del título de anticuerpos y el día 90 se procedió a la exanguinación del animal y testado del sangrado final. La cuantificación final de los AcP en el suero inmune, reportada en unidades arbitrarias (UA), se determinó con la colaboración del Servicio de Análisis Biológicos de Sanquin (Países Bajos).

### **3.2.8. Purificación de los AcP antifármaco por cromatografía de afinidad**

Con el objetivo de poder comparar los resultados de los niveles de anticuerpos antifármaco con los obtenidos con otras tecnologías, se realizó una purificación de los AcP del suero inmune de conejo por cromatografía de afinidad con un kit comercial de Pierce (EEUU).

El fundamento de la técnica se basó en la inmovilización del fármaco por unión covalente de las aminas primarias de las cadenas laterales de residuos de lisina y regiones aminoterminales de las moléculas de fármaco con los grupos aldehído de la resina de agarosa (4%) del interior de la columna cromatográfica. Al hacer pasar el suero inmune por la columna, los AcP antifármaco interaccionaron

específicamente con el fármaco inmovilizado quedando retenidos en el interior. Por último los ACp se eluyeron recogiendo sucesivas fracciones (**figura 3.5**).



**Figura 3.5. Representación gráfica de la purificación de ACp antifármaco del suero inmune de conejo.** (1) Inmovilización del fármaco en la resina del interior de la columna. (2) Interacción específica antígeno-anticuerpo. (3) Elución de otras moléculas del suero y proteínas no unidas. (4) Elución de los ACp antifármaco.

Brevemente, la columna se equilibró lavándola 2 veces con 2 ml de tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6 y a continuación se añadieron 2 ml de la disolución de fármaco (1 mg/ml en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6). El sistema se incubó a temperatura ambiente en un agitador tipo noria durante 4 h. A continuación la columna se centrifugó a 1000  $xg$  durante 1 min a temperatura ambiente recogiendo en el eluato la fracción no unida de fármaco, con la que se calculó su eficiencia de acoplamiento. La columna se lavó 2 veces con 2 ml de PBS a pH 7,2 y se añadieron 2 ml de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  diluido en PBS (1X) a pH 7,2 (1:50) y se incubó toda la noche en un agitador tipo noria a 4 °C. Al día siguiente, la columna se centrifugó a 1000  $xg$ , se lavó 2 veces con 2 ml de tampón de apantallamiento, se añadieron 2 ml de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  diluido en tampón de apantallamiento (1:50) y se incubó durante 30 min en un agitador tipo noria a temperatura ambiente. Seguidamente, tras centrifugar la columna a 1000  $xg$  durante 1 min y realizar 5 lavados con 2 ml de PBS (1X), se

añadieron 1,5 ml de una dilución del suero inmune (1:2) y se incubó durante 1 h en un agitador tipo noria a temperatura ambiente. Posteriormente la columna se centrifugó a 1000  $\times$ g durante 1 min recogiendo en el eluato la fracción no unida de AcP, con la que se calculó su eficiencia de unión al fármaco. A continuación, la columna se lavó 5 veces con 2 ml de PBS (1X) a pH 7,2 para eliminar los restos de reactivos y los AcP se eluyeron con 2 ml de tampón glicina a pH 2,8. El eluato se recogió en un tubo de baja afinidad por proteínas con 100  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1 M a pH 8,0 como neutralizante del pH. Se realizó el mismo procedimiento de elución hasta recoger 4 fracciones independientes.

### 3.2.9. Determinación de la concentración de proteínas totales por el método del BCA

La concentración de proteínas totales se determinó para verificar la concentración origen de los fármacos y para cuantificar los AcP purificados del suero inmune de conejo. La cuantificación proteica se realizó con el kit BCA comercial de Pierce (EEUU) y con otro similar pero en versión para muestras diluidas (kit micro BCA), ambos basados en la reacción de Biuret pero con distintas condiciones de análisis (**tabla 3.1**).

**Tabla 3.1. Condiciones para la determinación de la concentración de proteínas totales por el método del BCA.** Las condiciones del proceso son distintas en función del volumen de muestra disponible. Para muestras concentradas se utilizó el kit BCA y para muestras diluidas el kit micro BCA. (Reactivo A: ácido bicinconfínico en tampón alcalino carbonato-bicarbonato-tartrato; reactivo B: sulfato de cobre (II) al 4%; reactivo MA: tampón alcalino carbonato-tartrato; reactivo MB: ácido bicinconfínico; reactivo MC: sulfato de cobre (II) al 4%).

	<b>BCA</b>	<b>Micro BCA</b>
<b>Proporción de reactivos de trabajo</b>	50A:1B	25MA:24MB:1MC
<b>Volumen de muestra</b>	25 $\mu$ l	150 $\mu$ l
<b>Volumen de la disolución de trabajo</b>	200 $\mu$ l	150 $\mu$ l
<b>Temperatura de reacción</b>	37 °C	37 °C
<b>Tiempo de reacción</b>	30 min	2 h

Este análisis utiliza como reactivo principal una formulación del ácido bicinconínico (BCA) compatible con detergentes y se basa en el principio de que las proteínas presentes en la muestra reducen los iones  $\text{Cu}^{2+}$  a iones  $\text{Cu}^+$  en condiciones alcalinas. Los iones  $\text{Cu}^+$  reaccionan con 2 moléculas de BCA, de color verdoso, para formar un complejo de color morado que presenta el máximo de absorbancia a 562 nm. La absorbancia del complejo es proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra en el rango de 20 - 2000  $\mu\text{g/ml}$  y en el rango de 2 - 40  $\mu\text{g/ml}$  en la versión para muestras diluidas. Se utilizó gammaglobulina bovina (BGG) como patrón.

### **3.2.10. Análisis de la pureza de proteínas separadas por SDS-PAGE**

Las proteínas que formaban parte de los inmunoensayos desarrollados para la determinación de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de GLM, TCZ y UTK así como los AcP purificados se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para elaborar los geles de poliacrilamida (12%) se utilizó una disolución de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) y se emplearon persulfato amónico (PSA) y TEMED como agentes polimerizantes. El gel separador se preparó con acrilamida:bisacrilamida al 40% en tampón Tris-HCl 2 M, pH 8,8, SDS al 0,1% (p/v), PSA 4,4 mM y TEMED al 0,06%. El gel concentrador se preparó con acrilamida:bisacrilamida al 13% en tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS al 0,1% (p/v), PSA 4,4 mM y TEMED al 0,1%. Se cargaron además marcadores de peso molecular preteñidos de Bio-Rad (EEUU). Las muestras se suplementaron con tampón de carga (5x) (Tris-HCl 180 mM, pH 6,8, glicerol al 37%, SDS al 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 14% y azul de bromofenol al 0,05%) y se desnaturizaron calentándolas durante 5 min en un termobloque a 100°C. Se cargaron en el gel 5  $\mu\text{g}$  de fármaco, de AcM antifármaco, de anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , de AcM antifármaco conjugados a HRP, de fármaco conjugado a HRP y de HRP. Las fracciones purificadas de AcP presentaron concentraciones de proteína bajas (**tabla 4.12**) por lo que para poder discriminar correctamente la banda en el gel, se añadió el máximo volumen posible (48  $\mu\text{l}$ ). La separación de las proteínas se realizó por electroforesis vertical en condiciones desnaturizantes siendo el tampón de electroforesis Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1% y se desarrolló a voltaje constante (175 V) hasta que el marcador de migración azul de bromofenol alcanzó la base del gel (aproximadamente 1 h). Para visualizar las proteínas separadas por electroforesis, el gel se tiñó con

azul brillante de Coomassie y en los casos en los que se requería mayor resolución de las bandas se realizó una tinción de plata posteriormente.

#### • Tinción con azul brillante de Coomassie

En la tinción con azul brillante de Coomassie la mínima cantidad de proteína que se puede detectar por banda es de aproximadamente 50 ng. Las moléculas de azul brillante de Coomassie establecen fuerzas de Van der Waals entre los grupos amino de las proteínas promoviendo su visualización en el gel. El gel se cubrió con la disolución de fijación/tinción (azul brillante de Coomassie a 1 mg/ml en metanol al 40% y ácido acético glacial al 10%), manteniéndolo en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación se destiñó el gel sumergiéndolo en una disolución de lavado (metanol al 20% y ácido acético glacial al 20%) en agitación constante y a temperatura ambiente. Esta disolución se renovó cada vez que se saturaba de colorante, hasta detectar un buen contraste entre las bandas de proteínas y el fondo del gel.

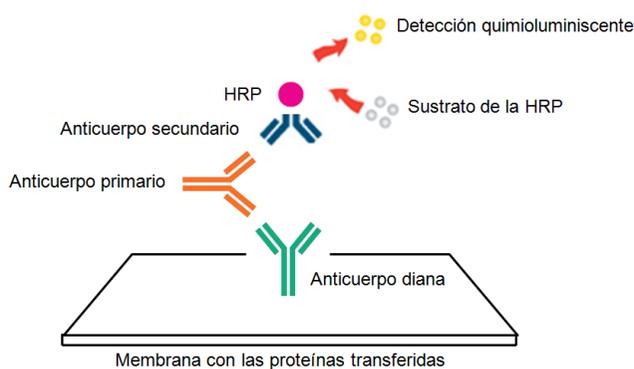
#### • Tinción de Plata

La sensibilidad de la tinción de plata alcanza hasta 0,2 – 0,6 ng de proteína por banda. El fundamento de esta técnica reside en la interacción de los iones de plata con las cadenas laterales de los aminoácidos y su posterior reducción a plata metálica, de manera que se forman depósitos en las proteínas visibles con gran resolución en el gel. Se comenzó fijando el gel en una disolución de fijación (etanol al 40% y ácido acético al 10%) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una disolución de sensibilización (etanol al 30%, tiosulfato de sodio al 5% (p/v), acetato de sodio al 6,8% (p/v) y glutaraldehído al 0,125% (p/v)), manteniéndola en agitación constante durante 30 min. Se realizaron 3 lavados de 5 min con agua destilada, se añadió una disolución de nitrato de plata al 2,5% (p/v) y formaldehído al 0,015% (v/v) y se incubó durante 20 min en agitación constante. Tras 2 lavados de 1 min con agua destilada, los geles se sumergieron en una disolución de revelado (carbonato de sodio al 2,5% (p/v) y formaldehído al 0,03% (v/v)) durante el tiempo necesario para la correcta visualización de las bandas. El revelado se detuvo incubando con una disolución de parada (EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1,46% (p/v)) durante 10 min y se volvieron a realizar otros 3 lavados con agua destilada durante 5 min.

Los geles teñidos con tinción azul de Coomassie y tinción de plata fueron escaneados y digitalizados a 300 dpi con el escáner *ImageScanner* y los programas LabScan<sup>TM</sup> y MagicScan<sup>TM</sup>.

### 3.2.11. Verificación de la especificidad antígeno-anticuerpo por transferencia Western

La especificidad de unión de los AcP purificados se analizó por transferencia Western (**figura 3.6**) para verificar que las bandas obtenidas en el gel correspondían a los AcP antifármaco y así demostrar que la purificación por cromatografía de afinidad había sido satisfactoria y ratificar su validez como método de purificación de AcP.



**Figura 3.6. Esquema representativo de la identificación de proteínas por transferencia Western.** Las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes son transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Tras la incubación con los anticuerpos específicos se detecta una señal quimioluminiscente proporcional a la unión antígeno-anticuerpo en películas de autorradiografía (fotográficas).

Finalizada la electroforesis (**ver apartado 3.2.10**) los AcP sin teñir fueron transferidos del gel a una membrana de Immovilon P (PVDF) en una cámara de transferencia semiseca. La membrana se activó sumergiéndola 5 s en metanol y 2 min en agua destilada. A continuación, la membrana y 3 piezas de papel 3 MM Whatman de igual tamaño se sumergieron en tampón de electroforesis:metanol:H<sub>2</sub>O (50:10:40 v/v/v) durante 10 min y el gel y otras 3 piezas de papel se sumergieron en tampón de electroforesis/H<sub>2</sub>O (50:50 v/v). Se aplicó un amperaje constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> de membrana durante 1 h, con un voltaje máximo de 24 V y una potencia máxima de 10 W. Una vez transferidas las proteínas, y antes de retirar el gel, se marcaron en la membrana las

bandas de los marcadores de peso molecular practicando pequeñas incisiones con un bisturí sobre las bandas del gel. El gel se tiñó con el reactivo GelCode<sup>®</sup> Blue de Pierce (EEUU) para verificar que la transferencia se había realizado de forma correcta y homogénea y la membrana se sumergió durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante en una disolución de bloqueo compuesta por tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM (TBS) con Tween al 0,05% (TBS-T) y leche en polvo desnatada al 10% para bloquear los centros de unión no específicos de la membrana. A continuación la membrana se incubó toda la noche a 4 °C en agitación constante con el anticuerpo primario, es decir, con el fármaco específico contra los AcP presentes en la membrana diluido en tampón de bloqueo a la concentración seleccionada durante la optimización del inmunoensayo de determinación de anticuerpos antifármaco (**figura 4.7**). Al día siguiente se realizaron 4 lavados de 10 min con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario, es decir, el AcM antifármaco unido a HRP y diluido en tampón de bloqueo a la concentración seleccionada durante la optimización del inmunoensayo de determinación de fármaco (**figura 4.6**). Finalmente la membrana se lavó 4 veces con TBS-T y se reveló en una habitación con luz roja como única fuente de luz. La membrana se cubrió con el reactivo de luminol ECL de Amersham (Reino Unido) dentro de un cassette Curix de Agfa (Bélgica) durante 1 min, se colocó entre 2 láminas de plástico transparentes y se expuso sobre ella una película fotográfica sensible al sistema. El tiempo de exposición varió en función del anticuerpo desde 10 min hasta 72 h para conseguir una resolución aceptable. La película se sumergió en líquido revelador fotográfico de Agfa hasta la aparición de las bandas de interés, se lavó con agua, se introdujo en fijador fotográfico de Agfa y finalmente se volvió a lavar con agua.

Además de la identificación de los AcP de forma indirecta con 2 anticuerpos específicos (fármaco y AcM), se realizó adicionalmente una identificación directa de los AcP con el fármaco marcado con HRP pero sin la utilización de un anticuerpo secundario.

### 3.2.12. Desarrollo y optimización de inmunoensayos ELISA para la determinación de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de fármacos biológicos

Los dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* a diseñar, desarrollar y optimizar a lo largo de esta Tesis Doctoral para la monitorización de fármacos biológicos se basaron en la metodología de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). Existen diferentes tipos de ensayos ELISA, entre los que se seleccionaron los más adecuados para conseguir los objetivos propuestos (**figura 3.7**).

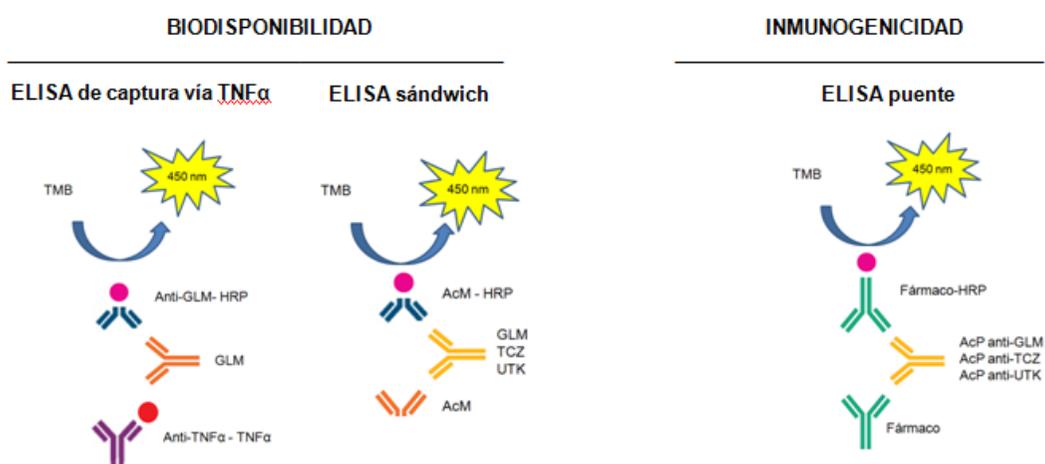


Figura 3.7. Arquitectura de los diferentes inmunoensayos ELISA.

El ensayo ELISA de captura fue propuesto para la determinación de la biodisponibilidad del único fármaco del estudio capaz de reconocer específicamente TNF $\alpha$ , el fármaco GLM, ya que anteriormente se habían desarrollado inmunoensayos utilizando este tipo de ELISA para la determinación de la biodisponibilidad de otros fármacos con esta misma diana terapéutica (Llinares-Tello y cols. 2012). Este antagonista del TNF $\alpha$  es capturado por un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  de clase IgG unido a TNF $\alpha$  y detectado por un AcM anti-GLM en formato F(ab')<sub>2</sub> unido a HRP.

El inmunoensayo desarrollado para la determinación de la biodisponibilidad de los fármacos no antagonistas del TNF $\alpha$  (TCZ y UTK), aunque también se aplicó a GLM, se basó en un ensayo

ELISA sándwich. En este ensayo el fármaco a detectar queda confinado en una estructura de sándwich, término del que toma su nombre, formado por dos AcM antifármaco en formato  $F(ab')_2$  que reconocen distintos epítomos del fármaco.

El inmunoensayo desarrollado para la determinación de la inmunogenicidad de los 3 fármacos se basó en un ensayo ELISA puente (*bridging* ELISA), ampliamente utilizado en otros ensayos para la determinación de la inmunogenicidad de fármacos (Pascual-Salcedo y cols. 2011). Este ensayo, que toma su nombre del complejo de anticuerpos que se forma, utiliza el fármaco inmovilizado como anticuerpo de captura y el propio fármaco unido a HRP como anticuerpo de detección, quedando los AcP antifármaco en el interior del puente.

En un principio el prototipo de ensayo para la determinación de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de los fármacos biológicos se basó en unas condiciones definidas por analogía con otros productos similares desarrollados anteriormente en la empresa Progenika Biopharma, a Grifols Company. A partir de la extrapolación de esas condiciones iniciales del ensayo se realizó la selección de los AcM antifármaco para el ensayo de biodisponibilidad y se procedió a la optimización de las variables de los inmunoensayos de biodisponibilidad y de inmunogenicidad.

### **3.2.12.1. Selección de los AcM antifármaco**

Los AcM obtenidos por el método de expresión en fagos se usaron para construir una arquitectura de ensayo tipo sándwich, en la que uno actuó como anticuerpo de captura y otro como anticuerpo de detección. Ambos anticuerpos fueron distintos entre sí reconociendo diferentes epítomos del fármaco. Todos los AcM disponibles se enfrentaron entre sí para determinar la orientación óptima, es decir, cuál de ellos era el óptimo para actuar como captura y cuál como detección. Para ello, a una placa ELISA de 96 pocillos se añadieron 100  $\mu$ l de cada uno de los AcM a 1,0  $\mu$ g/ml en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6. Tras un periodo de incubación de 2 h a temperatura ambiente la placa se lavó 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS-T al 0,2%. Se bloquearon las uniones inespecíficas con 200  $\mu$ l del reactivo UCDB y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Tras la decantación manual del UCDB, por inversión vigorosa de la placa, se añadieron 100  $\mu$ l de una

disolución de fármaco a 500 ng/ml en el tampón de dilución #SA-1 y se incubó durante 1 h para posteriormente proceder con 3 lavados con 200  $\mu$ l de PBS-T al 0,05%. Finalmente se añadieron los distintos anticuerpos de detección, conjugados con HRP a pH 7,2 y en relación molar 1:6, a una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml en #SA-1 y tras incubación durante 1 h y lavar 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS-T al 0,05%, se añadieron 50  $\mu$ l de TMB, sustrato de la HRP. Después de 30 minutos de incubación se paró la reacción con 50  $\mu$ l  $H_2SO_4$  1 N y se procedió a la lectura espectrofotométrica del producto final amarillo formado en un lector de placas a la longitud de onda de 450 nm incluyendo como longitud de onda de referencia 620 nm para corregir así las variaciones ópticas de la placa de poliestireno y aumentar la precisión en la medida ( $DO_{450}-DO_{620}$ ). Se seleccionó aquella pareja de anticuerpos con la que se obtuvo una mayor relación entre la absorbancia de la muestra y la muestra del blanco sin fármaco.

Para el caso de GLM existe otro tipo de arquitectura de ensayo diferente que se llevó a cabo de forma paralela a la anterior y que consistió en la detección de GLM vía  $TNF\alpha$ , en la que se sustituyó el AcM de captura por un inmunocomplejo formado por un anticuerpo anti- $TNF\alpha$  unido a  $TNF\alpha$ . En este caso el ensayo ELISA es igual al descrito anteriormente excepto el tapizado de la placa. Brevemente, se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de anti- $TNF\alpha$  a 2,0  $\mu$ g/ml en #SA-1 y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 200  $\mu$ l de PBS-T al 0,2% y se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de  $TNF\alpha$  a 10 ng/ml incubándose durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación orbital a 300 rpm. Tras otro proceso de lavado, se añadieron 100  $\mu$ l del estabilizante de proteínas StabDry y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se decantó la placa de forma manual por inversión vigorosa y se secó en estufa a 40°C durante 4 h.

### **3.2.12.2. Optimización de los inmunoensayos ELISA**

Los inmunoensayos desarrollados debían ser optimizados para establecer las condiciones en las que la sensibilidad y especificidad de la detección de los fármacos y anticuerpos antifármaco fueran máximas. Las variables a optimizar estaban relacionadas con cada una de las partes del inmunoensayo: placas pretapizadas, sistema de detección, curva de calibrado, escalado industrial y dilución de las muestras.

El **pretapizado de las placas** consistió en la adsorción del anticuerpo de captura a la superficie del pocillo y un tratamiento posterior para mantenerlas estables a lo largo del tiempo almacenadas a 4 °C. En este proceso, tras la inmovilización del **anticuerpo de captura y selección de la concentración óptima**, se bloquearon los sitios de unión inespecífica con un reactivo compuesto de caseína (UCDB) y se estabilizó el sistema con un reactivo estabilizante de proteínas (StabDry). Alternativamente se utilizó un nuevo reactivo con propiedades bloqueantes y estabilizantes (DBS-C). Las placas pretapizadas fueron sometidas a un proceso de secado previo a su almacenamiento a 4 °C. Este secado fue dependiente de los reactivos utilizados en el pretapizado, de manera que las placas pretapizadas con la combinación de reactivos UCDB y StabDry se secaron en estufa de convección natural durante 4 h a 40 °C mientras que las pretapizadas con el DBS-C se secaron en estufa de vacío durante 1 h a 37 °C y 10 mbar. Una vez secas las placas, se sellaron térmicamente en el interior de bolsas de aluminio opacas con cierre hermético y se preservaron de la humedad con gel de sílice. Durante el pretapizado se optimizaron variables relacionadas con la concentración del anticuerpo de captura y la naturaleza de los reactivos bloqueantes/estabilizantes.

El **sistema de detección** estaba constituido por un AcM, para el ensayo de biodisponibilidad, y el propio fármaco, para el ensayo de inmunogenicidad, ambos unidos a HRP. Las variables del sistema de detección a optimizar fueron la **concentración de anticuerpo de detección**, el **pH** en el que se llevó a cabo la conjugación y la **relación molar del conjugado anticuerpo:HRP**.

La cuantificación de fármaco y de anticuerpos antifármaco se basó en la detección colorimétrica del producto formado por la acción de la HRP sobre su sustrato (TMB). Inicialmente se estableció el tiempo de reacción máximo en 30 min como en otros inmunoensayos desarrollados con anterioridad en Progenika Biopharma, a Grifols Company, en los que participaba el enzima HRP. Para tratar de reducir dicho tiempo acortando la duración del análisis sin perder intensidad de señal de detección, se realizó una **cinética de reacción** midiendo, cada 5 min a lo largo de 30 min, la aparición del compuesto azul generado por degradación del TMB por la HRP en el máximo de absorbancia de 620 nm.

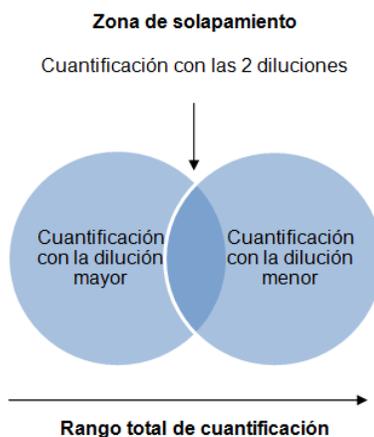
Las **curvas de calibrado** de los inmunoensayos de biodisponibilidad y de inmunogenicidad constaban de 6 puntos de concentraciones conocidas (calibradores) de fármaco y de AcP antifármaco

respectivamente, en tampón de dilución formado por NHS diluido (1:200) en #SA-1 (#SA-1+NHS) o #AA-1 (#AA-1+NHS). Los calibradores se eligieron de forma que las curvas tuvieran las siguientes características:

- Debían presentar el mayor rango dinámico posible para que, una vez aplicadas las diluciones a las muestras, cubriera el mayor rango de concentraciones posible incluyendo aquellas clínicamente relevantes.
- Todos los puntos de concentración debían describir una curva que se ajustara a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (4 PL, *Parameter Logistic*) cuando se representaba en el eje de ordenadas (eje y) la densidad óptica ( $DO_{450}$ - $DO_{620}$ , DO) y en el eje de abscisas (eje x) la concentración de los calibradores.
- La relación entre la DO del calibrador de concentración más baja (CAL-F) y la del control negativo (CN, tampón de dilución #SA-1+NHS o #AA-1+NHS) debía ser mayor de 2.

Una vez se consiguieron las condiciones óptimas de los 6 inmunoensayos se procedió, en el Departamento de I+D, al **escalado industrial** de los componentes específicos de los inmunoensayos (placas pretapizadas, curva de calibrado, controles de calidad y sistema de detección) simulando las condiciones a las que serán sometidos en su transferencia al Departamento de Producción y posterior conversión en el producto comercializable Promonitor. El escalado, como proceso de verificación de que las prestaciones del producto permanecen inalteradas con respecto a las de pequeña escala (escala de laboratorio), consistió en la producción de cada componente específico en una magnitud equivalente a 10 y 25 kits de producto final, disponiendo por tanto de 2 lotes producidos de manera independiente en el caso de los inmunoensayos de inmunogenicidad y un único lote en los inmunoensayos de biodisponibilidad.

Para evitar el efecto gancho (*hook*) de dosis altas por el que se podría infraestimar la medida en muestras con concentraciones muy altas de analito, se seleccionaron 2 **diluciones de muestra**, en tampón #SA-1 o #AA-1, con las que se cuantificara el mayor rango posible de concentraciones existiendo una zona de solapamiento entre ambas como se muestra en la **figura 3.8**.



**Figura 3.8. Representación esquemática de la selección de las diluciones de muestra.** Las concentraciones bajas del analito se cuantificaron con la dilución mayor y las concentraciones altas con la dilución menor. En la zona de solapamiento existirá una mayor robustez en la cuantificación, lo que refleja la importancia de que las concentraciones con más relevancia clínica se encuentren dentro de dicha zona.

### 3.2.13. Validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos ELISA

La validación consistió en la definición de los requisitos analíticos y la confirmación de que los métodos tenían las prestaciones y las capacidades consistentes con lo requerido, basándose en las premisas recogidas en las guías reguladoras de evaluación de productos sanitarios de diagnóstico *in vitro* del CLSI y de la FDA. Una vez superados los criterios de aceptación propuestos en las distintas fases de validación, el siguiente paso sería proceder a la transferencia al Departamento de Producción para realizar el escalado industrial oficial de tres lotes consecutivos y a la verificación de las prestaciones técnicas obtenidas en la fase de diseño siguiendo estrictamente los requisitos de las guías mencionadas con el objetivo final de la obtención del mercado de conformidad europea (CE) y de introducir estas herramientas en el mercado competitivo para su aplicación clínica regulada. Asimismo, con dicha producción se llevarían a cabo estudios de estabilidad del producto. Estas últimas verificaciones más exhaustivas no fueron objeto de esta Tesis Doctoral.

Todos los estudios implicados en la validación de las prestaciones técnicas siguieron el mismo orden de ejecución: (i) obtención de los datos de las diferentes variables a evaluar, (ii) identificación

de valores perdidos y atípicos (*outliers*) y (iii) análisis de los datos. Los valores perdidos se definieron como aquellos valores obtenidos directamente del análisis pertinente en términos de respuesta del instrumento de medida (densidad óptica o absorbancia) que no cumplieron los requisitos establecidos concernientes a su localización dentro del rango de densidad óptica descrito por la curva de calibrado, es decir, los valores que se salían del rango de curva tanto por la zona superior como por la inferior. Los valores atípicos se definieron como aquellos valores de réplicas de una misma medida, no obtenidos directamente como respuesta del instrumento sino transformados en valores de concentración, que se alejaban de manera extrema del resto de las medidas. Los valores atípicos se calcularon por el método del rango intercuartílico (IQR, *InterQuartil Range*) en el que se estudió la magnitud existente entre cada réplica individual con respecto a la media de todas las réplicas. Si existía más de un 5% de valores atípicos, el experimento quedaba invalidado y debía repetirse. Tanto los valores perdidos como los valores atípicos no se tuvieron en cuenta para los análisis posteriores de los datos.

A continuación se muestran las variables a evaluar dentro de la validación de las prestaciones técnicas.

### **3.2.13.1. Ruido de fondo**

El ruido de fondo se define como la propiedad intrínseca del ensayo ELISA que por su naturaleza proporciona una señal de fondo o ruido detectable cuando no hay analito en la muestra. Esta señal se estudió en el CN y en NHS.

El ensayo consistió en un único experimento en el que se analizaron 40 réplicas de CN y 40 réplicas de NHS a cada una de las 2 diluciones seleccionadas para el producto en cuestión.

### **3.2.13.2. Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación (LoQ, *Limit of Quantitation*) representa la concentración más baja de analito que puede ser medida con respecto a unos criterios de precisión adecuados.

El diseño y los criterios de precisión predefinidos se basaron en la guía *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition* (CLSI EP-17-A2, 2012).

En una primera aproximación se realizó un experimento previo preparando 6 muestras con el analito a detectar a unas concentraciones conocidas comprendidas entre los 2 puntos de concentración más bajos de la curva de calibrado del ensayo. Se analizaron 4 réplicas de cada muestra y se seleccionaron como concentraciones potencialmente válidas para el LoQ aquellas 3 cuyas réplicas fueron interpoladas en la curva de calibrado y para las que la recuperación del analito se encontraba entre el 80% y el 120% de la concentración teórica con la que se había preparado de forma artificial la muestra. Con estas 3 muestras se realizó el análisis de LoQ. Se prepararon 3 muestras independientes en NHS de 4 lotes diferentes con concentraciones bajas y conocidas del analito y se analizaron con 3 réplicas de muestra, 2 lotes de reactivos y 2 experimentos realizados en 2 días diferentes.

Se estableció como criterio de aceptación el error total (%TE), que tiene en cuenta tanto los errores sistemáticos como parámetros de precisión, no debiendo ser superior al 20%.

### **3.2.13.3. Precisión**

La precisión representa la capacidad del método de medida de dar el mismo resultado en mediciones diferentes llevadas a cabo en las mismas condiciones. Los datos del estudio fueron útiles para evaluar diferentes fuentes de variabilidad: precisión intraensayo (repetibilidad) y precisión intradispositivo (precisión total).

El diseño y el análisis de la precisión se basaron en la guía *Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition* (CLSI EP05-A3, 2014). El estudio se llevó a cabo con 2 lotes de reactivos, 2 experimentos al día separados al menos 2 h, 2 muestras por experimento con 4 réplicas cada una y durante 6 días.

Las 2 muestras que se utilizaron para determinar la precisión del ensayo se seleccionaron estratégicamente para actuar como muestras representativas de las concentraciones reales observadas en pacientes, es decir, correspondían a 2 niveles distintos de muestras clínicamente relevantes. En los ensayos de determinación de fármaco estas muestras representaron los percentiles 25 y 75 de las concentraciones medidas en muestras reales de pacientes bajo tratamiento con el fármaco concreto. En los ensayos de determinación de anticuerpos antifármaco se debió haber seguido el mismo procedimiento pero debido al insuficiente número de muestras positivas para poder hacer un análisis descriptivo de los resultados, se seleccionaron las muestras de tal manera que correspondieran a la zona baja de la curva (cuantificada con la dilución menor) y la zona alta de la curva (cuantificada con la dilución mayor). De cada muestra se prepararon alícuotas de un solo uso y se almacenaron a -80°C.

Se estableció como criterio de aceptación la imprecisión o coeficiente de variación (CV) de repetibilidad entre réplicas de un mismo ensayo ( $CV_r$ ) y el CV total entre días, ensayos, lotes y réplicas ( $CV_T$ ). Para calcular estos CV se determinaron previamente las desviaciones estándar (DE) de repetibilidad ( $DE_r$ ) y total ( $DE_T$ ).

$DE_r$  indica el grado de desacuerdo en un conjunto de réplicas de una medida realizadas en idénticas condiciones. El cálculo de  $DE_r$  deriva de la siguiente fórmula:

$$DE_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^2 (X_{ij1} - X_{ij2})^2}{4I}}$$

donde,

I = número total de días

j = número de ensayos por día

$X_{ij1}$  = resultados para el ensayo j en el día i (media + DE)

$X_{ij2}$  = resultados para el ensayo j en el día i (media - DE)

Para obtener el valor de  $DE_r$  por la fórmula anterior se calcularon las sumas de los cuadrados de las diferencias observadas entre réplicas de una medida efectuada en el día durante el primero de los ensayos llevados a cabo ( $X_1$ ) y durante el segundo de los ensayos ( $X_2$ ), de manera que la fórmula se simplificaría a la siguiente expresión (I sigue siendo el número total de días de los análisis):

$$DE_r = \sqrt{\frac{X_1 + X_2}{4I}}$$

Las diferencias entre las réplicas se calcularon como (la media + DE) - (media - DE).

$DE_T$  indica el grado de desacuerdo entre réplicas de medida a lo largo del tiempo y en distintas condiciones, por lo que la acumulación de errores en la medida proviene de varias fuentes a diferencia de  $DE_r$ . El cálculo de  $DE_T$  deriva de la siguiente fórmula:

$$DE_T = \sqrt{\frac{2DE_{dd}^2 + DE_{rr}^2 + DE_r^2}{2}}$$

donde,

$DE_{dd}$  = desviación estándar entre días

$DE_{rr}$  = desviación estándar entre los 2 ensayos del día

$DE_r$  = desviación estándar de repetibilidad

$DE_{dd}$  se calculó en base a todas las medidas efectuadas en los distintos días,  $DE_{rr}$  a través de la fórmula  $DE_{rr} = \sqrt{\frac{X_3}{2I}}$ , donde,  $X_3$  corresponde a la suma de los cuadrados de las medias de las diferencias entre los 2 ensayos del día, I es el número de días de los análisis y  $DE_r$  fue calculado en el apartado anterior.

En ningún caso el valor de CV debía exceder del 20%

#### 3.2.13.4. Linealidad

Se determinó la linealidad de la curva de calibrado seleccionada para cada inmunoensayo definida como la capacidad de un método analítico de proporcionar resultados que, en el rango establecido por la curva de calibrado, son directamente proporcionales a la concentración de fármaco o de AcP en la muestra.

Los requerimientos establecidos para este estudio están basados en la guía *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline* (CLSI EP06-A, 2003). El estudio se llevó a cabo en un único experimento, con 1 lote de reactivos, 10 muestras y 4 réplicas por muestra.

Se analizaron 9 concentraciones (además del CN) preparadas por diluciones seriadas en NHS y seleccionadas de tal forma que en la medida de lo posible fueran equidistantes entre sí comenzando en una concentración por encima del mayor punto de concentración de la curva y terminando por una concentración por debajo del menor punto de concentración de la misma.

El rango lineal de la curva de calibrado se determinó por análisis de regresión polinómica evaluando si los puntos de la curva obtenida por representación en el eje  $y$  de las concentraciones observadas en el ensayo y en el eje  $x$  la concentración relativa a la menor concentración del conjunto, se ajustaban mejor a una línea recta (polinomio de orden 1) que a una curva (polinomio de orden 2 o de orden 3). Para hacer esto se realizó un análisis de  $t$  de Student para cada uno de los coeficientes  $b_1$  en el ajuste lineal,  $b_2$  en el ajuste cuadrático y  $b_2$  y  $b_3$  en el ajuste cúbico, comparándolos con la no linealidad. Estos valores de la  $t$  de Student se compararon con los descritos en la tabla de distribución de valores de  $t$  de Student (**anexo 2**) que toma diferentes valores en función de los grado de libertad de cada polinomio. El número de grados de libertad se calculó con la fórmula:

$$^{\circ}libertad = L * R - Rdf$$

donde,

L es el número de concentraciones de fármaco o de AcP del conjunto final de concentraciones seleccionado

R es el número de réplicas de cada concentración

Rdf es el número de grados de libertad consumidos por el análisis de regresión

Si el valor de la  $t$  de Student para cada uno de los coeficientes polinómicos se encontraba fuera del rango definido por el valor del percentil 95 de la  $t$  de Student para un análisis de 2 colas, significaba que existían diferencias significativas entre el modelo polinómico propuesto y la no linealidad con un nivel de confianza del 95%. Si las diferencias son significativas en  $b_1$  y no lo son para el resto de coeficientes no lineales ( $b_2$  y  $b_3$ ), el conjunto de concentraciones seleccionado es lineal en todo el rango. Si las diferencias significativas también se observan en  $b_2$  o en  $b_3$ , el conjunto de concentraciones seleccionado no sería lineal y el análisis se repetiría eliminando de forma sucesiva puntos de concentración hasta obtener el rango lineal si tras el cálculo del porcentaje de diferencia entre el modelo no lineal de mejor ajuste y el lineal supera el 20% en al menos una de las concentraciones analizadas.

### **3.2.13.5. Efectos interferentes**

Las sustancias interferentes pueden actuar como importante fuente de error en las mediciones de parámetros clínicos, por lo que su estudio es crucial para identificar las posibles interferencias en los inmunoensayos de cuantificación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco.

El protocolo aplicado está basado en la guía regulatoria *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Second Edition* (CLSI EP7-A2, 2005).

Las sustancias interferentes que se estudiaron son aquellas que presentaban un potencial de interferencia considerable por estar presentes en la muestra y ser representativas de estados de muestras hemolizadas, lipémicas e ictericas, por lo que se testaron como interferentes hemoglobina, triglicéridos y bilirrubina respectivamente. Asimismo, se incorporaron al estudio otras moléculas relacionadas estructuralmente con el analito a detectar como otros fármacos que pudieran haber sido

administrados en tratamientos previos. Por la misma razón, en los ensayos de inmunogenicidad se analizaron otros anticuerpos antifármaco además del FR. Las concentraciones del analito problema se analizaron en muestras de concentración baja y alta y una muestra negativa.

El número mínimo de réplicas para detectar una interferencia como tal, depende de la relación entre el error en la medida significativamente relevante desde el punto de vista clínico ( $d_{\max}$ ) y la desviación estándar intraensayo ( $DE_r$ ) (**tabla 3.2**). Por tanto  $d_{\max}$  correspondía al 20% de la concentración de la muestra con niveles más bajos del analito testada y  $DE_r$  se obtuvo en el estudio de precisión.

**Tabla 3.2. Correlación entre el ratio  $d_{\max}/DE_r$  y el número mínimo de réplicas del ensayo.**

$d_{\max}/DE_r$	Nº de réplicas	$d_{\max}/DE_r$	Nº de réplicas
0,8	41	1,5	12
1	26	1,6	10
1,1	22	1,8	8
1,2	18	2	7
1,3	16	2,5	5
1,4	14	3	3

Las muestras del analito problema se prepararon de forma artificial con aquellas concentraciones de interferentes que simulaban muestras de sueros hemolizados (500 mg/dl de hemoglobina), de sueros lipémicos (3.000 mg/dl de triglicéridos), de estados patológicos de ictericia (20 mg/dl de bilirrubina) y de la concentración característica de FR en pacientes seropositivos (25.000 UI/dl). Para establecer las concentraciones interferentes de los fármacos se consideraron las concentraciones valle en el estado estacionario ( $C_{\min}$ -SS) presentes en los/as pacientes siguiendo la pauta de administración recomendada. Un múltiplo de 3 de esta concentración se consideró suficiente para detectar cambios importantes en la medida causada por sustancias interferentes simulando el peor de los casos. Al no disponer de suficientes muestras positivas para determinar la concentración

de interferentes de anticuerpos antifármaco se estableció de manera arbitraria una concentración suficientemente elevada (10.000 UA/ml).

Se estableció como criterio de aceptación una diferencia máxima del 20% entre los valores obtenidos de la cuantificación del analito problema en las muestras con interferentes respecto a la muestra sin interferentes.

### **3.2.14. Correlación de los inmunoensayos desarrollados con otras metodologías**

La evaluación del funcionamiento de los inmunoensayos desarrollados para la monitorización de tratamientos biológicos es requisito imprescindible para su comercialización. El estudio consistió en la evaluación de la capacidad de los productos para cuantificar las concentraciones de fármacos o de anticuerpos antifármaco en muestras de suero de pacientes en tratamiento con las terapias biológicas del estudio. El correcto funcionamiento de los productos en los términos clínicos de exactitud y precisión, sensibilidad y especificidad en el rango de concentraciones clínicamente relevantes se estudió por comparación con otras metodologías existente para el mismo fin. Actualmente no existe un estándar de referencia para la monitorización de estas terapias biológicas, sin embargo, en el caso de GLM y TCZ, las muestras de los/as pacientes se analizaron por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos) por su gran experiencia en el análisis de la biodisponibilidad de fármacos biológicos con un ensayo ELISA y de la inmunogenicidad con un ensayo RIA validados (Kneepkens y cols. 2014). En el caso de TCZ además las mismas muestras se analizaron por otra metodología ELISA con el kit LISA-TRACKER® Duo TCZ de la empresa Theradiag (Francia) tanto para cuantificar TCZ como anticuerpos anti-TCZ (Benucci y cols. 2016).

El protocolo de este estudio observacional y comparativo se basa en los requerimientos reguladores europeos para dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* y en las guías *Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples* (CLSI EP09-A3, 2013) y *Clinical Evaluation of Immunoassays* (CLSI I/LA-21/A-2, 2008).

Para el estudio de GLM se analizó la correlación y el grado de acuerdo entre los métodos con 102 muestras, para el de TCZ con 38 muestras y para el de UTK con 190 muestras. Se estableció como criterio de aceptación la obtención de un valor del coeficiente de Spearman o Pearson  $> 0,95$  con un error sistemático entre ambos métodos en el intervalo de medida no significativo ( $p > 0,05$ ) y un valor de la kappa de Cohen, que mide el grado de acuerdo, entre 0,8 y 1,0.

### **3.2.15. Correlación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica.**

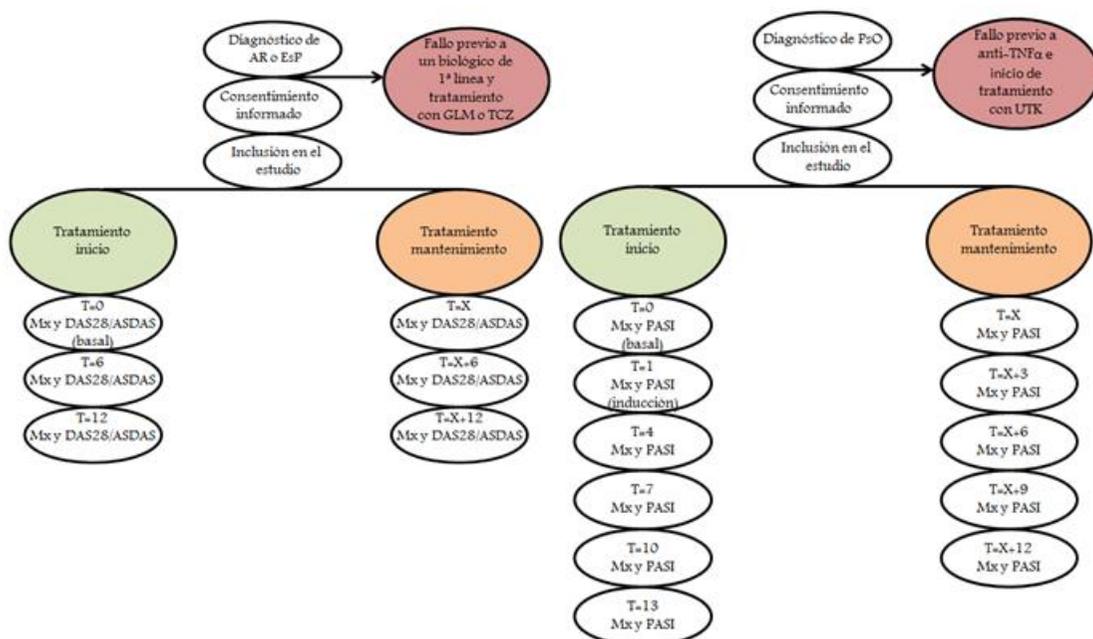
Se trató de establecer una correlación de los niveles valle de fármaco y de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica medida con índices de actividad de las diferentes patologías en estudio con el fin de elaborar un algoritmo terapéutico que permita una evaluación complementaria y más objetiva de la respuesta al tratamiento. Para ello se determinaron los niveles valle de GLM, TCZ y UTK y la de sus anticuerpos correspondientes en pacientes con EspA, AR y PsO, respectivamente, a lo largo de 12 meses.

El estudio fue de tipo observacional, transversal, ambispectivo, unicéntrico y no intervencionista, de manera que en ningún momento los datos derivados del mismo afectaron al tratamiento o a la decisión del clínico en el manejo del paciente.

El protocolo clínico de los estudios de GLM y TCZ fue desarrollado por el Departamento de I+D de Progenika Biopharma, a Grifols Company, con la asesoría de la Dra. Dora Salcedo-Pascual y del Dr. Alejandro Balsa, de los Servicios de Inmunología y Reumatología del HULP respectivamente. El protocolo clínico del estudio de UTK fue desarrollado por el Departamento de I+D de Progenika Biopharma, a Grifols Company, con la asesoría de La Fundación Vasca de Innovación e Investigación sanitarias (Bioef) y del Dr. Jesús Careaga del Servicio de Dermatología del HUB.

**A) Pacientes tratados con GLM o TCZ**

**B) Pacientes tratados con UTK**



**Figura 3.9 Diseño de los estudios clínicos.** Seguimiento de los/as pacientes tratados/as con (A) GLM o TCZ durante 12 meses, con 3 muestras de suero por paciente coincidiendo con la evaluación clínica en la que se obtuvo el correspondiente índice DAS28 o ASDAS. (B) Seguimiento de los/as pacientes tratados/as con UTK durante 12-13 meses, con 5-6 muestras de suero por paciente coincidiendo con la evaluación clínica en la que se obtuvo el correspondiente índice PASI.

Los/as pacientes incluidos/as en el estudio tuvieron un periodo de seguimiento de 1 año desde su inclusión estableciendo para los estudios de GLM y TCZ un régimen semestral de visitas, extracciones de muestra y evaluaciones clínicas (**figura 3.9.A**) y para el estudio de UTK un régimen acorde con la pauta de administración recomendada (**figura 3.9.B**). La variable principal del estudio fue la cuantificación de la concentración de fármaco libre y de anticuerpos antifármaco en suero. Se elaboró un cuaderno de recogida de datos con las variables secundarias del estudio tomadas de la historia clínica de los/as pacientes diferenciadas en variables demográficas (sexo y edad) y clínicas (tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad, tratamientos biológicos previos, duración de los tratamientos, dosis de fármaco, tratamientos concomitantes, niveles de actividad basal y en cada evaluación y fecha de la última administración del fármaco).

Los índices utilizados para la evaluación clínica de las patologías fueron:

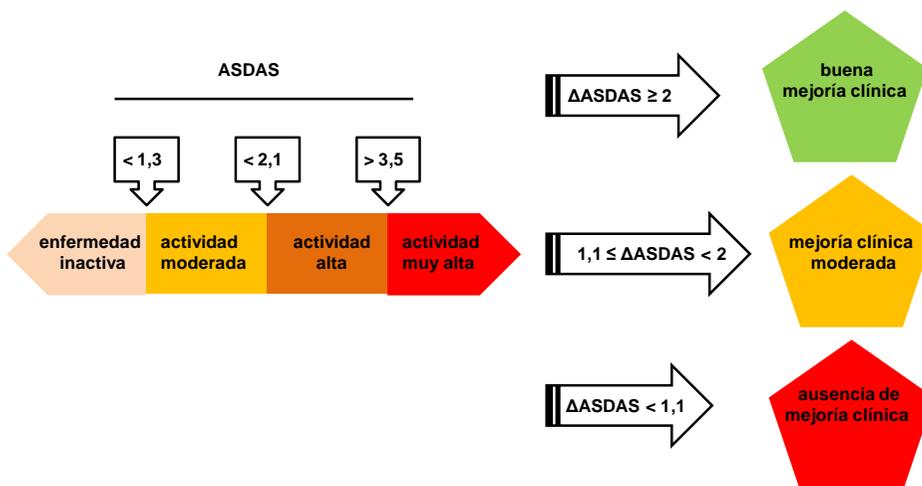
- **ASDAS**

La actividad de las EspA se evaluó con el índice ASDAS. El ASDAS se calcula combinando la impresión subjetiva del paciente (evaluación global, dolor lumbar y rigidez matutina) y parámetros inflamatorios, como VSG o PCR (**figura 3.10**). En este estudio se utilizó el ASDAS - VSG.

Introduce los valores a analizar		Resultado ASDAS	
Dolor Lumbar [0-10]	0 ▼	VSG	PCR
Duración RM [0-10]	0 ▼	0	0
EVA Global Paciente [0-10]	0 ▼		
Dolor / Tumef Perif [0-10]	0 ▼		
VSG (mm/h)	0		
PCR (mg/dl)	0		
<input type="button" value="INICIALIZAR VALORES"/> <input type="button" value="CALCULAR"/>			

**Figura 3.10. Calculador del ASDAS.** A través de esta aplicación se calcula el valor ASDAS atendiendo a una serie de datos clínicos (RM: rigidez matutina; EVA: escala visual analógica; Tumef Perif: tumefacción periférica; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: proteína C reactiva).

El grado de respuesta clínica se clasificó en función del valor de ASDAS al final de la evaluación y de la mejoría clínica ( $\Delta$ ASDAS) definida como la disminución del valor del ASDAS al final de la evaluación respecto al valor basal ( $ASDAS_0 - ASDAS_f$ ) (Machado y cols. 2011) (**figura 3.11**). Sin embargo, para simplificar los análisis se consideró respuesta clínica con valores de  $ASDAS < 2,1$  y ausencia de respuesta clínica con  $ASDAS \geq 2,1$ .



**Figura 3.11.** Valores de ASDAS y  $\Delta$ ASDAS y grados de respuesta al tratamiento y mejoría clínica. Se representan los estadios de actividad de la enfermedad en función de los valores de ASDAS (izquierda) y los criterios de mejoría clínica en función de los valores de  $\Delta$ ASDAS.

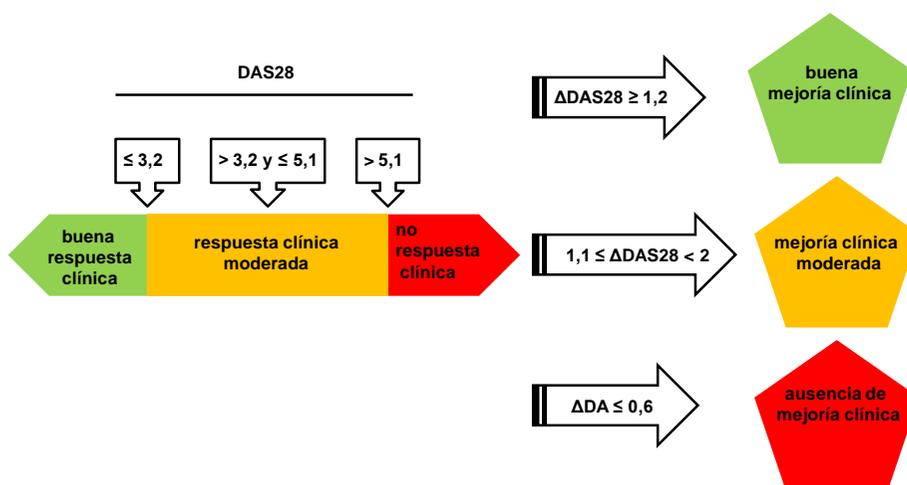
• DAS28

La actividad de la AR se evaluó con el índice DAS28. Este índice se construye con el número de articulaciones tumefactas (NAT o TJC, *Tender Joint Count*) e inflamadas (NAI o SJC, *Swollen*) de entre 28 evaluables, la valoración del estado de salud global por parte del/la paciente medida en una escala visual analógica (EVA) y el valor de VSG o de PCR. En este estudio se utilizó el DAS28-VSG (**figura 3.12**).

DATOS CLÍNICOS		RESULTADOS	
NAT	<input type="text"/> N° Articulaciones tumefactas		
NAI	<input type="text"/> N° Articulaciones inflamadas		
EVA	<input type="text"/> (0-100)		
VSG	<input type="text"/> mm/h	Resultado DAS28 VSG	<input type="text"/>
PCR	<input type="text"/> mg/dl	Resultado DAS28 PCR	<input type="text"/>
<input type="button" value="Limpiar"/>		<input type="button" value="Calcular"/>	

**Figura 3.12.** Calculador del DAS28. A través de una aplicación informática se calcula el valor DAS28 atendiendo a una serie de datos clínicos (NAT: número de articulaciones tumefactas; NAI: número de articulaciones inflamadas; EVA: escala visual analógica; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: proteína C reactiva).

El grado de respuesta clínica se clasifica en función del valor DAS28 al final de la evaluación y de la mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28) definida como la disminución del DAS28 al final de la evaluación respecto al valor basal ( $DAS28_0 - DAS28_f$ ) como se representa en la **figura 3.13**. Sin embargo, para simplificar los análisis se consideró respuesta clínica con valores de  $DAS28 < 3,2$  y ausencia de respuesta clínica con  $ASDAS \geq 3,2$ .

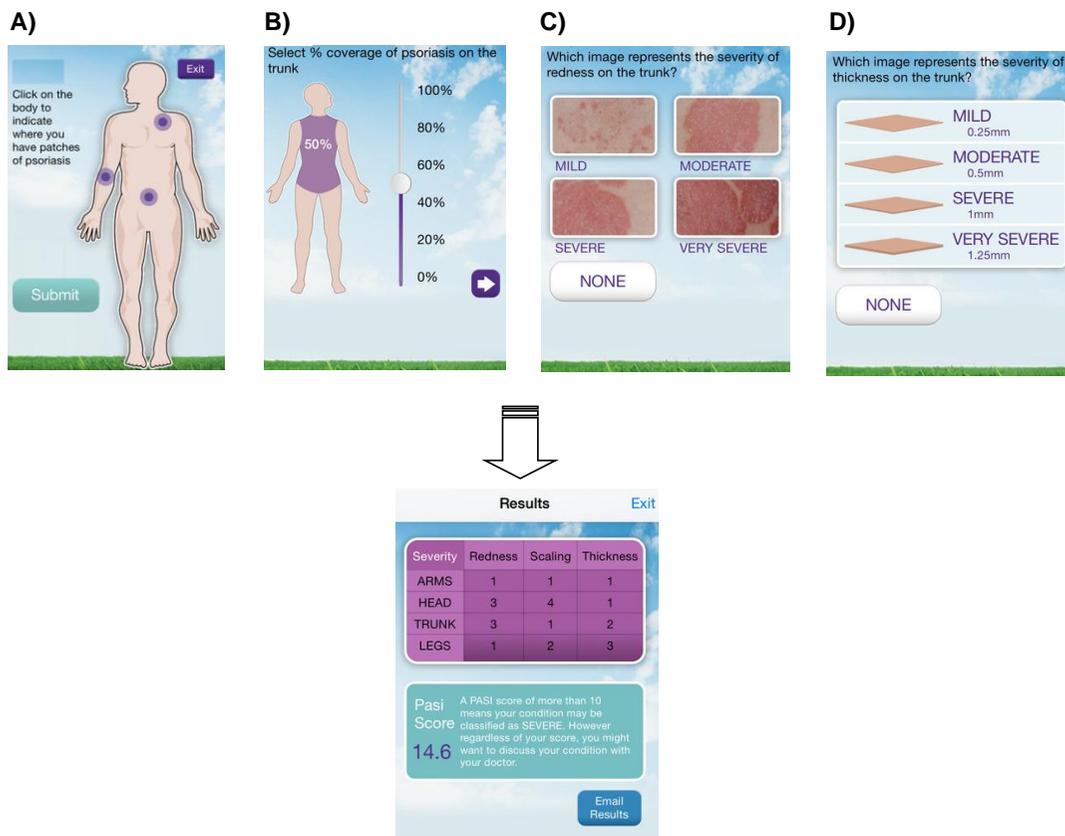


**Figura 3.13.** Valores de DAS28 y  $\Delta$ DAS28 y grados de respuesta al tratamiento y mejoría clínica. Se representan los estadios de actividad de la enfermedad en función de los valores de DAS28 (izquierda) y los criterios de mejoría clínica en función de los valores de  $\Delta$ DAS28.

#### • PASI

La actividad de la PsO se evaluó con el índice PASI calculado en relación a la superficie corporal afectada y a la gravedad de los signos (eritema, induración y descamación) en cada zona corporal (**figura 3.14**).

Un PASI por encima de 10-12 está considerado en muchos estudios clínicos con fármacos biológicos como criterio de PsO moderada-grave. Para valorar la eficacia de UTK, la respuesta clínica se definió cuando un/a paciente presentaba una reducción mayor del 75% y menor del 90% (PASI75) o de al menos el 90% (PASI90) en el valor del PASI al final de la evaluación respecto al valor basal.



**Figura 3.14. Calculador del PASI.** El índice PASI se calculó a través de una aplicación para móviles desarrollada por Janssen Pharmaceutica N.V. en 4 sencillos pasos secuenciales. (A) Inicialmente se definió la zona afectada por las lesiones en cabeza, tronco y extremidades. (B) A continuación se indicó para cada zona el área que ocupaban las lesiones para seguidamente centrarse en el aspecto de las mismas. Las lesiones se puntúan por comparación con una escala visual de la aplicación atendiendo al (C) eritema presente y al (D) grosor de las lesiones. Con toda la información recogida se obtiene un valor de PASI a interpretar por el clínico.

### 3.2.16. Análisis estadístico

Con el objetivo de estudiar la distribución de los fármacos de estudio y evaluar la aparición de anticuerpos antifármaco en los/as pacientes se realizó un análisis univariante descriptivo de las variables analíticas. Se determinó la dispersión de las medidas en la población, tales como media, desviación estándar, mediana, IQR, valores máximo y mínimo e intervalo de confianza 95% de las variables en cada punto temporal. Se estudió el tipo de distribución de las variables mediante el test

de *Kolmogorov-Smirnov*. El grado de acuerdo entre los métodos a comparar se estudió por análisis de *Bland-Altman* y determinación de la *Kappa de Cohen*. Los tests también fueron comparados en términos del porcentaje de acuerdo positivo y porcentaje de acuerdo negativo. Se agruparon los/as pacientes en base a la mejoría clínica a diferentes tiempos de seguimiento, para definir diferentes tipos de respuesta al tratamiento.

Para la comparación de grupos independientes a través de variables continuas se utilizó la *t de Student* y *ANOVA* o sus equivalentes no paramétricos *U de Mann-Whitney* y *Kruskal-Wallis* respectivamente, y para variables categóricas el test exacto de *Fisher*.

Para los análisis de correlación entre la concentración de fármaco, anticuerpos antifármaco y respuesta clínica de los/as pacientes, se usaron los métodos de *Pearson o Spearman*, dependiendo del tipo de distribución de las variables, y la regresión lineal univariante y multivariante, esta última para detectar posibles variables de confusión.

La supervivencia al tratamiento se estudió usando las curvas de *Kaplan-Meier* y se compararon los grupos usando el método de *log-rank*.

Para establecer el punto de concentración terapéutica de los fármacos, se construyeron curvas *ROC* en función de la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos desarrollados.

El nivel de significación se fijó en valores de  $p < 0,05$ .



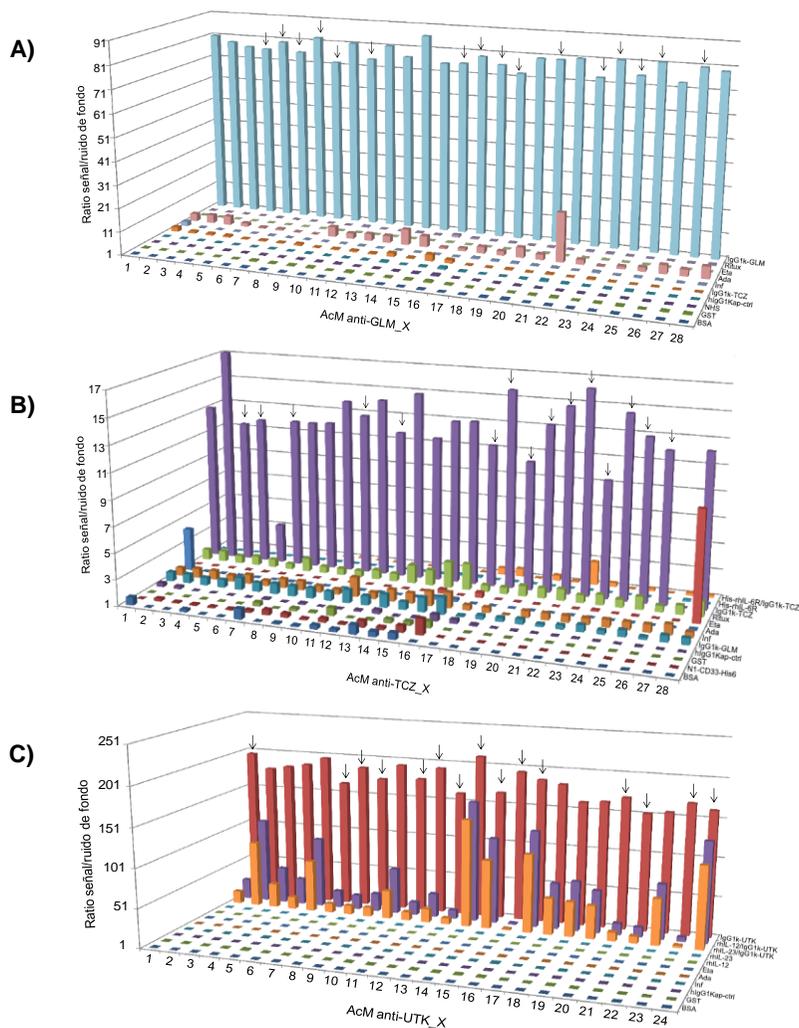
# **RESULTADOS**

---



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtención y selección preliminar de los AcM antifármaco



**Figura 4.1. Afinidad de cada AcM (A) anti-GLM, (B) anti-TCZ y (C) anti-UTK por el fármaco correspondiente y sus reactividades cruzadas.** Se representa para cada AcM antifármaco el ratio entre la señal de detección del fármaco correspondiente y sus reactividades cruzadas con otras moléculas e inmunocomplejos potencialmente interferentes, y el ruido de fondo. Las flechas (↓) indican los AcM seleccionados y la X el número de AcM. Ritux, rituximab; Eta, etanercept; Ada, adalimumab; Inf, infliximab; IgG1k-TCZ, tocilizumab; hIgGkap-ctrl, IgGk humana control; NHS, suero humano control; GST, glutatión-S-transferasa; BSA, seroalbúmina bovina; His-rhIL-6R/IgG1k-TCZ, inmunocomplejo formado por la unión de TCZ al receptor de IL-6; His-rhIL-6R, receptor de IL-6; N1-CD33-His6, receptor del tipo lectinas de unión a ácido siálico; rhIL-12/IgG1k-UTK, inmunocomplejo formado por la unión de UTK a IL-12; rhIL-23/IgG1k-UTK, inmunocomplejo formado por la unión de UTK a IL-23; rhIL-12, IL-12; rhIL-23, IL-23.

Los AcM en formato Fab' bivalente, F(ab')<sub>2</sub>, para la determinación de los niveles de fármaco (biodisponibilidad) fueron desarrollados por AbD Serotec, a Bio-Rad Company.

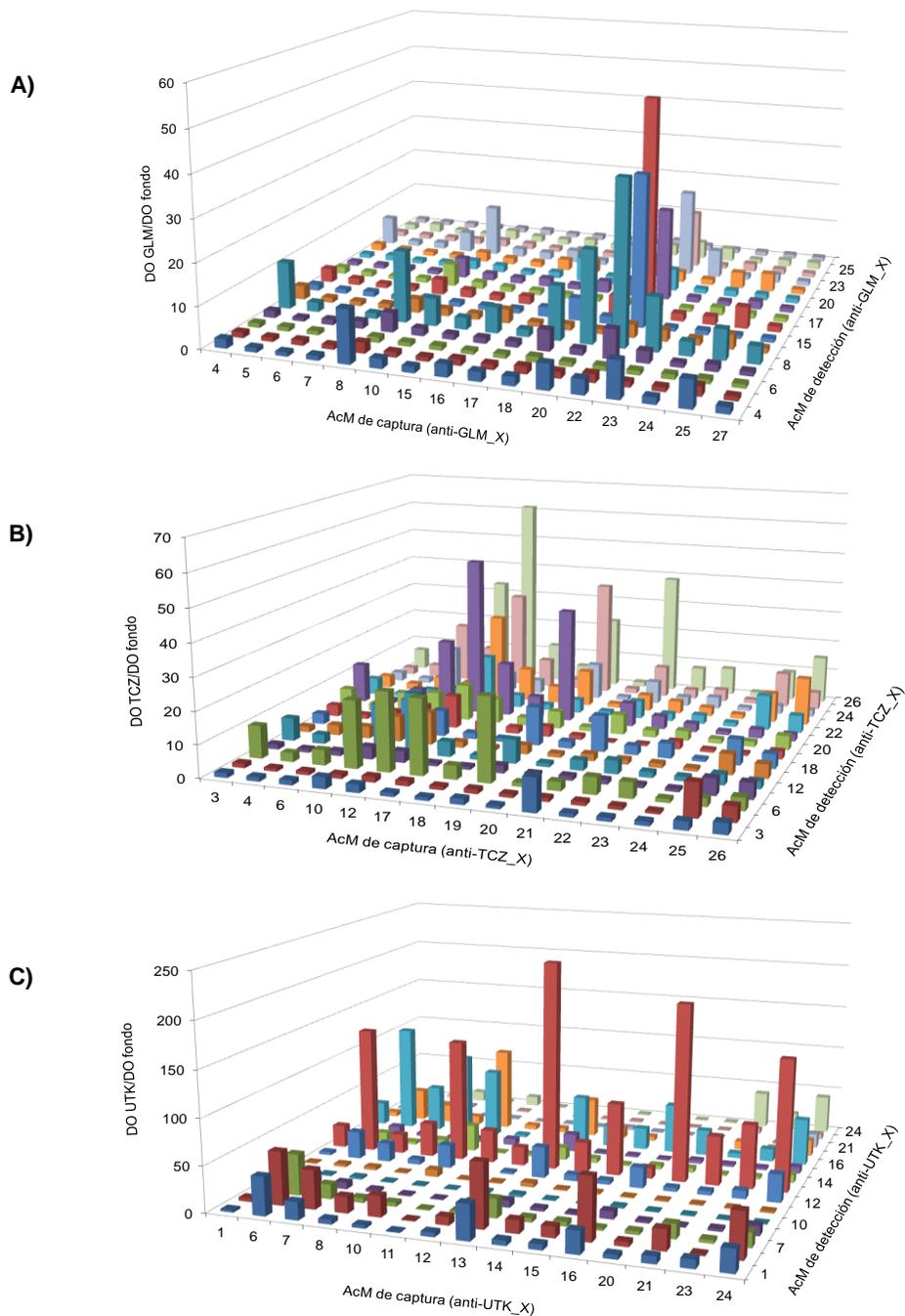
Se obtuvieron 28 AcM anti-GLM, 28 anti-TCZ y 24 anti-UTK que presentaban una afinidad diferente por el fármaco correspondiente y que reconocían específicamente distintos epítomos. Los AcM antifármaco seleccionados fueron aquellos que proporcionaron un mayor ratio entre la señal específica de detección del fármaco y la señal inespecífica del inmunoensayo (ruido de fondo) y una menor reactividad cruzada con otras moléculas potencialmente interferentes. En base a estos criterios y conforme a los resultados del ELISA de control de calidad efectuado por AbD Serotec, a Bio-Rad Company, se seleccionaron finalmente 16 anticuerpos anti-GLM (**figura 4.1.A**), 15 anti-TCZ (**figura 4.1.B**) y 15 anti-UTK (**figura 4.1.C**).

## **4.2. Selección de los AcM para los inmunoensayos de biodisponibilidad**

### **4.2.1. ELISA sándwich (GLM, TCZ y UTK)**

En los inmunoensayos de biodisponibilidad de GLM, TCZ y UTK por ELISA sándwich se empleó un AcM para la captura y otro AcM marcado con HRP para la detección.

Para seleccionar los AcM de captura y de detección se formaron parejas de AcM combinándolos entre sí de manera que todos actuaron en las 2 orientaciones. Para la detección de cada fármaco se eligió la concentración de 0,5 µg/ml en base a la experiencia con otros productos y presuponiendo que concentraciones mayores podrían saturar la señal de detección y que concentraciones menores podrían no detectarse o proporcionar intensidades de señal no significativas. Se analizaron 256 parejas para el ensayo de biodisponibilidad de GLM (**figura 4.2.A**) y 225 parejas tanto para el de TCZ (**figura 4.2.B**) como para el de UTK (**figura 4.2.C**).



**Figura 4.2. Cribado de AcM para la selección de las parejas del ELISA sándwich de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK.** Los AcM seleccionados se combinaron entre sí para formar parejas de AcM de captura y de detección funcionales en la detección del fármaco. Se representa el ratio entre la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) del fármaco a  $0,5 \mu g$  y la DO del fondo con cada una de las parejas. La X representa el número de anticuerpo.

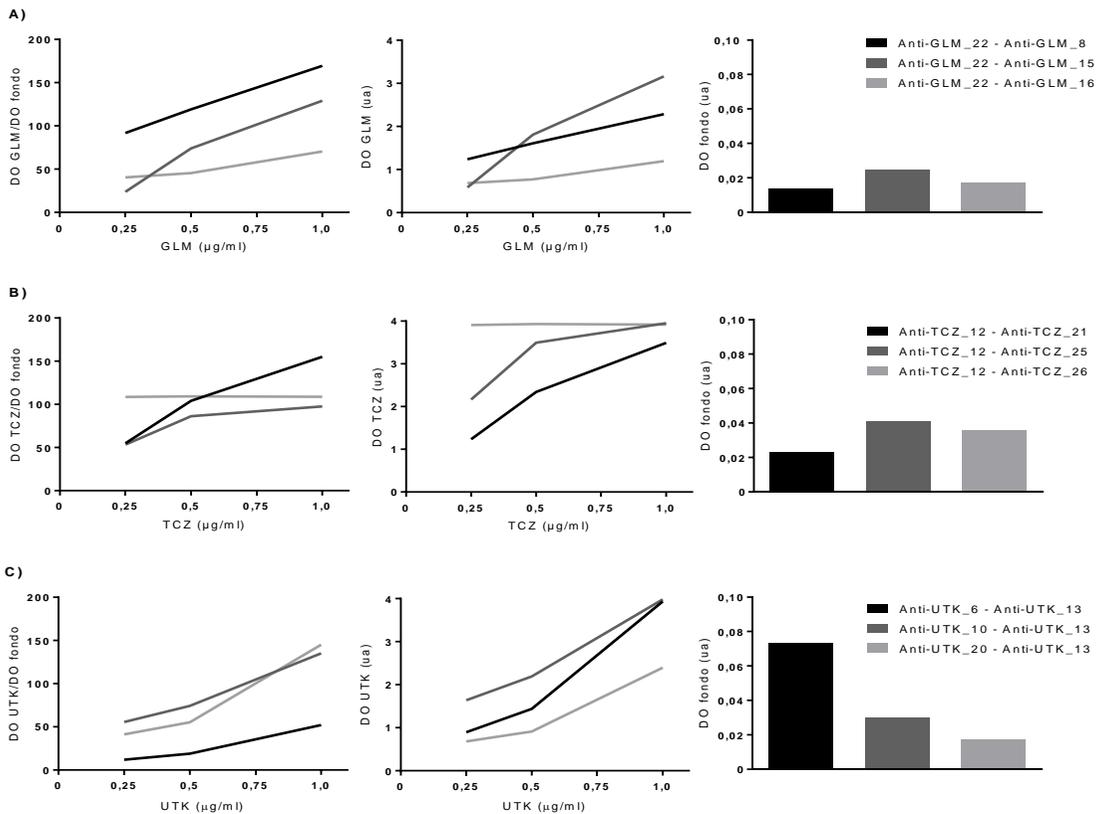
Las parejas de AcM seleccionadas debían proporcionar un ratio entre la intensidad de señal del fármaco y el ruido de fondo superior a 5 con un ruido de fondo inferior o igual a 0,1 ua. Entre las parejas que cumplieron con los criterios de aceptación, se excluyeron aquellas formadas por el mismo anticuerpo en captura y detección por unirse al mismo epítipo y se preseleccionaron las indicadas en la **tabla 4.1**.

**Tabla 4.1. Parejas seleccionadas para la detección de GLM, TCZ y UTK por ELISA sándwich para los inmunoensayos de biodisponibilidad.** Se indica la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) del fármaco a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , la DO del fondo y el ratio correspondiente.

AcM captura	AcM detección	DO fármaco (ua)	DO fondo (ua)	DO fármaco/DO fondo
Anti-GLM_22	Anti-GLM_8	0,508	0,013	39
Anti-GLM_22	Anti-GLM_15	0,617	0,017	36
Anti-GLM_22	Anti-GLM_16	1,151	0,022	52
Anti-TCZ_12	Anti-TCZ_21	1,154	0,023	50
Anti-TCZ_12	Anti-TCZ_25	1,307	0,042	31
Anti-TCZ_12	Anti-TCZ_26	2,084	0,034	61
Anti-UTK_6	Anti-UTK_13	3,924	0,028	140
Anti-UTK_10	Anti-UTK_13	3,915	0,024	135
Anti-UTK_20	Anti-UTK_13	3,915	0,020	196

Para la selección de la pareja final, se evaluó cada una de las 3 parejas preseleccionadas con otras dos concentraciones de fármaco, además de la empleada para el cribado, incluyendo una menor (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) y otra mayor (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ), con el fin de estudiar el comportamiento de cada una de ellas en un rango de concentración y no a una concentración concreta (**figura 4.3**).

La pareja seleccionada para cada fármaco fue aquella para la que se obtuvo el mayor ratio entre la señal del fármaco y el ruido de fondo, el mayor valor de la señal del fármaco a la concentración más baja (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ), para poder aumentar la sensibilidad del inmunoensayo, y un ruido de fondo permitido ( $DO < 0,1$  ua).



**Figura 4.3. Selección de la pareja final de AcM (A) anti-GLM, (B) anti-TCZ y (C) anti-UTK para los inmunoensayos de biodisponibilidad.** Representación de la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de cada fármaco a diferentes concentraciones, la DO del fondo y el ratio correspondiente, para cada una de las 3 parejas seleccionadas.

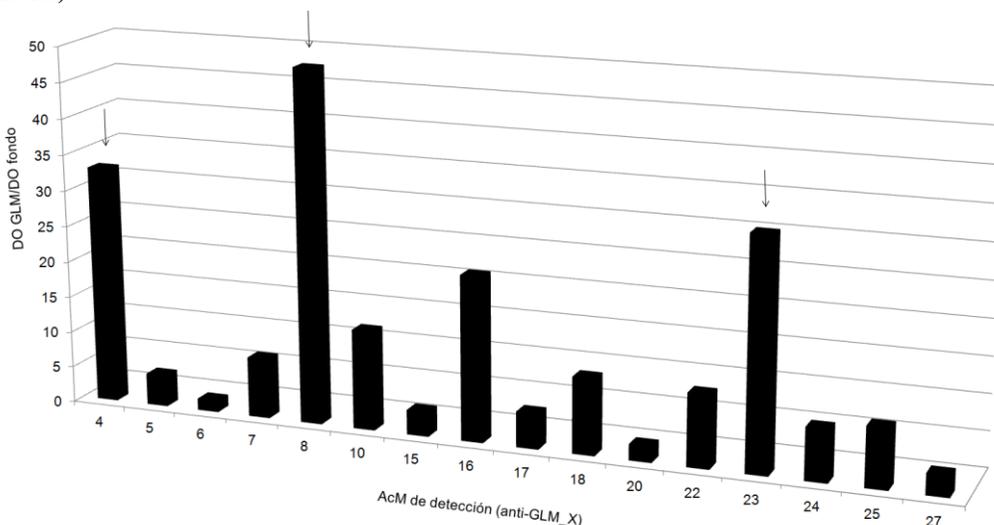
Las parejas seleccionadas (AcM captura – AcM detección) se recogen en la **tabla 4.2**.

**Tabla 4.2. Parejas de AcM antifármaco seleccionadas para los inmunoensayos ELISA sándwich de biodisponibilidad**

Fármaco	AcM captura	AcM detección
GLM	Anti-GLM_22	Anti-GLM_8
TCZ	Anti-TCZ_12	Anti-TCZ_26
UTK	Anti-UTK_10	Anti-UTK_13

#### 4.2.2. ELISA de captura vía TNF $\alpha$ (GLM)

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM por ELISA de captura vía TNF $\alpha$  se empleó como sistema de captura el inmunocomplejo formado por un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  unido a TNF $\alpha$  y como detección cada uno de los AcM anti-GLM marcado con HRP (**figura 4.4**). Se seleccionaron los 3 que proporcionaron los mayores ratios entre la señal de GLM y el ruido de fondo (**tabla 4.3**).



**Figura 4.4. Cribado de AcM para la selección del AcM de detección para el ELISA de captura vía TNF $\alpha$  de biodisponibilidad de GLM.** Se representa el ratio entre la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de GLM a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y la DO del fondo para cada uno de los 16 AcM. Las flechas ( $\downarrow$ ) indican los AcM seleccionados y la X el número de AcM.

**Tabla 4.3. AcM seleccionados para la detección de GLM por ELISA de captura vía TNF $\alpha$ .** Se indica la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de GLM a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , la DO del fondo y el ratio correspondiente, para los 3 AcM preseleccionados.

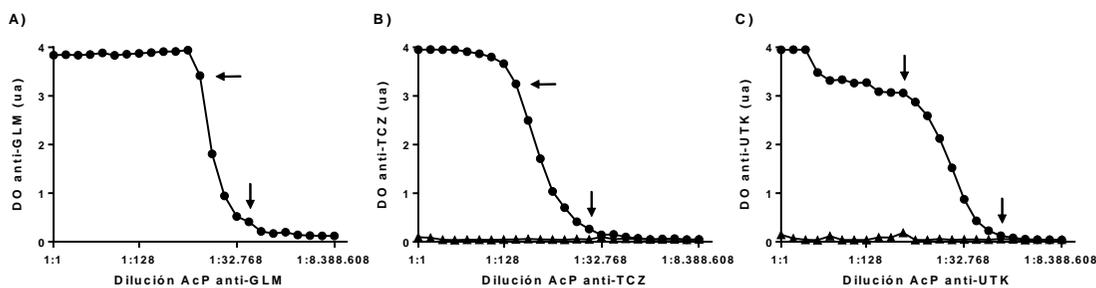
AcM captura	AcM detección	DO GLM (ua)	DO fondo (ua)	DO GLM/DO fondo
Anti-TNF $\alpha$ - TNF $\alpha$	Anti-GLM_4	1,090	0,033	33
Anti-TNF $\alpha$ - TNF $\alpha$	Anti-GLM_8	2,397	0,049	49
Anti-TNF $\alpha$ - TNF $\alpha$	Anti-GLM_23	1,467	0,046	32

Si comparamos los resultados obtenidos para la detección de GLM por ambos tipos de ELISA (**tablas 4.1 y 4.3**), los ruidos de fondo en todos los casos estuvieron por debajo de 0,1 ua pero

los mayores valores de DO de GLM se obtuvieron con el formato de ensayo de captura vía TNF $\alpha$ , por lo que se seleccionó este formato para el desarrollo del inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM con el anticuerpo anti-GLM\_8 por ofrecer el mayor ratio entre la señal de GLM y el ruido de fondo y el mayor valor de la señal de GLM.

### 4.3. Obtención y verificación de la funcionalidad de los AcP antifármaco

Los AcP antifármaco fueron obtenidos por inmunización activa de conejos por la empresa Proteogenix (Francia). Para verificar que el suero inmune era positivo para AcP, Proteogenix realizó un ELISA de control de calidad observando que a una dilución de 1:300.000 del suero inmune se perdía la señal de detección de los AcP presentes, por lo tanto el título que reportaron fue de 300.000 para los 3 AcP antifármaco. A continuación, verificamos la validez de estos AcP como controles positivos en los inmunoensayos a desarrollar para la determinación de niveles de anticuerpos antifármaco (inmunogenicidad) por medio de un ELISA puente. Para ello, tanto el suero inmune como el suero preinmune se diluyeron de forma seriada (factor de dilución 2) en #SA-1+NHS (**figura 4.5**).



**Figura 4.5. Verificación de la validez de los AcP como controles positivos en los inmunoensayos de inmunogenicidad.** Se representan las curvas de dilución del suero preinmune (▲) e inmune (●) para los AcP (A) anti-GLM, (B) anti-TCZ y (C) anti-UTK. Las flechas delimitan el rango de diluciones de trabajo.

Los 3 sueros inmunes ofrecieron señales positivas para AcP mientras que en los sueros preinmunes, carentes de AcP anti-fármaco pero en el que sí están presentes otras inmunoglobulinas estructuralmente relacionadas así como otras moléculas potencialmente interferentes, la señal fue nula. Por lo tanto, se confirmó la validez de los sueros inmunes para ser empleados como curvas de calibrado en los inmunoensayos de inmunogenicidad de los fármacos. Las mínimas diluciones

necesarias para obtener una intensidad máxima de señal de aproximadamente 3,0 ua (máxima respuesta de la mayoría de los analizadores ELISA automáticos y, sobre todo, del equipo Triturus® desarrollado por Grifols) fueron de 1:4.096, 1:256 y 1:1.024 para los sueros con AcP anti-GLM, anti-TCZ y anti-UTK, respectivamente y las máximas diluciones para obtener un valor de intensidad de señal de al menos el doble del correspondiente al suero preinmune a la misma dilución, siempre y cuando dicho valor fuera mayor de 0,1 ua, fueron 1:65.536, 1:16.384 y 1:262.144 para los sueros con AcP anti-GLM, anti-TCZ y anti-UTK, respectivamente (**figura 4.5**).

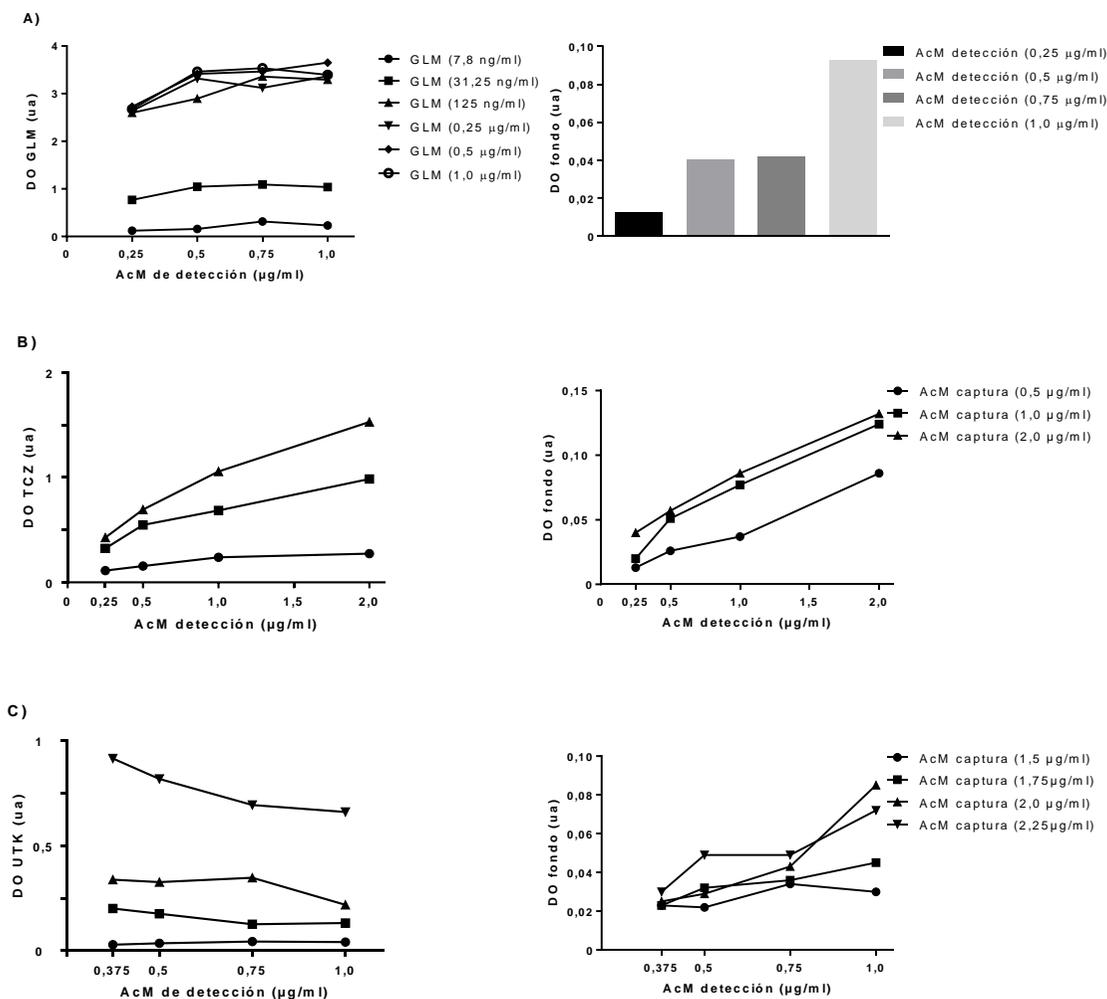
#### **4.4. Desarrollo y optimización de los inmunoensayos ELISA**

Los inmunoensayos para la determinación de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de los fármacos se desarrollaron y optimizaron con el fin de obtener aquellas condiciones que proporcionasen la máxima sensibilidad y especificidad en la detección y cuantificación de los fármacos y anticuerpos antifármaco correspondientes.

El primer paso en la optimización consistió en la **selección de la concentración del AcM de captura y de detección** (rango 0,25 - 2,0 µg/ml) empleando para los inmunoensayos de biodisponibilidad las tres concentraciones de fármaco utilizadas anteriormente para la selección de las parejas (0,25, 0,5, y 1,0 µg/ml). Para los inmunoensayos de inmunogenicidad se emplearon 3 diluciones de AcP definidas por el rango de trabajo para cada tipo de anticuerpos antifármaco (**figura 4.5**), seleccionando la dilución para la cual la DO fuera de aproximadamente 3,0 ua y otras 2 diluciones que cubrieran gran parte del rango total de trabajo (1/128 - 1/65536). Se trabajó con diluciones de AcP ya que aún no se conocía la concentración de los AcP antifármaco de los sueros inmunes.

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM, el complejo de captura anti-TNF $\alpha$  - TNF $\alpha$  (2 µg/ml - 0,01 µg/ml) ya había sido optimizado previamente por Progenika Biopharma, a Grifols Company (**ver apartado 3.2.12.1**), por lo que únicamente se realizó la titulación del AcM de detección. Las 3 concentraciones de GLM analizadas ofrecieron los mismos valores de DO, lo que indicaba que el sistema de detección se encontraba saturado desde la menor concentración de GLM (0,25 µg/ml). Debido a esta saturación se realizó otra titulación del AcM de detección seleccionando

concentraciones de GLM inferiores (7,8, 31,25 y 125 ng/ml) comprobándose que a la concentración del AcM de detección (anti-GLM\_8-HRP, **tabla 4.3**) 0,75  $\mu\text{g/ml}$  se obtenía la máxima intensidad de señal para las tres nuevas concentraciones de GLM analizadas y un ruido de fondo permitido (**figura 4.6.A**), por lo que se estableció esta como concentración para el inmunoensayo.

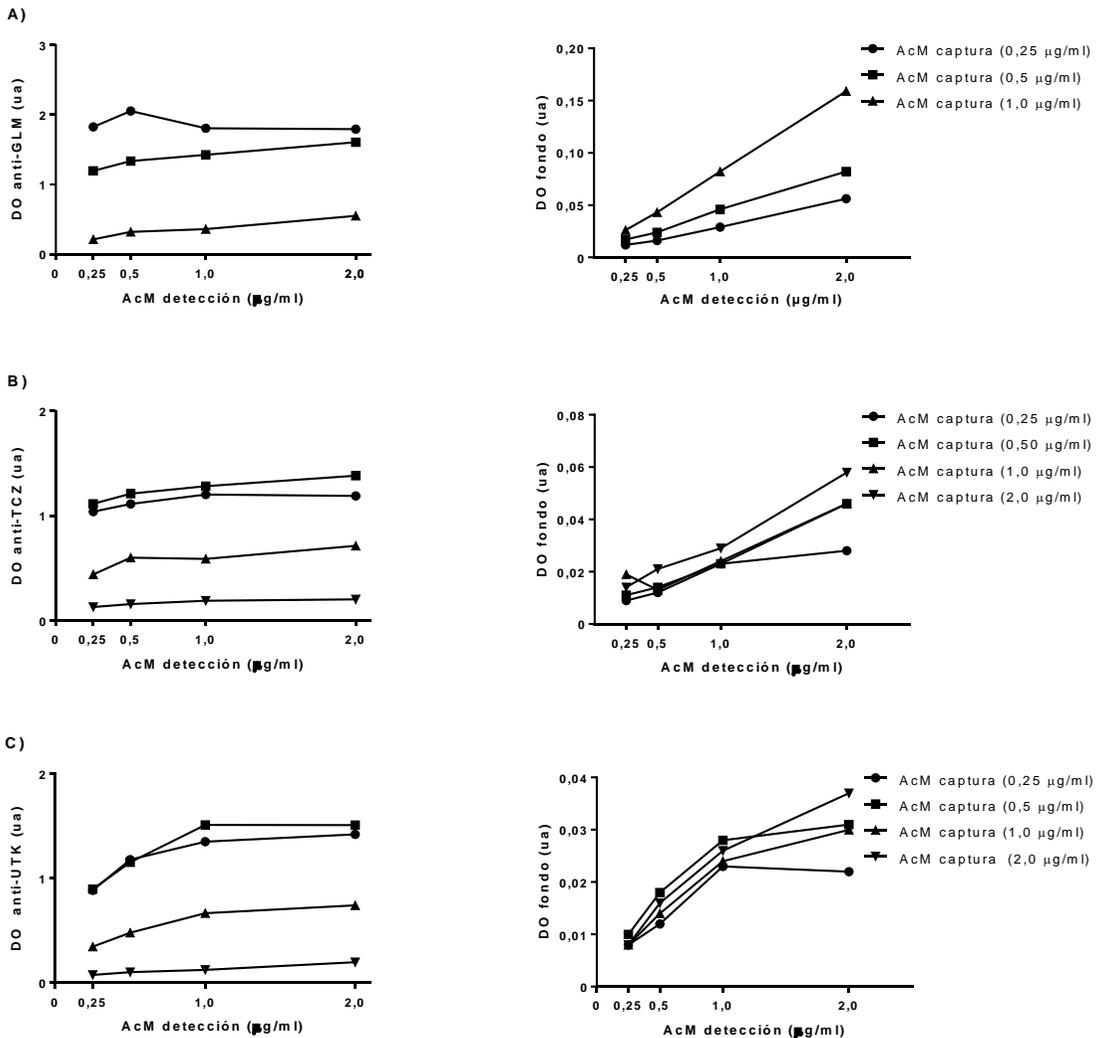


**Figura 4.6.** Titulación de los AcM de captura y de detección para los inmunoensayos de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. Se representa la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de cada fármaco a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y la DO del fondo a diferentes concentraciones de los AcM de detección y de captura para TCZ y UTK. En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM se analizaron varias concentraciones de GLM manteniendo constante la concentración del complejo de captura anti-TNF $\alpha$  - TNF $\alpha$  (2  $\mu\text{g/ml}$  - 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) pero variando la concentración del AcM de detección.

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ, los valores de DO aumentaron conforme aumentaban las concentraciones del AcM de captura y las del AcM de detección para las 3 concentraciones de TCZ analizadas (solo se muestran los resultados de la concentración intermedia 0,5 µg/ml). El mismo patrón se observó en el ruido de fondo. Con las concentraciones del AcM de captura y del de detección de 2,0 µg/ml se obtenían los mayores valores de intensidad de señal pero el ruido de fondo estaba por encima de 0,1 ua, así que se seleccionó una concentración de AcM de detección inferior con una señal de fondo por debajo de 0,1 ua (**figura 4.6.B**). Finalmente se establecieron las concentraciones de 2,0 µg/ml para el AcM de captura (anti-TCZ\_12, **tabla 4.2**) y de 1,0 µg/ml para el AcM de detección (anti-TCZ\_26-HRP, **tabla 4.2**).

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de UTK, la intensidad de señal aumentó conforme lo hacía la concentración del AcM de captura obteniéndose el máximo de intensidad a 2,25 µg/ml para una concentración del AcM de detección de 0,375 µg/ml y un ruido de fondo permitido (**figura 4.6.C**). Por lo tanto, la concentración final seleccionada para el AcM de captura (anti-UTK\_10, **tabla 4.2**) fue 2,25 µg/ml y para el de detección (anti-UTK\_13-HRP, **tabla 4.2**) 0,375 µg/ml.

Para el inmunoensayo de inmunogenicidad de GLM las 3 diluciones de AcP anti-GLM que se analizaron fueron 1:4.096, 1:8.192 y 1:65.536. La señal a una dilución de 1:4.096 estaba saturada desde la menor concentración empleada (0,25 µg/ml) tanto para el AcM de captura como para el de detección, por lo que se estudió el comportamiento de las otras 2 diluciones (1:8.192 y 1:65.536). La señal de AcP anti-GLM con ambas diluciones disminuía al aumentar la concentración del AcM de captura, obteniéndose la señal máxima a la concentración de 0,25 µg/ml (solo se muestran los resultados para la dilución intermedia 1:8.192), para la que se obtuvo el máximo de señal a la concentración del AcM de detección de 0,5 µg/ml, condiciones con las que se obtuvo un ruido de fondo permitido (**figura 4.7.A**). Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones de 0,25 µg/ml para el AcM de captura (GLM) y de 0,5 µg/ml para el AcM de detección (GLM-HRP).



**Figura 4.7. Titulación de los AcM de captura y de detección para los inmunoensayos de inmunogenicidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK.** Se representa la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de los distintos anticuerpos antifármaco a la dilución de 1:8.192 para anti-GLM y para anti-UTK y de 1:512 para anti-TCZ y la DO del fondo.

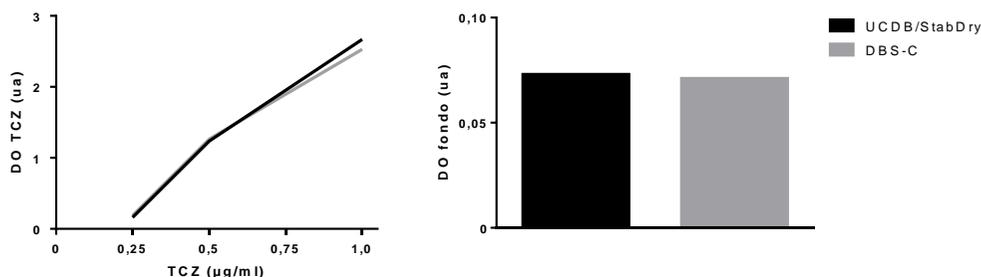
Para el inmunoensayo de inmunogenicidad de TCZ las 3 diluciones de AcP anti-TCZ que se analizaron fueron 1:256, 1:512 y 1:2.048. Las 3 diluciones ofrecieron resultados similares observándose un aumento de la intensidad de la señal a medida que disminuía la concentración del AcM de captura y aumentaba la concentración del AcM de detección, alcanzándose el máximo a 0,5 µg/ml del AcM de captura y 2,0 µg/ml del AcM de detección, concentraciones con las que se obtuvo

un ruido de fondo permitido (**figura 4.7.B**). Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para el AcM de captura (TCZ) y de 2,0  $\mu\text{g/ml}$  para el AcM de detección (TCZ-HRP).

Para el inmunoensayo de inmunogenicidad de UTK las 3 diluciones de AcP anti-UTK que se analizaron fueron 1:1.024, 1:8.192 y 1:65.536. Las 3 diluciones ofrecieron resultados similares observando una aumento de la intensidad de la señal a medida que disminuía la concentración del AcM de captura y aumentaba la concentración del AcM de detección, alcanzándose el máximo a las concentraciones del AcM de captura de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  y de detección de 1,0  $\mu\text{g/ml}$ , concentraciones con las que se obtuvo un ruido de fondo permitido (**figura 4.7.C**). Por lo tanto, se seleccionaron las concentraciones de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para el AcM de captura (UTK) y de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  para el AcM de detección (UTK-HRP).

Hasta el momento, en el **pretapizado** de las placas se había utilizado UCDB como bloqueante de uniones inespecíficas y StabDry como estabilizante de las proteínas adsorbidas. Con el fin de reducir el tiempo necesario de fabricación de las placas ELISA de los diferentes productos Promonitor, por estrategia de empresa, se decidió implementar modificaciones en el tapizado de las placas. Se introdujo un nuevo reactivo (DBS-C) con capacidad bloqueante y estabilizante y un nuevo sistema de secado de placas pasando de la utilización de estufas de convección natural a estufas de secado mediante vacío. La implementación de estos cambios supuso la posibilidad de fabricar las placas en una única jornada laboral de 8 h en lugar de 2 jornadas laborales. Promonitor-TCZ fue el primer producto en el que se implementó este nuevo proceso.

Se prepararon placas ELISA utilizando el bloqueante de uniones inespecíficas UCDB junto con el estabilizante StabDry y también utilizando solo el reactivo DBS-C y se analizaron 3 concentraciones diferentes de TCZ en las condiciones seleccionadas hasta el momento. No se observaron diferencias significativas en la intensidad de la señal de detección de TCZ ni el ruido de fondo (**figura 4.8**), por lo que se introdujo el reactivo DBS-C como bloqueante y estabilizante del tapizado en sustitución a la combinación de reactivos UCDB y StabDry.



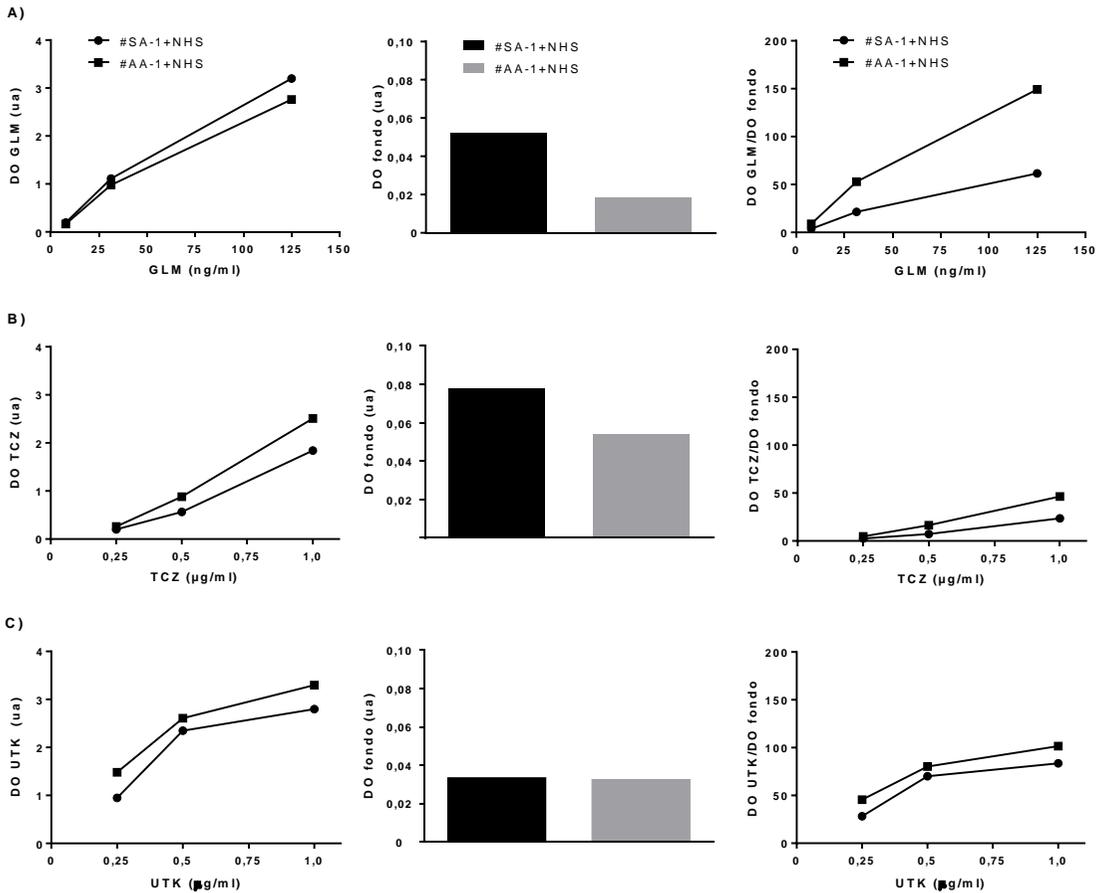
**Figura 4.8. Selección del reactivo bloqueante y estabilizante del tapizado de las placas sobre la detección de TCZ.** Se comparan las intensidades de las señales de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de (A) TCZ y del (B) ruido de fondo obtenido con las placas pretapizadas con UCDB/StabDry y con DBS-C.

Debido al éxito obtenido por la implementación del reactivo DBS-C en el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ, se extendió su uso al resto de los inmunoensayos, excepto a Promonitor-GLM y a Promonitor-ANTI-GLM que ya habían sido optimizados previamente con los reactivos UCDB y StabDry.

A continuación se procedió a la **selección del tampón de dilución** para la preparación de la curva de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad (**figura 4.9**) y de inmunogenicidad (**figura 4.10**). Se analizaron 2 tampones (#SA-1+NHS y #AA-1+NHS) de composición química similar, excepto por la presencia de biotina en el tampón #AA-1+NHS.

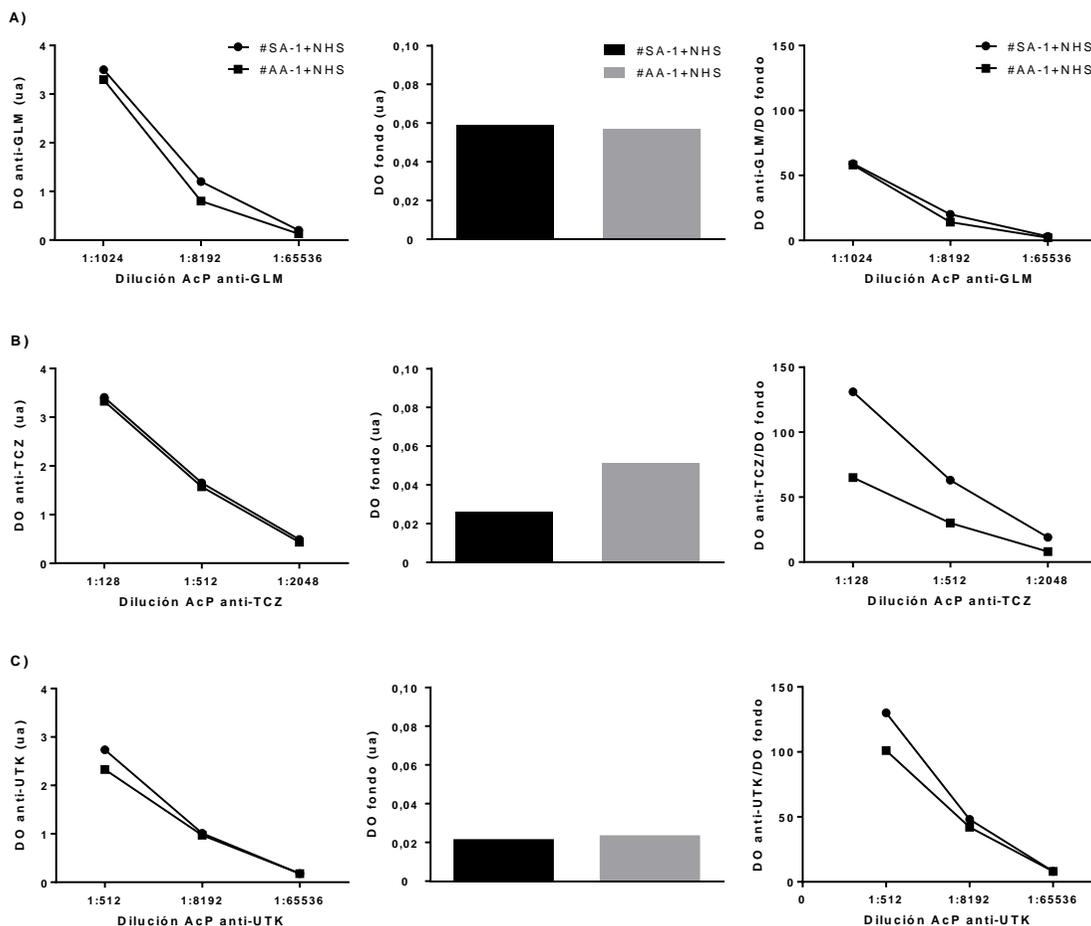
En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM (**figura 4.9.A**), se observaron valores mayores de DO empleando el tampón de dilución #SA-1+NHS pero se seleccionó el tampón #AA-1+NHS porque aunque la señal de GLM fue ligeramente inferior también lo fue la del ruido de fondo obteniéndose finalmente mayores ratios entre la señal de GLM y la del ruido de fondo.

En los inmunoensayos de biodisponibilidad de TCZ (**figura 4.9.B**) y de UTK (**figura 4.9.C**), también se observaron diferencias en los valores de DO en función del tampón empleado obteniéndose mayores valores empleando #AA-1+NHS, un ruido de fondo permitido y un mayor ratio entre la señal de TCZ o UTK y la del fondo.



**Figura 4.9.** Selección del tampón de dilución de la curva de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad. Se representa la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450}-DO_{620}$ , DO) de cada fármaco, la DO del fondo y el ratio correspondiente.

En los inmunoensayos de inmunogenicidad apenas se encontraron diferencias en las DO de detección de los AcP pero siempre fueron mayores con el tampón #SA-1+NHS, con el que se conseguían ruidos de fondo permitidos y mayores ratios entre la señal de los AcP y la del fondo, por lo que se seleccionó dicho tampón (**figura 4.10**).



**Figura 4.10.** Selección del tampón de dilución de la curva de calibrado de los inmunoensayos de inmunogenicidad. Se representa la intensidad de señal de detección ( $DO_{450}-DO_{620}$ , DO) de cada AcP, la DO del fondo y el ratio correspondiente.

Una vez establecida las concentraciones de los AcM de captura y de detección así como el tampón de dilución, se procedió a optimizar la **unión de la HRP a los AcM y a los fármacos** para los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad respectivamente.

Este sistema de detección se emplea ampliamente en productos comerciales basados en la técnica ELISA puesto que la unión directa del enzima y el anticuerpo permite disminuir el tiempo de procesado del ensayo. La eficiencia de la reacción de aminación entre el AcM o el fármaco y la HRP depende del **pH** en el que se lleve a cabo y la amplificación de la señal de detección de fármaco o

anticuerpos antifármaco está condicionada por el número de moléculas de HRP conjugadas con el anticuerpo (AcM:HRP o fármaco:HRP, **relación molar**). Se analizaron 3 concentraciones de fármaco y 3 diluciones de AcP en función del pH y de la relación molar del sistema de detección.

En los 3 inmunoensayos de biodisponibilidad se seleccionó el mismo pH y relación molar. Las intensidades de señal más altas se obtuvieron con el sistema de detección preparado a pH 7,2 y con la relación molar 1:6 para la cual la intensidad de señal del fondo se encontraba por debajo de 0,1 ua. En el caso de TCZ, la mayor intensidad de señal sí se obtuvo con el pH 7,2 y con la relación 1:8, aunque se descartó esta condición por presentar una señal de ruido de fondo muy cercana a 0,1 ua (**figura 4.11**).

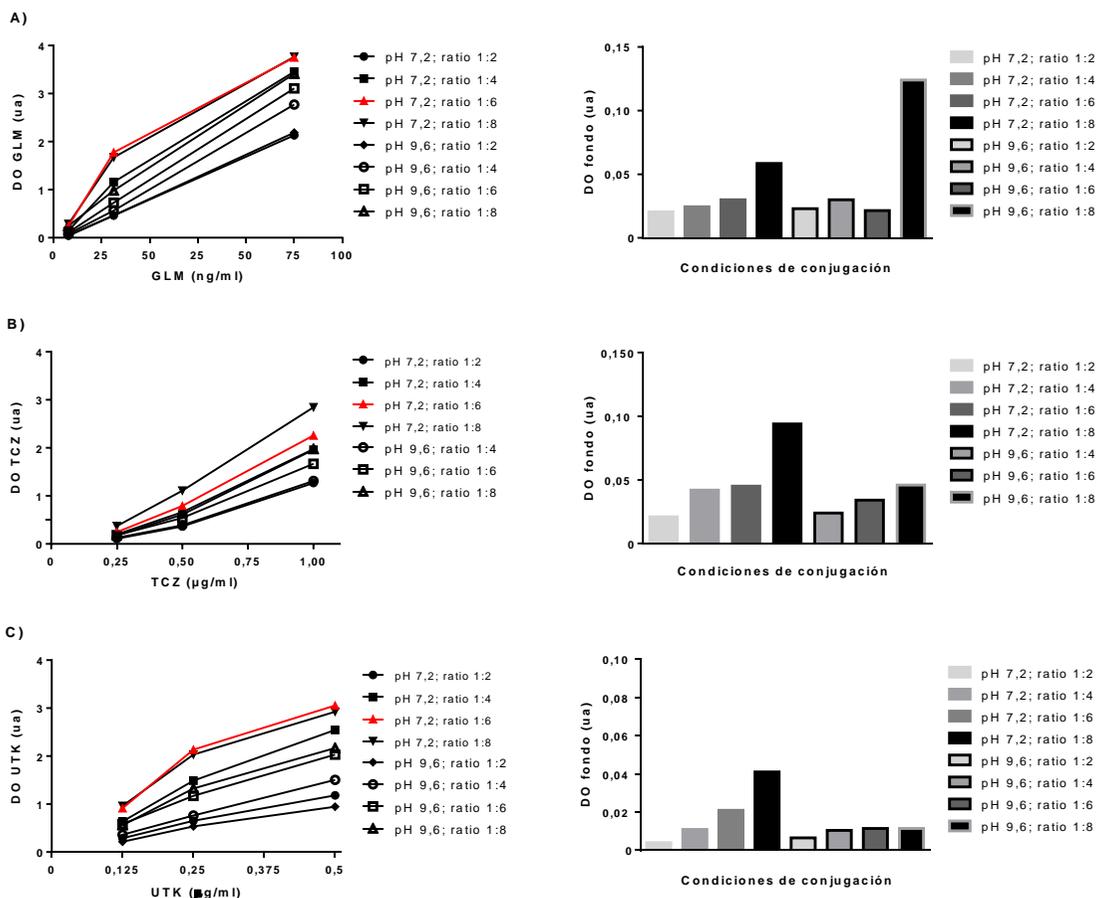


Figura 4.11. Selección del pH y de la relación molar AcM:HRP para los inmunoensayos de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. En rojo se indica la condición seleccionada.

En los 3 inmunoensayos de inmunogenicidad se seleccionó el mismo pH y relación molar. Las intensidades de señal más altas se obtuvieron con el sistema de detección preparado a pH 7,2 y con la relación molar 1:8 para la cual la intensidad de señal del fondo se encontraba por debajo de 0,1 ua. En el caso del inmunoensayo de anti-UTK la condición pH 9,6 con ratio 1:8 ofreció resultados ligeramente superiores con un fondo inferior a 0,1 ua pero superior al obtenido para el pH 7,2 a la misma relación molar. Debido a esto, y por unificación de los protocolos, se seleccionó la condición con el pH 7,2 y ratio 1:8 para los 3 inmunoensayos de inmunogenicidad (figura 4.12).

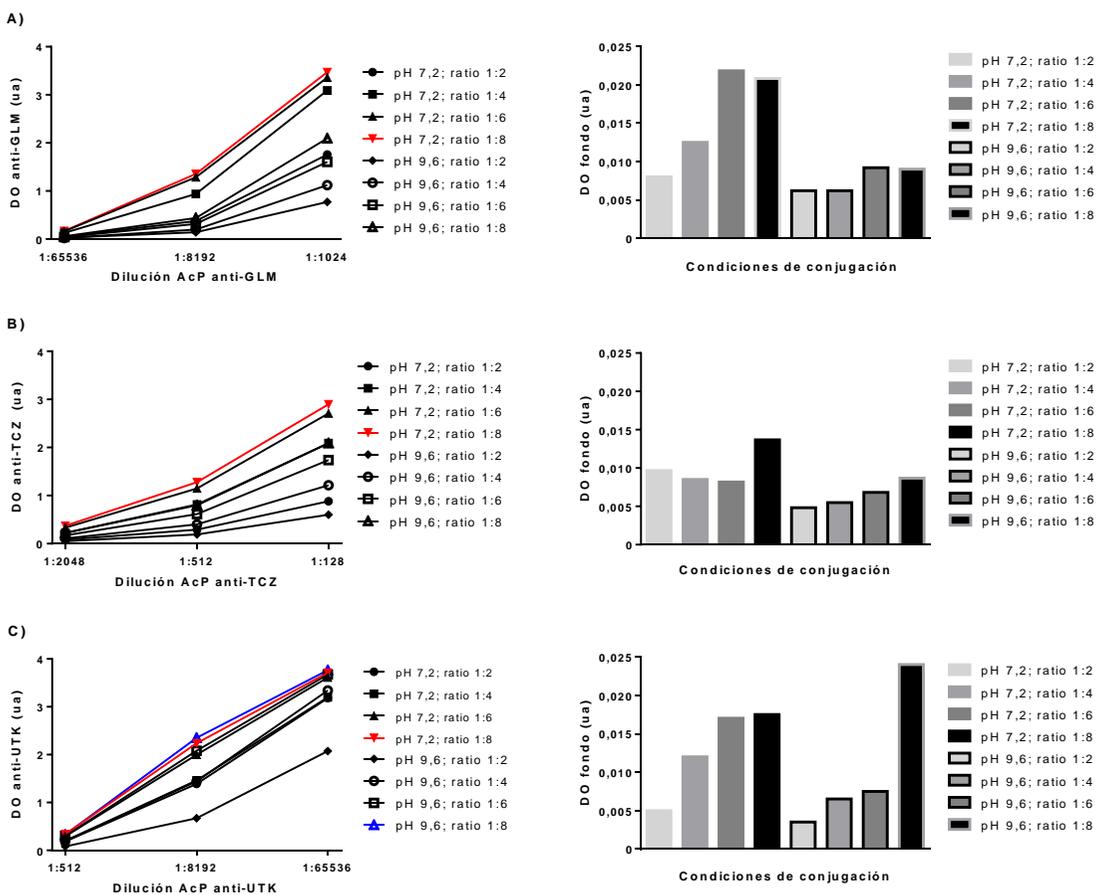
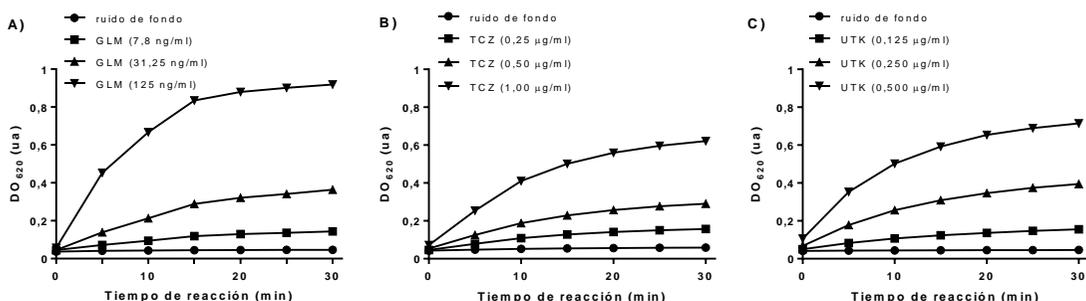


Figura 4.12. Selección del pH y de la relación molar fármaco:HRP para los inmunoensayos de inmunogenicidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. En azul se indica la mejor condición aparente y en rojo la condición seleccionada.

Otro parámetro que puede alterar la intensidad de señal es el tiempo de reacción del enzima HRP con su sustrato (TMB), por lo que se realizó una **cinética de reacción enzimática** registrando la aparición del producto coloreado formado ( $DO_{620}$ ) durante media hora a intervalos de 5 min.



**Figura 4.13.** Cinética de la degradación enzimática del TMB en los inmunoensayos de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. Se registró la aparición del producto coloreado formado tras la degradación del TMB ( $DO_{620}$ ) durante media hora a intervalos de 5 min.

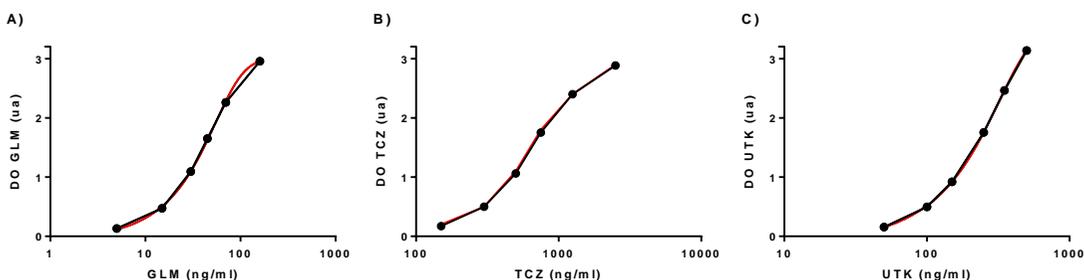
En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM, a tiempos posteriores a 15 min de incubación no se observó un aumento importante de la señal para ninguna de las tres concentraciones de GLM analizadas permaneciendo el ruido de fondo constante durante toda la cinética (**figura 4.13.A**) por lo que se estableció este tiempo como el óptimo para alcanzar la máxima señal en la detección de GLM.

En los inmunoensayos de biodisponibilidad de TCZ y de UTK, no se observó saturación de la señal en ningún momento durante los 30 min de incubación permaneciendo el ruido de fondo constante durante toda la cinética (**figura 4.13.B,C**), por lo que se estableció este tiempo como el óptimo para alcanzar una señal adecuada en la detección de TCZ y de UTK.

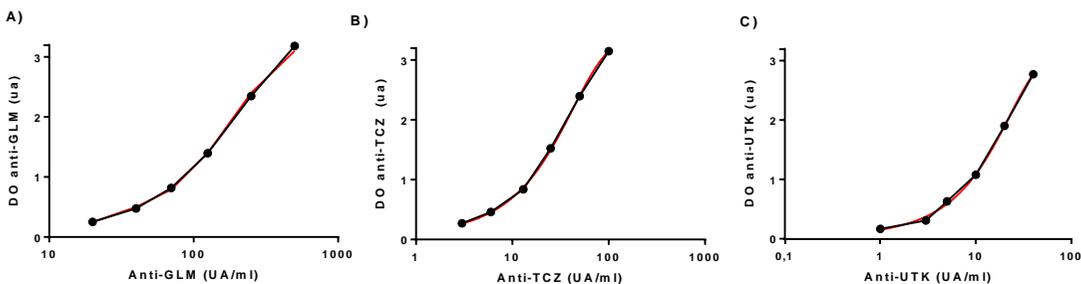
Para detectar anticuerpos antifármaco en una muestra con niveles bajos y poder obtener una intensidad de señal fácilmente distinguible del ruido de fondo, no se analizó la cinética enzimática de la degradación del TMB en los inmunoensayos de inmunogenicidad pero se estableció el tiempo de incubación en el máximo aceptable (30 min) teniendo en consideración no alargar excesivamente el tiempo empleado para la realización del inmunoensayo ELISA por parte del usuario final. Además, disponemos de experiencia comercial de otros productos Promonitor para la determinación de la

inmunogenicidad en los que también se ha seleccionado un tiempo de 30 minutos para alcanzar una DO de 3.0 ua.

A continuación se seleccionó la **curva de calibrado**. Se prepararon diferentes curvas de calibrado, por dilución seriada, cada una de ellas con 6 calibradores (CAL-A, B, C, D, E, F; de mayor a menor concentración). Se utilizó como control de calidad del inmunoensayo un CN con el tampón de dilución. Antes de comenzar con la selección de la curva de calibrado de los inmunoensayos de inmunogenicidad se cuantificaron los AcP antifármaco de los sueros inmunes de conejo en colaboración con el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos) para poder trabajar con unidades arbitrarias de concentración (UA/ml). La concentración de AcP anti-GLM fue de 1.335.668 UA/ml, la de AcP anti-TCZ de 23.040 UA/ml y la de AcP anti-UTK de 455.000 UA/ml. Las curvas de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad y de inmunogenicidad se muestran en la **figura 4.14** y **figura 4.15** respectivamente, y los parámetros asociados se recogen en la **tabla 4.4** y **tabla 4.5**.



**Figura 4.14.** Curvas de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. Se representan las curvas descritas por la unión de los 6 calibradores (—) preparados en el tampón de dilución (siendo CAL-A el de mayor concentración y CAL-F el de menor) y las curvas ajustadas a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (—).



**Figura 4.15.** Curvas de calibrado de los inmunoensayos de inmunogenicidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK. Se representan las curvas descritas por la unión de los 6 calibradores (—) preparados en el tampón de dilución (siendo CAL-A el de mayor concentración y CAL-F el de menor) y las curvas ajustadas a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (—).

**Tabla 4.4. Análisis de las curvas de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad.** DO<sub>450</sub>-DO<sub>620</sub>, DO; no aplica, n/a.

<b>[GLM]<sub>teórica</sub> (ng/ml)</b>	<b>DO GLM (ua)</b>	<b>[GLM]<sub>experimental</sub> (ng/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
CAL-A = 160	2,959	159	100
CAL-B = 70	2,263	70	101
CAL-C = 45	1,653	45	100
CAL-D = 30	1,095	30	99
CAL-E = 15	0,473	15	102
CAL-F = 5	0,132	5	96
CN = 0	0,032	<5	n/a
<b>[TCZ]<sub>teórica</sub> (ng/ml)</b>	<b>DO TCZ (ua)</b>	<b>[TCZ]<sub>experimental</sub> (ng/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
CAL-A = 2500	2,886	2.492	100
CAL-B = 1250	2,467	1.250	100
CAL-C = 750	1,754	753	100
CAL-D = 500	1,062	496	99
CAL-E = 300	0,492	305	102
CAL-F = 150	0,173	146	97
CN = 0	0,033	<150	n/a
<b>[UTK]<sub>teórica</sub> (ng/ml)</b>	<b>DO UTK (ua)</b>	<b>[UTK]<sub>experimental</sub> (ng/ml)</b>	<b>Recuperación(%)</b>
CAL-A = 500	3,139	499	100
CAL-B = 350	2,465	352	101
CAL-C = 250	1,756	248	99
CAL-D = 150	0,921	150	100
CAL-E = 100	0,497	100	100
CAL-F = 50	0,157	50	99
CN= 0	0,053	<50	n/a

**Tabla 4.5. Análisis de las curvas de calibrado de los inmunoensayos de inmunogenicidad.** DO<sub>450</sub>-DO<sub>620</sub>, DO; no aplica, n/a.

<b>[anti-GLM]<sub>teórica</sub> (UA/ml)</b>	<b>DO anti-GLM (ua)</b>	<b>[anti-GLM]<sub>experimental</sub> (UA/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
CAL-A = 500	3,183	499	100
CAL-B = 250	2,348	251	100
CAL-C = 125	1,395	124	99
CAL-D = 70	0,818	70	101
CAL-E = 40	0,475	41	102
CAL-F = 20	0,253	19	97
CN = 0	0,025	<20	n/a

<b>[anti-TCZ]<sub>teórica</sub> (UA/ml)</b>	<b>DO anti-TCZ (ua)</b>	<b>[anti-TCZ]<sub>experimental</sub> (UA/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
CAL-A = 100	3,147	100	100
CAL-B = 50	2,395	50	100
CAL-C = 25	1,525	25	100
CAL-D = 13	0,839	12	100
CAL-E = 6	0,459	6	101
CAL-F = 3	0,271	3	99
CN = 0	0,045	<3	n/a

<b>[anti-UTK]<sub>teórica</sub> (UA/ml)</b>	<b>DO anti-UTK (ua)</b>	<b>[anti-UTK]<sub>experimental</sub> (UA/ml)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
CAL-A = 40	2,773	40	100
CAL-B = 20	1,902	20	101
CAL-C = 10	1,079	10	96
CAL-D = 5	0,631	5	106
CAL-E = 3	0,308	2	98
CAL-F = 1	0,166	1	98
CN = 0	0,037	<1	n/a

Para los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad el límite superior se estableció en una concentración ligeramente superior a aquella concentración para la cual se había observado una DO alrededor de 3,0 ua. El límite inferior vino determinado por la intensidad de señal del calibrador de menor concentración (CAL-F) estableciéndose una intensidad mínima de CAL-F = 0,1 ua y un valor mínimo de CAL-F/NC = 2. La curva final de calibrado debía cumplir además 2 premisas: i) los 6 calibradores debían describir una curva que se ajustara a un modelo de regresión

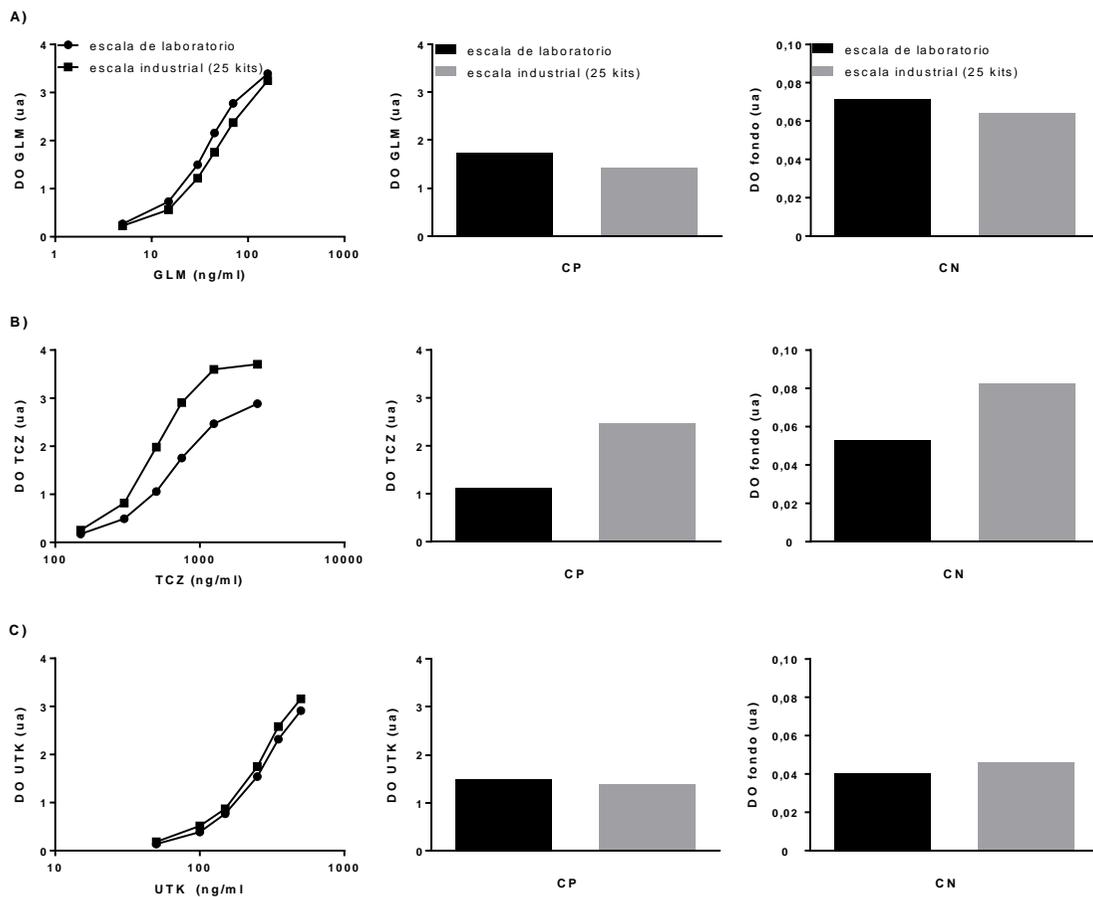
logística de 4 parámetros (4 PL) y ii) el porcentaje de recuperación de las concentraciones experimentales de fármaco o de anticuerpos antifármaco con respecto al valor teórico para cada calibrador debía estar comprendido entre el 80% y el 120%.

Además de los 6 calibradores y del CN descrito con anterioridad, los productos de la línea Promonitor incluyen un control positivo (CP) localizado entre las concentraciones de los calibradores CAL-C y CAL-D.

Para verificar la funcionalidad de las curvas de calibrado seleccionadas se procedió al **escalado industrial** de los componentes específicos del inmunoensayo (placas pretapizadas, curva de calibrado, CP, CN y sistema de detección) en las mismas condiciones en las que serán fabricados en el Departamento de Producción para su posterior comercialización como producto integrado en un kit para diagnóstico *in vitro*. Para los inmunoensayos de biodisponibilidad se hizo el escalado al tamaño industrial de 25 kits mientras que para los de inmunogenicidad se hizo adicionalmente un escalado previo de 10 kits en base a la experiencia con otros productos Promonitor.

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM, la curva de calibrado con los reactivos escalados presentó un ligero descenso en la intensidad de señal pero dicha variación fue aceptable al ser el promedio de los 6 calibradores inferior al 20% (CV  $14\% \pm 2\%$ ). Los valores de CP y CN no presentaron diferencias, por lo tanto con el escalado se mantenía el cumplimiento de los criterios establecidos para el CP ( $DO\ CAL-D < DO\ CP < DO\ CAL-C$ ) y para el CN ( $DO < 0,1\ ua$ ) (**figura 4.16.A**).

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de UTK, el escalado no afectó a la curva de calibrado del inmunoensayo (CV  $7\% \pm 4\%$ ) cuyo comportamiento se mantuvo constante independientemente de la magnitud de fabricación de los reactivos específicos del mismo, no observándose por lo tanto diferencias en las curvas ni en los valores de CP ni CN (**figura 4.16.C**).



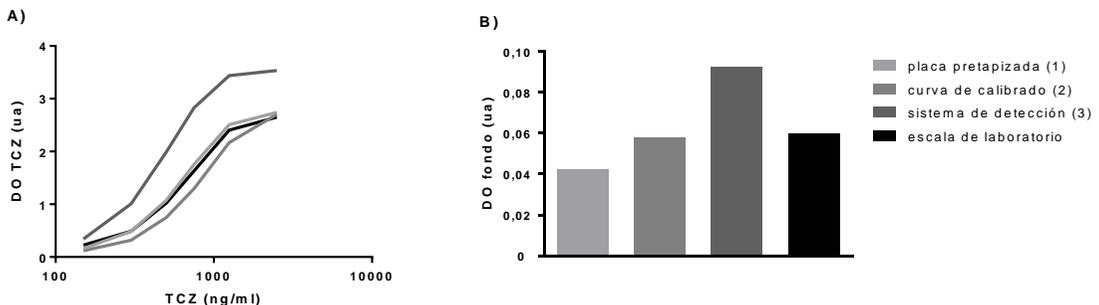
**Figura 4.16. Comportamiento de las curvas de calibrado de los inmunoensayos de biodisponibilidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK a escala industrial.** Comparación de las curvas de calibrado y de la intensidad de la señal ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de los controles de calidad (CP y CN) obtenidos a escala industrial con los obtenidos a escala de laboratorio. El CP se fabrica por dilución del CAL-A y el CN es #AA-1+NHS.

En el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ, la curva escalada se llevó a cabo con otro lote de TCZ 20 mg/ml (lote 2) distinto al lote 1 de TCZ utilizado durante el proceso previo de optimización ya que no había volumen suficiente del lote 1 para realizar el escalado industrial de la curva. Los resultados mostraron que con los reactivos escalados se obtenían intensidades de señal de curva más altas que con los reactivos a escala de laboratorio e incluso se saturaba la señal a partir del CAL-B. Los valores de CP y CN también aumentaron con el escalado (**figura 4.16.B**). Para identificar la causa del incremento en las intensidades de señal en el escalado se fue analizando cada uno de los 3 componentes fabricados a escala industrial (placas pretapizadas, curva de calibrado y

sistema de detección) con los otros 2 restantes fabricados a escala de laboratorio, de manera que la combinación fue la siguiente:

1. Placa pretapizada a escala industrial + curva de calibrado con TCZ lote 1 a escala de laboratorio + sistema de detección a escala de laboratorio.
2. Placa pretapizada a escala de laboratorio + curva de calibrado con TCZ lote 2 a escala industrial + sistema de detección a escala de laboratorio.
3. Placa pretapizada a escala de laboratorio + curva de calibrado con TCZ lote 1 a escala de laboratorio + sistema de detección a escala industrial.

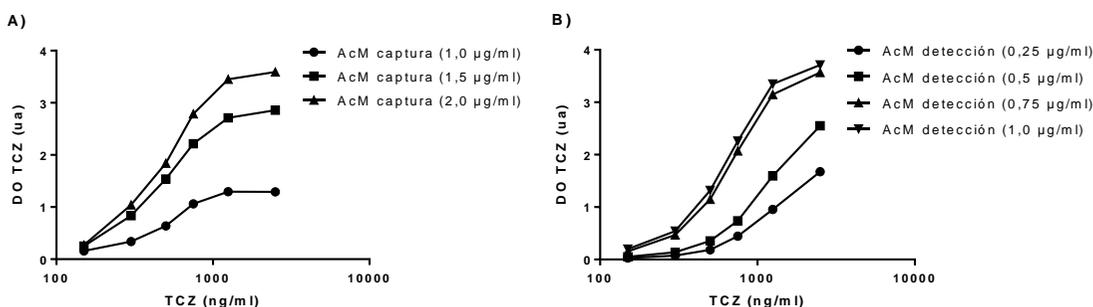
La introducción de la placa pretapizada a escala industrial (1) no provocó variación en la intensidad de la señal respecto a la obtenida con todos los componentes a escala de laboratorio, sin embargo, sí se observó un aumento de la señal cuando el componente fabricado a escala industrial fue el sistema de detección (3) y un ligero descenso de la señal cuando el componente escalado fue la curva de calibrado (2) (**figura 4.17**). Se trató por tanto de reoptimizar estos 2 componentes: el sistema de detección y la curva de calibrado.



**Figura 4.17. Efecto del escalado industrial de cada componente del inmunoensayo sobre la curva de calibrado y sobre el ruido de fondo.** Se representa (A) la intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de TCZ (curvas de calibrado) y (B) la DO de los fondos obtenidos utilizando todos los componentes preparados a escala de laboratorio a excepción de un único componente a escala industrial (placa pretapizada, curva de calibrado o sistema de detección) y utilizando todos los componentes a escala de laboratorio.

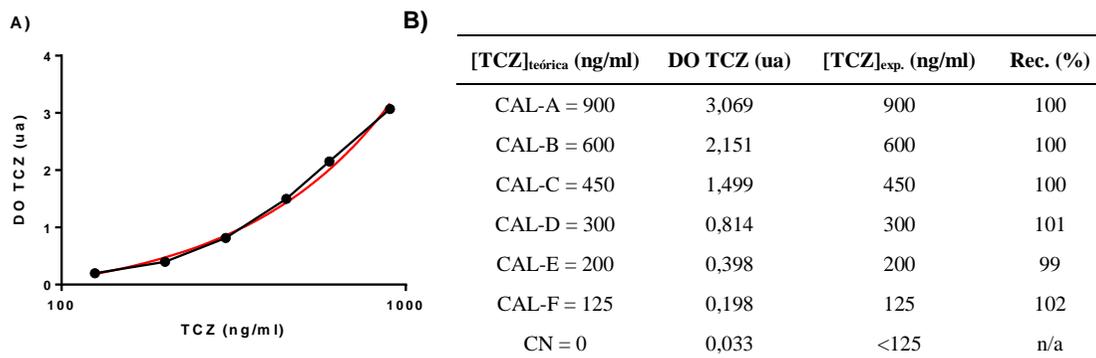
En primer lugar se procedió a la reoptimización de las concentraciones de los AcM de detección y, por lo tanto, de los AcM de captura. Se observó que, a medida que disminuía la concentración del AcM de captura manteniendo fija la del AcM de detección (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ), disminuían

las señales de la curva de calibrado, sin embargo, se mantenía la saturación de la señal a partir del CAL-B (**figura 4.18.A**). Cuando se mantuvo fija la concentración de captura ( $2,0 \mu\text{g/ml}$ ) se observó que a concentraciones del AcM de detección inferiores a  $0,75 \mu\text{g/ml}$ , se producía un descenso de la señal y pérdida de la saturación pero el calibrador más bajo (CAL-F) presentaba intensidades de señal por debajo del límite permitido de  $0,1 \text{ ua}$  (**figura 4.18.B**).



**Figura 4.18.** Titulación de los AcM de captura y de detección para el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ tras el escalado industrial. Se representa la intensidad de la señal de detección ( $\text{DO}_{450} - \text{DO}_{620}$ , DO) de TCZ (curvas de calibrado) a distintas concentraciones de los AcM de captura y de detección, manteniendo fija (A) la concentración del AcM de detección ( $1,0 \mu\text{g/ml}$ ) y (B) la concentración del AcM de captura ( $2,0 \mu\text{g/ml}$ ).

Por lo tanto, al no solucionar el aumento de la señal de la curva de calibrado observado con el lote 2 de TCZ con la variación de las concentraciones de los AcM de detección y de captura, se procedió a reevaluar la curva de calibrado. La nueva curva de calibrado debía tener una concentración máxima para el calibrador mayor entre  $750 \text{ ng/ml}$  (CAL-C) y  $1250 \text{ ng/ml}$  (CAL-B) (alrededor de una DO de  $3,0 \text{ ua}$ ) (**figura 4.16.B**) y una concentración mínima para el calibrador menor (CAL-F) que proporcionase una DO por encima de  $0,1 \text{ ua}$ . Teniendo en cuenta que la concentración del calibrador menor analizada en la curva anterior fue de  $150 \text{ ng/ml}$  (**tabla 4.4**) se probaron concentraciones inferiores. En la **figura 4.19** se muestra la curva de calibrado finalmente analizada.



**Figura 4.19.** Curva de calibrado del inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ. (A) Se representa la curva descrita por la unión de los 6 calibradores (—●—) preparados en el tampón de dilución (siendo CAL-A el de mayor concentración y CAL-F el de menor) y la curva ajustada a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (—). (B) Análisis de la curva de calibrado de TCZ. DO<sub>450</sub>-DO<sub>620</sub>, DO; no aplica, n/a; exp., experimental; Rec., recuperación.

Una vez seleccionada la nueva curva de calibrado de TCZ preparada con el lote 2 se procedió al **escalado industrial** con el lote 1 pero en este caso solamente se escaló el calibrador de mayor concentración (900 ng/ml).

**Tabla 4.6.** Efecto del escalado del volumen y de la forma de preparación del CAL-A (900 ng/ml) sobre la señal de detección.

V (ml) CAL-A (900 ng/ml)	DO TCZ (ua)	
	TCZ (1 mg/ml)	TCZ (20 mg/ml)
0,3	1,744	1,758
1,5	1,731	1,461
15	1,655	1,658
44,5	1,979	1,551
75	1,724	1,523
100	1,709	1,303
208	1,717	1,613

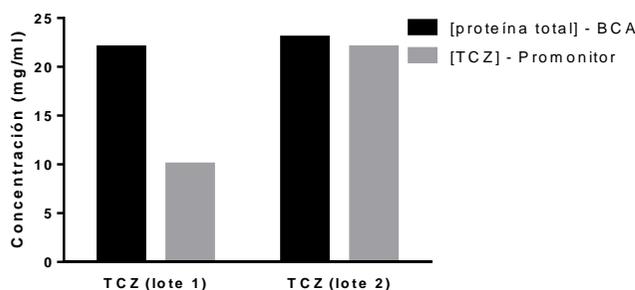
A la vista de estos resultados se procedió a cuantificar el calibrador (900 ng/ml) preparado a distintos volúmenes y a partir de ambas disoluciones de TCZ procedentes del lote 1. Para ello se empleó una curva de calibrado preparada con una muestra de suero de un/a paciente tratado/a con

TCZ, previamente referenciada por Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Los resultados revelaron que las muestras tenían una concentración de TCZ inferior a la teórica (**tabla 4.7**), por lo que se procedió a analizar la funcionalidad del lote 1 de TCZ por comparación con el lote 2.

**Tabla 4.7. Cuantificación del CAL-A (900 ng/ml) de la curva de calibrado del inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ.** La curva de calibrado realizada con una muestra de referencia cubría un rango de concentraciones de TCZ desde 58 ng/ml hasta 5,0 µg/ml. La concentración observada corresponde a la media obtenida entre las 2 formas de preparación del CAL-A (a partir de 20 mg/ml y 1 mg/ml) y el porcentaje de recuperación se calculó con respecto a la concentración teórica de 900 ng/ml.

V (ml) CAL-A (900 ng/ml)	DO TCZ (ua)	[TCZ] <sub>experimental</sub> (ng/ml)	Recuperación (%)
0,3	1,513	386	43
15,0	1,456	377	42
44,5	1,441	374	42
75,0	1,355	360	40
100,0	1,253	343	38
208,0	1,369	362	40

Al comienzo del estudio de la funcionalidad del lote 1 de TCZ se descubrió la presencia de contaminación en el vial del lote 1 de TCZ. Se confirmó como contaminación microbiana de origen fúngico al microscopio óptico por lo que se procedió a su eliminación mediante filtración a través de un filtro de tamaño nominal de poro de 0,22 µm.

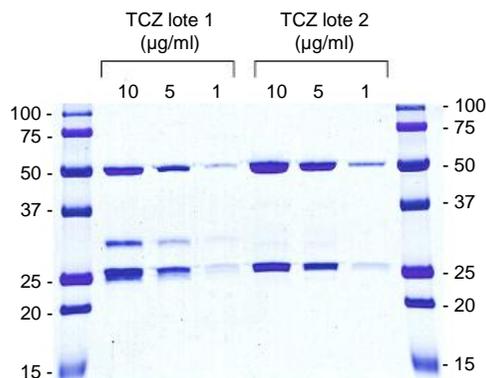


**Figura 4.20. Análisis de la concentración de proteína total y de TCZ de los 2 lotes utilizados.** La concentración de proteína total se determinó con el kit BCA de Pierce y la de TCZ con el inmunoensayo Promonitor desarrollado utilizando como curva de calibrado la preparada a partir de una muestra de paciente referenciada por Sanquin.

A continuación se investigó la posible relevancia de esta contaminación en los resultados incongruentes encontrados hasta el momento. Para ello, se determinó la concentración de proteína total en el vial de fármaco con el kit BCA de Pierce (EEUU) y la concentración de TCZ con el inmunoensayo Promonitor desarrollado pero usando como curva de calibrado la preparada a partir de la muestra anterior referenciada por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin. Se observó que la concentración de proteína total del lote 1 correspondía a la teórica (20 mg/ml), sin embargo, la concentración de TCZ era un 50 % inferior, mientras que en el lote 2 se obtuvieron los resultados esperados (**figura 4.20**).

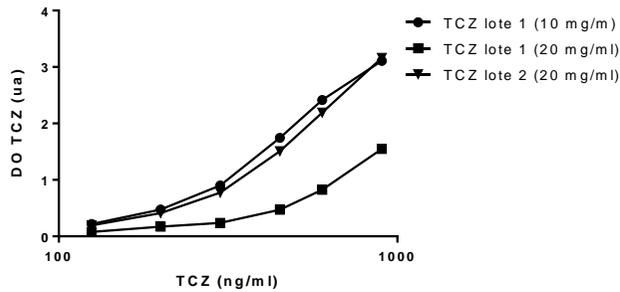
En el lote 1 de TCZ la concentración de proteína total correspondía a la concentración teórica pero la concentración funcional de TCZ fue menor. En el lote 2 toda la proteína presente correspondía a TCZ funcional. Sospechando que la presencia del hongo en el lote 1 de TCZ podría haber producido la degradación parcial de TCZ, se estudió la pureza de la disolución del fármaco por SDS-PAGE para comparar los patrones electroforéticos de ambos lotes de TCZ.

El resultado de la electroforesis únicamente mostró una nueva banda de proteínas entre 25 y 37 KDa en la muestra del lote 1 de TCZ que podría ser del fragmento F(ab')<sub>2</sub> de TCZ generado por degradación del TCZ en ese lote. Además, las bandas correspondientes a TCZ (25 y 50 KDa) fueron menos intensas en lote 1 que en lote 2 para cada una de las concentraciones aplicadas de TCZ (**figura 4.21**).



**Figura 4.21. Análisis de la pureza de los 2 lotes de TCZ por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.** Se representa el patrón electroforético de TCZ del lote 1 y 2 a distintas concentraciones tras tinción del gel con azul brillante de Coomassie. En ambos extremos del gel se incluyó el mismo marcador de pesos moleculares.

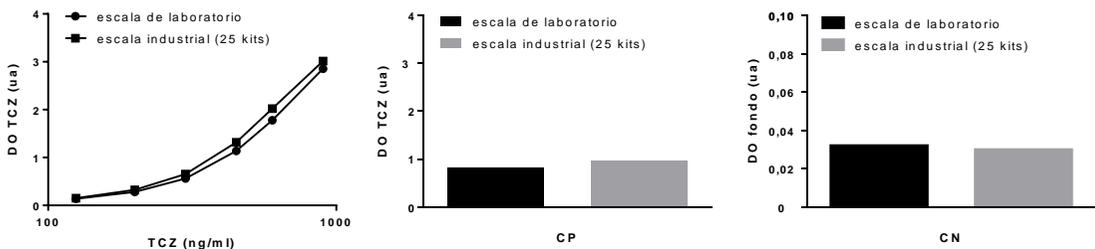
Para corroborar los resultados obtenidos se preparó la curva de calibrado de TCZ con el lote 1 suponiendo una concentración origen de 10 mg/ml (calculada con Promonitor) y una concentración teórica de TCZ de 20 mg/ml.



**Figura 4.22. Curvas de calibrado del inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ preparadas a partir de los 2 lotes de TCZ.** Se representa la intensidad de la señal de detección (DO<sub>450</sub> – DO<sub>620</sub>, DO) de TCZ (curvas de calibrado) preparadas con el lote 1 suponiendo una concentración de 10 mg/ml y de 20 mg/ml y preparada con el lote 2 (20 mg/ml).

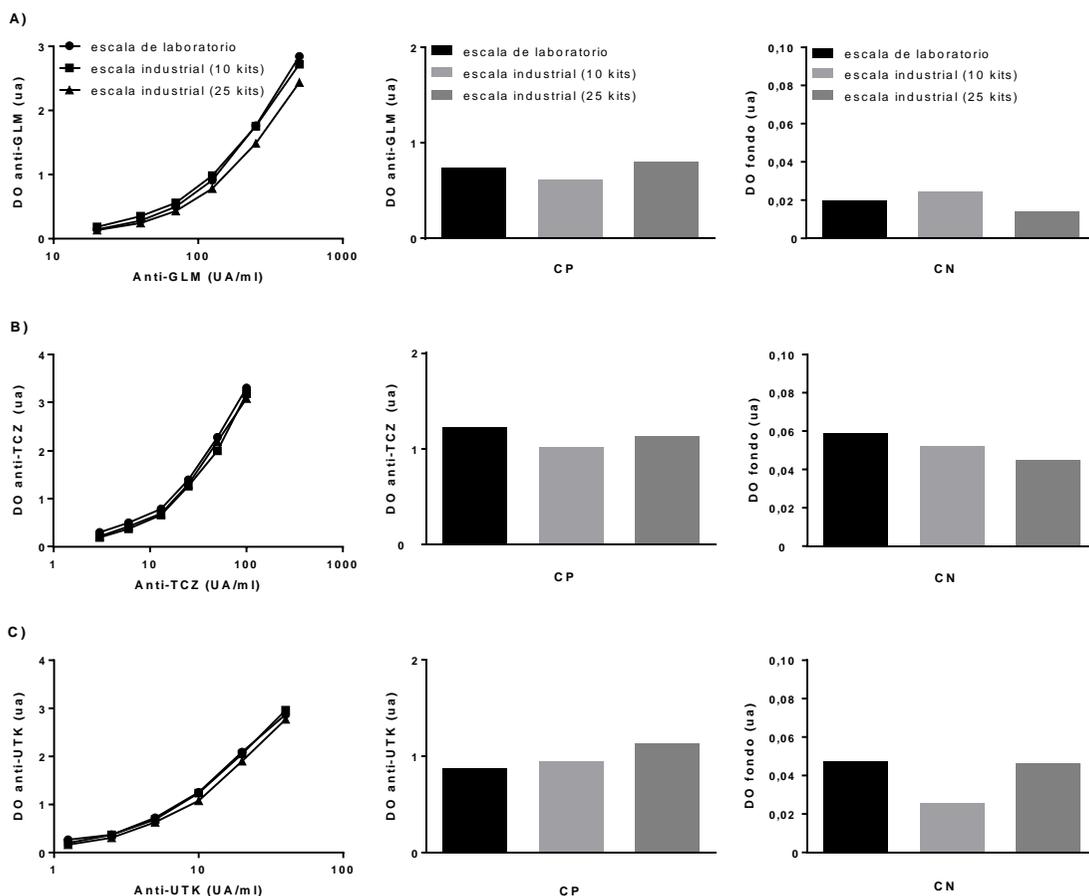
Los resultados obtenidos confirmaron lo visto anteriormente, la concentración de TCZ del lote 1 era un 50% inferior a la teórica, ya que la curva de TCZ obtenida con el lote 1 a una concentración de 10 mg/ml se comportaba como la obtenida con el lote 2 a 20 mg/ml (**figura 4.22**).

Tras verificar la concentración comprometida del lote 1 de TCZ que justificaba que los valores de DO de la curva de calibrado fuesen menores que los obtenidos para la curva preparada a partir del lote 2, se descartó definitivamente ese lote y se procedió al escalado industrial de las placas pretapizadas, de la nueva curva de calibrado, del CP, del CN y del sistema de detección con el lote 2 de TCZ (**figura 4.23**).



**Figura 4.23. Comportamiento de la curva de calibrado del inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ a escala industrial.** Comparación de las curvas de calibrado y de la intensidad de la señal (DO<sub>450</sub> – DO<sub>620</sub>, DO) de los controles de calidad (CP y CN) obtenidos a escala industrial con los obtenidos a escala de laboratorio. El CP se fabrica por dilución del CAL-A y el CN es #AA-1+NHS. Tanto los calibradores como el CP se prepararon a partir del lote 2 de TCZ.

Para los inmunoensayos de inmunogenicidad de GLM, TCZ y UTK no se encontraron diferencias entre las condiciones a escala de laboratorio y a escala industrial para las curvas de calibrado (**figura 4.24**).



**Figura 4.24. Comportamiento de las curvas de calibrado de los inmunoensayos de inmunogenicidad de (A) GLM, (B) TCZ y (C) UTK a escala industrial.** Comparación de las curvas de calibrado y de la intensidad de la señal (DO<sub>450</sub> – DO<sub>620</sub>, DO) de los controles de calidad (CP y CN) obtenidos a escala industrial con los obtenidos a escala de laboratorio. El CP se fabrica por dilución de CAL-A y el CN es #SA-1+NHS. Para la preparación de las placas pretapizadas y del sistema de detección del inmunoensayo de TCZ se utilizó el lote 2 para ambas escalas.

El último paso de la optimización fue establecer las **diluciones de muestra** para los inmunoensayos, ya que debido al reducido rango dinámico inherente a los ensayos ELISA, conviene diluir las muestras antes de emplearlas en el ensayo para poder determinar así un mayor rango de

concentraciones en el suero de los/as pacientes. Por otra parte, el empleo de muestras sin diluir podría provocar el llamado “efecto gancho” por el que concentraciones de fármaco muy elevadas provocan la saturación del sistema, dando lugar a resultados falsamente bajos. Con el fin de cubrir el mayor rango de concentración, se seleccionan dos diluciones de muestra con una zona de solapamiento, es decir, el rango de concentración cubierto por cada una de las diluciones debía solaparse parcialmente.

Para el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM, se prepararon 14 muestras de NHS a las que se añadió GLM a concentraciones comprendidas entre 32  $\mu\text{g/ml}$  (concentración máxima cuantificable por la curva seleccionada suponiendo una dilución máxima de 1:200 que es la empleada en otros inmunoensayos de biodisponibilidad desarrollados por Progenika Biopharma, a Grifols Company) y 10  $\text{ng/ml}$  (concentración mínima cuantificable por la curva seleccionada suponiendo la dilución mínima de 1:2) (**tabla 4.4**). Asimismo, cada una de esas muestras se diluyó 2, 4, 20, 40 y 80 veces, para seleccionar posteriormente las 2 diluciones más adecuadas. Con el fin de conseguir el mayor rango cuantificable posible con una zona de solapamiento entre las 2 diluciones a seleccionar, se escogieron las diluciones 1:4 y 1:80 con las que se pudieron cuantificar concentraciones entre 0,02 - 0,64  $\mu\text{g/ml}$  y entre 0,4 - 12,80  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. El intervalo total teórico de medida fue por lo tanto de 0,02 - 12,80  $\mu\text{g/ml}$  con una mayor exactitud y precisión para la cuantificación de concentraciones comprendidas en la zona de solapamiento que cubría el intervalo de 0,40 - 0,64  $\mu\text{g/ml}$ . Con el fin de comprobar que las diluciones seleccionadas eran adecuadas, se enviaron muestras de pacientes con EspA procedentes del Servicio de Reumatología del HULP a referenciar por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Se estudió la distribución de los niveles de GLM en la población determinando los percentiles P5 y P95 y se comprobó que el 95% de la población de pacientes con niveles detectables de GLM presentaba unos niveles por debajo de 3,20  $\mu\text{g/ml}$ , concentración cuantificable con las diluciones seleccionadas en el inmunoensayo desarrollado, y sólo el 5% por debajo de 0,20  $\mu\text{g/ml}$ , límite inferior cuantificable, por lo tanto, se podría cuantificar las concentraciones del 90% de los/as pacientes.

Para el inmunoensayo de biodisponibilidad TCZ, se prepararon 3 muestras de TCZ en NHS a las concentraciones de 10, 35 y 200  $\mu\text{g/ml}$  y cada una de ellas a su vez se diluyó de manera independiente para abarcar distintos rangos de concentración. El primer grupo comprendía 10 concentraciones bajas de TCZ (0 - 10  $\mu\text{g/ml}$ ) que se analizaron con diluciones menores (1:4, 1:5 y 1:10), el segundo comprendía 10 concentraciones intermedias de TCZ (2 - 35  $\mu\text{g/ml}$ ) que se

analizaron con diluciones intermedias (1:25, 1:30 y 1:35) y el tercero comprendía 10 concentraciones altas de TCZ (10 - 200 µg/ml) que se analizaron con diluciones mayores (1:100 y 1:200). Los resultados de los análisis se muestran en la **tabla 4.8**.

**Tabla 4.8. Selección de las diluciones de muestra para el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ.** Se muestran los rangos teórico y experimental de cuantificación de TCZ para cada dilución. El rango cuantificado corresponde al porcentaje de rango experimental cuantificado respecto al teórico. (En negrita se indican los máximos rangos cuantificados para cada grupo de diluciones).

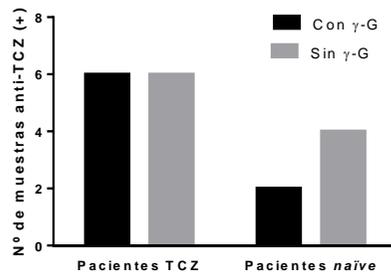
Grupo de muestras	Dilución	Rango teórico (µg/ml)		Rango experimental (µg/ml)		Rango cuantificado
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	
<b>0 - 10 µg/ml</b>	<b>1:4</b>	<b>0,5</b>	<b>3,6</b>	<b>0,5</b>	<b>3</b>	<b>81%</b>
	1:5	0,625	4,5	0,625	3	61%
	1:10	1,25	9	3	8	65%
<b>2 - 35 µg/ml</b>	1:25	3,125	22,5	5	20	77%
	1:30	3,75	27	5	25	86%
	<b>1:35</b>	<b>4,375</b>	<b>31,5</b>	<b>5</b>	<b>31,5</b>	<b>98%</b>
<b>10 - 200 µg/ml</b>	1:100	12,5	90	12,5	50	48%
	<b>1:200</b>	<b>25</b>	<b>180</b>	<b>25</b>	<b>170</b>	<b>94%</b>

Las 3 diluciones con las que se obtenía un mayor rango cuantificado (porcentaje del rango experimental cuantificado respecto al teórico) fueron 1:4, 1:35 y 1:200 pero con ninguna de las combinaciones de estas diluciones (1:4 y 1:35; 1:4 y 1:200; y 1:35 y 1:200) se obtenía una zona de solapamiento experimental, con la consiguiente pérdida de precisión y exactitud en la determinación de las concentraciones incluidas en dicha zona. Con el fin de seleccionar el par de diluciones más adecuado para la cuantificación de TCZ, se enviaron muestras de pacientes con AR procedentes del Servicio de Reumatología del HULP a referenciar por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Se estudió la distribución de los niveles de TCZ en la población determinando los percentiles P10 y P85 y se observó que el 85% de la población de pacientes con niveles detectables de TCZ presentaba niveles por debajo de 21,50 µg/ml, concentración cuantificable con las diluciones seleccionadas en el inmunoensayo desarrollado, y solo el 10% por debajo de 1,10 µg/ml, límite inferior cuantificable, por lo tanto, se podría cuantificar las concentraciones del 75% de los/as pacientes. Estos valores de concentración de TCZ (1,10 – 21,50 µg/ml) estaban dentro del rango cuantificable con la dilución 1:30 y 1:5 con un solapamiento teórico y un rango teórico total de cuantificación de 0,625 - 27 µg/ml (**figura 4.19**).

Para el inmunoensayo de biodisponibilidad de UTK, se analizaron muestras de la población de pacientes del Servicio de Dermatología del HUB a las diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:30, 1:50, 1:100 y 1:200 para seleccionar el par de diluciones con el que la cuantificación fuera más exacta y precisa. Todas las muestras analizadas fueron cuantificadas con diluciones iguales o menores a 1:10 por lo que se seleccionaron las diluciones 1:2 y 1:10. Con el fin de comprobar que las diluciones seleccionadas eran adecuadas, se enviaron muestras procedentes del Servicio de Dermatología del HUB a referenciar por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Se estudió la distribución de los niveles de UTK en la población determinando los percentiles P25 y P95 y se comprobó que el 95% de la población de pacientes con niveles detectables de UTK presentaba unos niveles por debajo de 1,27  $\mu\text{g/ml}$ , concentración cuantificable con las diluciones seleccionadas en el inmunoensayo desarrollado, y el 25% por debajo de 0,10  $\mu\text{g/ml}$ , límite inferior cuantificable, por lo tanto, se podría cuantificar las concentraciones del 70% de los/as pacientes (**tabla 4.4**).

En los inmunoensayos de inmunogenicidad se establecieron las diluciones estándar de 1:2 y 1:10 de otros inmunoensayos de inmunogenicidad desarrollados por Progenika Biopharma, a Grifols Company, para la detección temprana de anticuerpos antifármaco. Para averiguar si las diluciones seleccionadas eran adecuadas se analizaron las muestras de los/as pacientes tratados con GLM, TCZ y UTK del HULP y del HUB con Promonitor y a través del Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos) y conocer así el comportamiento de los inmunoensayos de inmunogenicidad con muestras reales. Durante estos análisis se obtuvieron muestras positivas para anticuerpos anti-TCZ, anti-UTK y anti-GLM. Los resultados proporcionados por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos) no fueron discrepantes con los resultados de Promonitor para anticuerpos anti-UTK ni para anti-GLM. Sin embargo, en el caso de anti-TCZ, Sanquin reportó todas las muestras como negativas, lo que indicaría la obtención de falsos positivos con Promonitor, ya que de las 59 muestras de pacientes con AR en tratamiento con TCZ que se analizaron por Promonitor, 12 resultaron ser positivas para anticuerpos anti-TCZ. Teniendo en cuenta que no se observó disminución de la señal de cada muestra con la dilución de las mismas se analizó el efecto del tampón de dilución (#AA-1, HPE, UCDB, DBS-C) por si el #SA-1 estuviera interfiriendo en la especificidad de detección. Sin embargo, se obtuvieron los mismos falsos positivos. Además, se encontraron falsos positivos en muestras de pacientes con patologías reumáticas que nunca estuvieron en tratamiento con TCZ e incluso en muestras de NHS comerciales. Por lo tanto, se procedió a tratar las muestras con exceso de gammaglobulina ( $\gamma\text{-G}$ ) por si la interferencia proviniera del FR presente que pudiera

unirse a TCZ y/o a TCZ-HRP y dar falsos positivos (Aarden y cols. 2008). Para ello, se añadió gammaglobulina ( $\gamma$ -G) a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  al tampón #SA-1 con el que se preparó la curva de calibrado (+ NHS) y se diluyeron el sistema de detección y las muestras. Se analizaron las muestras positivas para anticuerpos anti-TCZ y muestras de pacientes sin tratamiento con TCZ (pacientes *naïve*). No se encontraron diferencias en la cuantificación de las muestras de los/as pacientes con TCZ y el 50% de las muestras de los/as pacientes *naïve* se negativizaron con la adición de  $\gamma$ -G (**figura 4.25**).

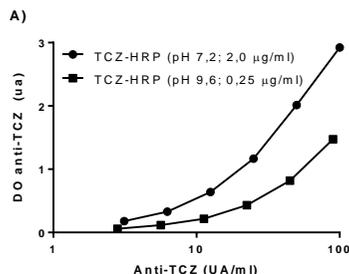


**Figura 4.25. Efecto de la  $\gamma$ -G sobre la determinación de falsos positivos para anticuerpos anti-TCZ.** Se analizaron por Promonitor 11 muestras falsos positivos de pacientes con AR en tratamiento con TCZ procedentes del Servicio de Reumatología del HULP y 6 muestras de pacientes *naïve*. Las muestras se diluyeron con gammaglobulina ( $\gamma$ -G) a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  en el tampón #SA-1 con el que también se preparó la curva de calibrado (+ NHS) y se diluyó el sistema de detección.

Al no eliminar los falsos positivos con el pretratamiento de las muestras con  $\gamma$ -G se modificó la concentración y el pH durante la preparación del sistema de detección para conseguir que la DO de las muestras falsos positivos fuese menor que la DO del CAL-F de la curva de calibrado.

Teniendo en cuenta que la intensidad de la señal de anti-TCZ observada fue menor con el sistema de detección preparado a pH 9,6 (**figura 4.12.B**), se escogió este pH y se probaron además distintas concentraciones de TCZ-HRP (0,25  $\mu\text{g/ml}$  - 2,0  $\mu\text{g/ml}$ ) (resultados no mostrados).

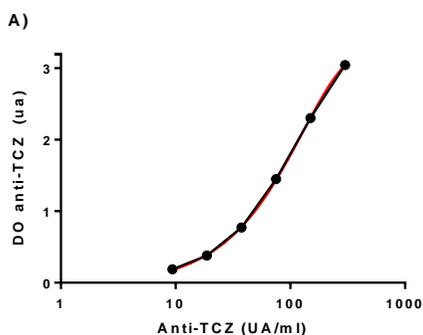
Se escogió la concentración de TCZ-HRP de 0,25  $\mu\text{g/ml}$  y pH = 9,6 por obtenerse con estas condiciones los menores valores de DO, reportando como negativas las 12 muestras de los/as pacientes tratados/as con TCZ (falsos positivos) y 40 muestras de pacientes *naïve* y NHS (verdaderos negativos) (**figura 4.26**).



TCZ-HRP (1:8)	Falsos (+)		Verdaderos (-)	
	+	-	+	-
pH 7,2; 2,0 µg/ml	11	0	9	31
pH 9,6; 0,25 µg/ml	0	11	0	40

**Figura 4.26. Curva de calibrado del inmunoensayo de inmunogenicidad de TCZ con el sistema de detección a distintas condiciones.** (A) Intensidad de la señal de detección ( $DO_{450} - DO_{620}$ , DO) de TCZ (curvas de calibrado) con el sistema de detección preparado a pH 7,2 y con una concentración de TCZ-HRP de 2,0 µg/ml y preparado a pH 9,6 y con una concentración de TCZ-HRP de 0,25 µg/ml. (B) Muestras reportadas en función de las condiciones del sistema de detección a una relación molar de 1:8.

A partir de estos resultados se establecieron las condiciones finales del inmunoensayo de inmunogenicidad de TCZ, siendo las concentraciones de los AcM de captura y de detección de 0,25 µg/ml con el sistema de detección preparado a un pH de 9,6 y a una relación molar de 1:8, para las cuales se había conseguido eliminar los falsos positivos de las muestras de pacientes con y sin tratamiento con TCZ e incluso de las muestras de las distintas matrices de NHS.



[Anti-TCZ] <sub>teórica</sub> (UA/ml)	DO anti-TCZ (ua)	[Anti-TCZ] <sub>exp.</sub> (UA/ml)	Rec. (%)
300	3,045	300	100
150	2,302	150	100
75	1,448	75	100
38	0,772	38	100
19	0,380	19	100
9	0,188	9	100
0	0,024	<9	n/a

**Figura 4.27. Curva de calibrado definitiva del inmunoensayo de inmunogenicidad de TCZ.** (A) Se representa la curva descrita por la unión de los 6 calibradores (—) preparados en el tampón de dilución (siendo CAL-A el de mayor concentración y CAL-F el de menor) y la curva ajustada a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (—). (B) Análisis de la curva de calibrado de anti-TCZ.  $DO_{450} - DO_{620}$ , DO; no aplica, n/a; exp., experimental; Rec., recuperación.

El siguiente paso fue reelegir la curva de calibrado con las nuevas condiciones para conseguir que la DO del CAL-A fuese aproximadamente 3,0 ua, que la del CAL-F fuese > 0,1 ua,

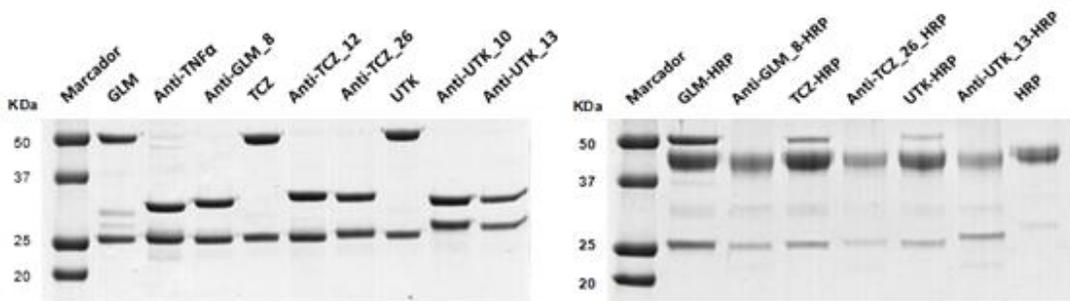
que el ratio CAL-F/NC fuese  $\geq 2$ , que los calibradores se ajustasen a un modelo de regresión logística de 4 parámetros (4PL) y que el porcentaje de recuperación de la concentración experimental de cada calibrador respecto a la teórica estuviese comprendido entre 80% y 120% (**figura 4.27**).

Las condiciones finales de optimización de cada uno de los inmunoensayos de determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco se recogen en la **tabla 4.9**.

**Tabla 4.9. Condiciones finales de optimización de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad de los fármacos.** \* El AcM de captura del inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM consiste en el inmunocomplejo anti-TNF $\alpha$  (2  $\mu\text{g/ml}$ ) unido con TNF $\alpha$  (0,01  $\mu\text{g/ml}$ ).

		Promonitor					
		GLM	TCZ	UTK	ANTI-GLM	ANTI-TCZ	ANTI-UTK
Pretapizado	AcM captura	Anti-TNF $\alpha$ – TNF $\alpha$ *	Anti-TCZ_12	Anti-UTK_10	GLM	TCZ	UTK
	Bloqueante	n/a	DBS-C	DBS-C	UCDB	DBS-C	DBS-C
	Estabilizante	StabDry	DBS-C	DBS-C	StabDry	DBS-C	DBS-C
	[AcM] captura	2 – 0,01 $\mu\text{g/ml}$ *	2 $\mu\text{g/m}$	2,25 $\mu\text{g/m}$	0,5 $\mu\text{g/m}$	0,25 $\mu\text{g/m}$	0,5 $\mu\text{g/m}$
Tampón de dilución		#AA-1+NHS	#AA-1+NHS	#AA-1+NHS	#SA-1+NHS	#SA-1+NHS	#SA-1+NHS
Sistema de detección	AcM detección	Anti-GLM_8	Anti-TCZ_26	Anti-UTK_13	GLM	TCZ	UTK
	[AcM] detección	0,75 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0,375 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,25 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
	pH AcM:HRP	7,2	7,2	7,2	7,2	9,6	7,2
	AcM:HRP	1:6	1:6	1:6	1:8	1:8	1:8
Cinética enzimática		15 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min
Curva de calibrado	CAL-A	160 ng/ml	900 ng/ml	500 ng/ml	500 UA/ml	300 UA/ml	40 UA/ml
	CAL-B	70 ng/ml	600 ng/ml	350 ng/ml	250 UA/ml	150 UA/ml	20 UA/ml
	CAL-C	45 ng/ml	450 ng/ml	250 ng/ml	125 UA/ml	75 UA/ml	10 UA/ml
	CAL-D	30 ng/ml	300 ng/ml	150 ng/ml	70 UA/ml	37,5 UA/ml	5 UA/ml
	CAL-E	15 ng/ml	200 ng/ml	100 ng/ml	40 UA/ml	18,75 UA/ml	2,5 UA/ml
	CAL-F	5 ng/ml	125 ng/ml	50 ng/ml	20 UA/ml	9,375 UA/ml	1,25 UA/ml
	CP	37,5 ng/ml	375 ng/ml	200 ng/ml	100 UA/ml	56 UA/ml	7,5 UA/ml
Diluciones de muestra	Menor	1:4	1:5	1:2	1:2	1:2	1:2
	Mayor	1:80	1:30	1:10	1:10	1:10	1:10

Establecidas las condiciones finales de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad se realizó una SDS-PAGE como control de la pureza de la materia prima utilizada. En la **figura 4.28.A** los fármacos presentan únicamente las bandas características correspondientes a las cadenas pesadas (50 KDa) y ligeras (25 KDa) (Parker y cols. 2016), sin embargo, en GLM se observaron 2 bandas muy débiles probablemente correspondientes a impurezas introducidas durante su producción. Los AcM antifármaco y el anti-TNF $\alpha$  en formato F(ab')<sub>2</sub> presentaron las bandas correspondientes a las cadenas ligeras intactas (25 KDa) y al estar desprovistas de la fracción Fc aparecieron las bandas correspondientes a las cadenas pesadas a menor peso molecular (30 KDa). En la **figura 4.28.B** se observa la pureza de la HRP con una banda a 44 KDa que también se observó en los anticuerpos conjugados con HRP además de las bandas de 50 KDa y de 25 KDa en los fármacos conjugados, y de 30 KDa y de 25 KDa en los AcM antifármaco conjugados.



**Figura 4.28. Análisis de la pureza de las proteínas seleccionadas para los inmunoensayos ELISA desarrollados.** Se cargaron 5  $\mu$ g de cada proteína en un gel de poliacrilamida al 12%, se separaron por electroforesis desnaturalizante y se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie.

#### 4.5. Estandarización de las unidades de los inmunoensayos de inmunogenicidad

Para determinar la relación existente entre las unidades arbitrarias (UA) obtenidas en el inmunoensayo de inmunogenicidad y la cantidad de AcP antifármaco presente, se midió la concentración de AcP antifármaco por el inmunoensayo Promonitor y la concentración de proteína total por BCA en las fracciones purificadas de AcP antifármaco obtenidas a partir del suero inmune de conejo.

Los parámetros que definieron el rendimiento global del proceso de purificación se dividieron en los 3 subprocesos secuenciales constituyentes: inmovilización del fármaco en el interior de la columna, reacción específica antígeno-anticuerpo y elución de los AcP antifármaco.

En primer lugar se calculó la eficiencia de acoplamiento del fármaco a la resina de la columna cromatográfica a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de acoplamiento del fármaco (\%)} = \frac{[\text{Fx}]_i - [\text{Fx}]_f}{[\text{Fx}]_i} \times 100$$

donde,

$[\text{Fx}]_i$  = concentración de fármaco añadido a la columna.

$[\text{Fx}]_f$  = concentración de fármaco no unido.

La eficiencia de acoplamiento de cada fármaco se calculó teniendo en cuenta que la mínima concentración cuantificable por el kit utilizado era de 25 µg/ml. En todos los casos la eficiencia de acoplamiento fue cercana al 100% (**tabla 4.10**).

**Tabla 4.10. Eficiencia de acoplamiento de los fármacos a la resina de la columna cromatográfica.**

Fármaco (Fx)	$\text{Fx}_i$ (µg/ml)	$\text{Fx}_f$ (µg/ml)	Eficiencia de acoplamiento (%)
GLM	564	<25	>96
TCZ	1.118	<25	>98
UTK	987	<25	>97

A continuación, se calculó la eficiencia de unión de los AcP al fármaco inmovilizado en la resina de la columna cromatográfica a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de unión de AcP (\%)} = \frac{[\text{AcP}]_i - [\text{AcP}]_f}{[\text{AcP}]_i} \times 100$$

donde,

$[AcP]_i$  = concentración de AcP de la muestra inicial de suero inmune de conejo.

$[AcP]_f$  = concentración de AcP no unidos.

La eficiencia de unión de los AcP antifármaco se calculó teniendo en cuenta que la mínima concentración cuantificable para AcP anti-GLM era 40 UA/ml, para anti-TCZ 18,75 UA/ml y para anti-UTK 2,5 UA/ml (**tabla 4.2**). En todos los casos se obtuvo una eficiencia de unión de los AcP al fármaco correspondiente del 100% (**tabla 4.11**).

**Tabla 4.11. Eficiencia de unión de los AcP al fármaco inmovilizado en el interior de la columna cromatográfica.**

AcP antifármaco	AcP <sub>i</sub> (UA/ml)	AcP <sub>f</sub> (UA/ml)	Eficiencia de unión (%)
Anti-GLM	667.834	<40	100
Anti-TCZ	11.520	<18,75	100
Anti-UTK	227.500	64	100

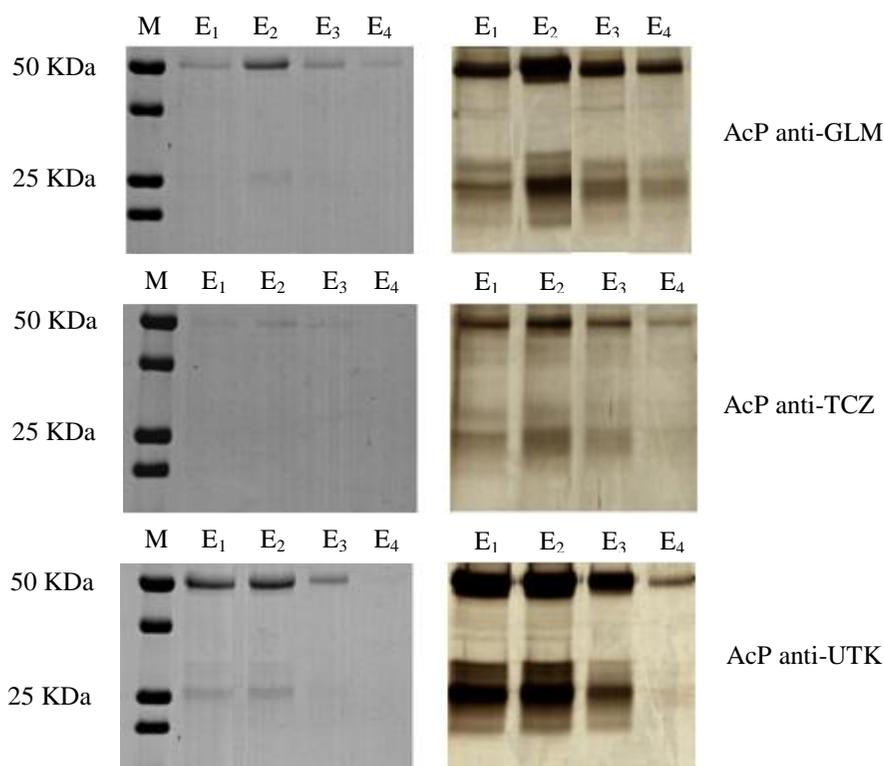
Comparando la concentración de cada eluato con respecto a la concentración inicial de la muestra de suero inmune a purificar, se calculó el rendimiento de elución de los AcP sumando los rendimientos de los 4 primeros eluatos.

Los rendimientos de elución de los AcP obtenidos fueron bastante bajos en comparación con las altas eficiencias de inmovilización de fármaco y de unión específica antígeno-anticuerpo obtenidas. No obstante, estos rendimientos fueron suficientes para poder establecer la relación entre ng de AcP purificado y UA (**tabla 4.12**).

**Tabla 4.12. Estandarización de las unidades de los inmunoensayos de inmunogenicidad.** Se determinaron las concentraciones de los AcP antifármaco por Promonitor (UA/ml) y por BCA (ng/ml), el rendimiento de elución y se calculó la relación entre UA y ng/ml.

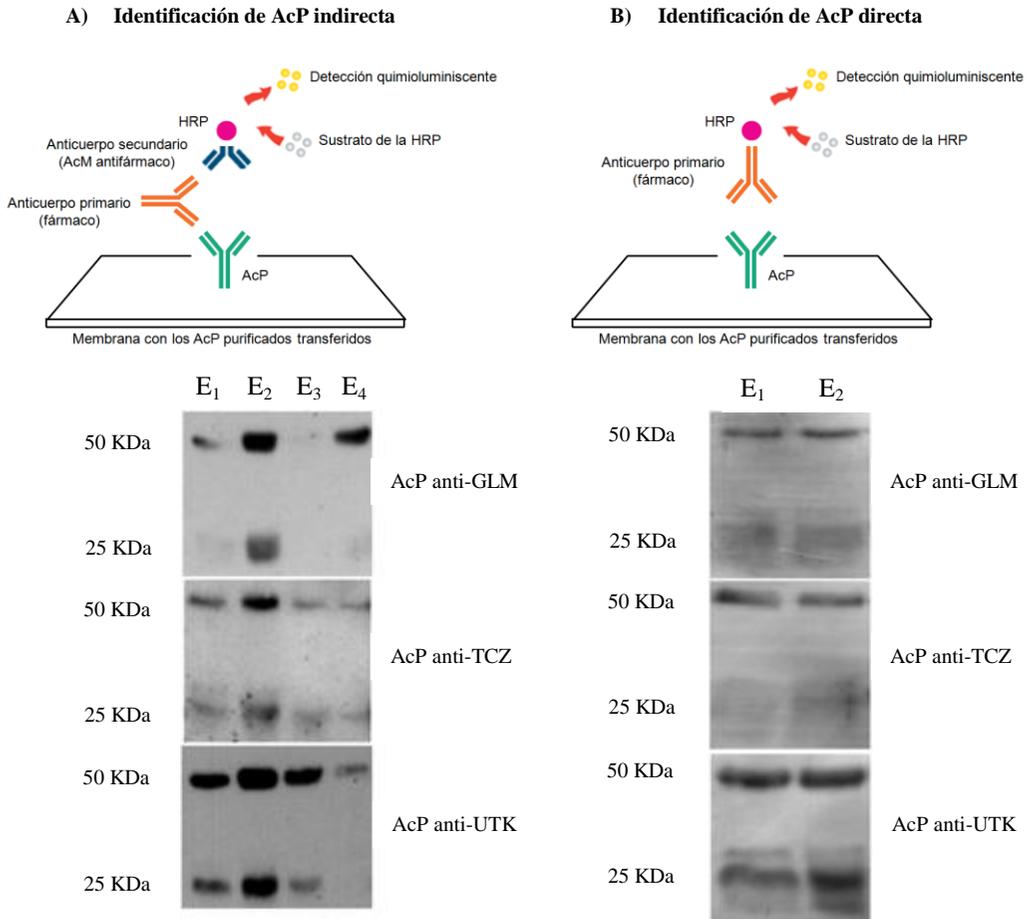
AcP antifármaco	Promonitor (UA/ml)	BCA (ng/ml)	Rendimiento elución (%)	1 UA (ng/ml)
Anti-GLM	56.347	23.000	8	0,39
Anti-TCZ	2.847	34.000	25	11,49
Anti-UTK	57.818	63.000	25	0,97

Paralelamente, se analizó la pureza de las fracciones purificadas de AcP antifármaco (**figura 4.29**).



**Figura 4.29. Análisis de la pureza de los AcP antifármaco purificados por SDS-PAGE.** Se determinó la pureza de las 4 fracciones purificadas eluidas consecutivamente de los AcP anti-GLM, anti-TCZ y anti-UTK. Se cargó el máximo volumen de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12%, se separaron por electroforesis desnaturalizante y se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie (*izquierda*) y con tinción de plata (*derecha*) de forma secuencial. El número del eluato corresponde al orden en el que se eluyó.

Se observará en las muestras de AcP purificados una banda discreta a 50 KDa correspondiente a las cadenas pesadas de los AcP y una banda más difusa a aproximadamente 25 KDa correspondiente a las cadenas ligeras de los mismos (Parker y cols. 2016). Aunque la tinción de plata, de mayor sensibilidad, reveló la presencia de otras proteínas, la concentración de éstas no fue relevante y consideramos aceptable la pureza de los eluatos obtenidos.



**Figura 4.30. Detección de las cadenas ligeras y pesadas de los AcP antifármaco por transferencia Western.** Representación esquemática del ensamblaje de anticuerpos sobre los AcP transferidos a la membrana de PDVF en la identificación indirecta y directa (*arriba*). Bandas de los AcP de la transferencia Western (*abajo*). El número del eluato corresponde al orden en el que se eluyó.

A continuación, se procedió a la identificación de las bandas mayoritarias por transferencia Western con identificación indirecta, es decir, utilizando los fármacos como anticuerpos primarios y los AcM antifármaco marcados con HRP como sistema de detección (anticuerpos secundarios) y con identificación directa, utilizando únicamente los fármacos marcados con HRP como sistema de detección.

Se confirmó la identidad de cada AcP antifármaco al observarse las bandas correspondientes por formación de los inmunocomplejos con los anticuerpos primario y secundario marcado (**figura 4.30.A**) y con el anticuerpo primario marcado (**figura 4.30.B**).

#### **4.6. Validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos**

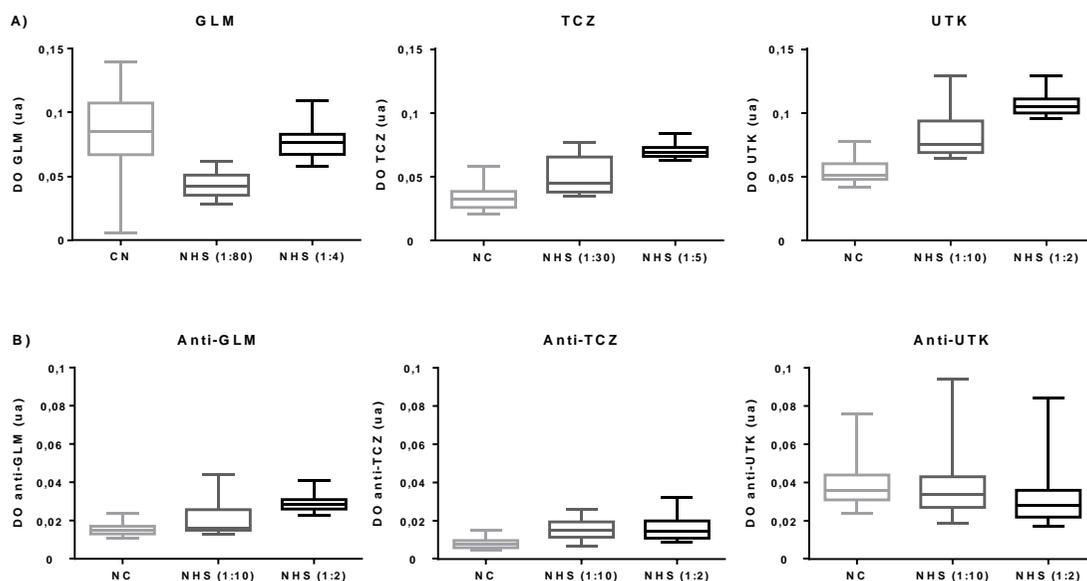
Los inmunoensayos desarrollados para la determinación de niveles de fármaco (biodisponibilidad) y de anticuerpos antifármaco (inmunogenicidad) fueron evaluados para confirmar que cumplieran con los requisitos necesarios para dispositivos de diagnóstico clínico *in vitro* definidos en las guías regulatorias CLSI. Las capacidades analíticas de los inmunoensayos se determinaron a través de los siguientes estudios: ruido de fondo, límite de cuantificación, linealidad, precisión y efectos interferentes.

##### **4.6.1. Ruido de fondo**

El ruido de fondo se define como la propiedad intrínseca del inmunoensayo ELISA que por su naturaleza proporciona una señal de fondo o ruido detectable cuando no hay analito en la muestra.

Con este parámetro se verifica que la contribución a la intensidad de señal se debe exclusivamente a la detección de analito y no a posibles uniones inespecíficas con la matriz de la muestra. Los resultados para los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad se muestran en la **figura 4.31**. Todas las muestras (CN y NHS a las 2 diluciones seleccionadas) se consideraron negativas para los 3 fármacos y anticuerpos antifármaco por presentar la mediana valores de

intensidad de señal por debajo a las intensidades obtenidas para el CAL-F en cada caso y ser además, inferiores a 0,1 ua.



**Figura 4.31. Ruido de fondo de los inmunoensayos de (A) biodisponibilidad e (B) inmunogenicidad.** Se representa la mediana de las 40 réplicas de muestra analizadas de CN y de NHS a las 2 diluciones seleccionadas para cada inmunoensayo, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo.

#### 4.6.2. Límite de cuantificación

Se estableció el límite de cuantificación (LoQ, *Limit of Quantitation*) de los inmunoensayos para la determinación de niveles de fármaco y anticuerpos antifármaco desarrollados, es decir, la mínima concentración de fármaco o anticuerpos antifármaco que pudo ser medida de manera fiable con respecto a unas premisas de exactitud y precisión establecidas (CLSI EP17-A2, 2012).

Para seleccionar las 3 concentraciones susceptibles de establecerse como el LoQ, se realizó un experimento preliminar con muestras de concentraciones comprendidas entre las del CAL-F y CAL-E multiplicadas por la menor dilución de muestra, para estrechar el rango de concentraciones candidatas y definir así de manera más precisa las 3 concentraciones idóneas para el análisis del LoQ de los inmunoensayos.

**Tabla 4.13. Selección preliminar de las concentraciones de fármaco y de anticuerpos antifármaco para el análisis del LoQ de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.** Se realizó un único análisis con 4 réplicas de muestra, un lote de NHS y un lote de reactivos. Se indica el número de réplicas que cumplía los criterios establecidos, la concentración teórica de la muestra, la concentración experimental como el promedio de las concentraciones de las réplicas válidas y el porcentaje de recuperación de los fármacos o anticuerpos antifármaco. Se resaltan en negrita las 3 concentraciones preseleccionadas para cada análisis del LoQ.

Fármaco	Nº réplicas válidas	[ ] <sub>teórica</sub> (µg/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (µg/ml)	Recuperación (%)
GLM	2	0,02	0,017	85
	3	0,025	0,018	72
	3	0,03	0,023	77
	4	<b>0,04</b>	0,035	88
	4	<b>0,05</b>	0,044	88
	4	<b>0,06</b>	0,053	88
TCZ	4	<b>0,625</b>	0,737	118
	4	<b>0,7</b>	0,780	111
	4	<b>0,775</b>	0,810	105
	4	0,85	1,008	119
	4	0,925	1,070	116
	4	1	1,100	110
UTK	2	0,1	0,116	116
	3	0,12	0,104	87
	4	<b>0,14</b>	0,131	94
	4	<b>0,16</b>	0,157	98
	4	<b>0,18</b>	0,165	92
	4	0,2	0,195	98
AcP antifármaco	Nº réplicas válidas	[ ] <sub>teórica</sub> (UA/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (UA/ml)	Recuperación (%)
Anti-GLM	4	<b>40</b>	42	105
	4	<b>45</b>	47	104
	4	<b>50</b>	51	102
	4	60	62	103
	4	70	73	104
	4	80	79	99
Anti-TCZ	0	18,75	<18,75	n/a
	1	20	18,12	91
	3	25	20,33	81
	4	<b>30</b>	25,88	86
	4	<b>35</b>	29,1	83
	4	<b>37,5</b>	32,91	88
AntiUTK	2	2,5	2,68	107
	4	<b>3</b>	3,01	100
	4	<b>3,5</b>	3,27	93
	4	<b>4</b>	3,71	93
	4	4,5	4,3	96
	4	5	4,81	96

Para poder considerar una concentración candidata para el análisis de LoQ se realizaron 4 réplicas de muestra de manera que todas ellas debían entrar en curva, es decir, el valor de intensidad de señal correspondiente a cada réplica debía ser superior a la intensidad de señal del CAL-F y obtenerse una recuperación respecto al valor teórico entre el 80% - 120%. En los casos en los que todas las muestras cumplieran con los criterios establecidos, se seleccionaron las 3 muestras de menor concentración (**tabla 4.13**).

**Tabla 4.14. Selección de las concentraciones de fármaco y de anticuerpos antifármaco para el análisis del LoQ de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.** Se realizaron 2 análisis en 2 días diferentes, con 3 réplicas de muestra, con 4 lotes de NHS y con 2 lotes de reactivos. Se indica el número de réplicas que cumplía los criterios establecidos, la concentración teórica de la muestr, la concentración experimental como el promedio de las concentraciones de las réplicas válidas y el porcentaje de recuperación de los fármacos o anticuerpos antifármaco. Se resalta en negrita la concentración finalmente seleccionada para cada análisis del LoQ.

Fármaco	Nº réplicas válidas	[ ] <sub>teórica</sub> (µg/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (µg/ml)	Recuperación (%)
GLM	48	<b>0,04</b>	0,037	93
	48	0,05	0,045	90
	48	0,06	0,052	87
TCZ	48	<b>0,625</b>	0,659	105
	48	0,700	0,789	113
	48	0,775	0,850	110
UTK	48	<b>0,140</b>	0,138	99
	48	0,160	0,146	91
	48	0,180	0,148	82
AcP antifármaco	Nº réplicas válidas	[ ] <sub>teórica</sub> (UA/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (UA/ml)	Recuperación (%)
Anti-GLM	43	40	59	148
	44	45	55	122
	48	<b>50</b>	60	120
Anti-TCZ	48	<b>30,00</b>	26,73	89
	48	35,00	30,79	88
	48	37,50	36,65	98
Anti-UTK	43	3,0	3,12	104
	48	<b>3,5</b>	3,24	93
	48	4,0	2,99	75

A continuación se prepararon de forma artificial (analito + NHS) las 3 muestras correspondientes para cada fármaco y anticuerpos antifármaco con 4 lotes distintos de NHS con el fin de simular la variabilidad intrínseca de la naturaleza de las muestras de suero de los/as pacientes. Se realizaron 2 análisis en 2 días diferentes y con 2 lotes de reactivos distintos y 3 réplicas de muestra.

En el caso de que las 3 muestras cumplieran los criterios establecidos, se seleccionó la de menor concentración para el análisis de LoQ (**tabla 4.14**).

Finalmente se procedió a confirmar la idoneidad de la única muestra seleccionada para establecerse cómo LoQ del inmunoensayo. Para ello se determinó el error total (ET) en base al modelo del error cuadrático o análisis de la varianza, a través de la siguiente fórmula:

$$ET = \sqrt{DE^2 + bias^2}$$

Donde DE es la desviación estándar del conjunto de réplicas y *bias* es el error sistemático para cada muestra expresado como la resta entre el promedio de la concentración obtenido experimentalmente y la concentración de referencia obtenida a través del servicio de análisis diagnóstico de Progenika Biopharma, a Grifols Company.

Tanto el *bias* como el ET se expresaron como porcentaje en relación al valor de referencia. Se obtuvo un valor de ET para cada muestra, con cada uno de los distintos lotes de NHS y con cada uno de los 2 lotes de reactivos utilizados por debajo del 20%. En el caso de que todas las concentraciones cumplieran los criterios, la concentración finalmente establecida como LoQ fue la de menor concentración obtenida con los 4 lotes de NHS y los 2 lotes de reactivos del inmunoensayo.

En la **tabla 4.15** se recogen los resultados obtenidos del análisis del LoQ.

**Tabla 4.15. Análisis del LoQ para los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.** Se indica la concentración teórica de la muestra, la concentración establecida para el LoQ, el porcentaje de recuperación de los fármacos y anticuerpos antifármacos y el porcentaje de ET expresado como el promedio obtenido con 4 lotes de NHS y 2 lotes de reactivos.

Fármaco	[ ] <sub>teórica</sub> (µg/ml)	LoQ (µg/ml)	Recuperación (%)	ET (%)
GLM	0,040	0,036	90	12
TCZ	0,625	0,638	102	15
UTK	0,140	0,131	94	14
AcP antifármaco	[ ] <sub>teórica</sub> (UA/ml)	LoQ (UA/ml)	Recuperación (%)	ET (%)
Anti-GLM	50	56	112	12
Anti-TCZ	30	28	93	6
Anti-UTK	3,5	3	86	9

### 4.6.3. Precisión

Se analizó la precisión de los inmunoensayos para la determinación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco en términos de precisión intraensayo (repetibilidad) y de precisión intradispositivo (precisión total).

Para el estudio de las precisiones de los inmunoensayos de biodisponibilidad se seleccionaron las concentraciones de los percentiles 25 (P25) y 75 (P75) de los valores de concentración de fármaco en las poblaciones de pacientes estudiadas y reportadas por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Para el estudio de las precisiones de los inmunoensayos de inmunogenicidad se seleccionaron 2 concentraciones representativas del rango lineal de cuantificación ( $C_1$  y  $C_2$ ).

Los parámetros del estudio fueron el CV de repetibilidad ( $CV_r$ ) para conocer la precisión intraensayo y el CV total ( $CV_T$ ) para conocer la precisión intradispositivo.

**Tabla 4.16. Análisis de la precisión intraensayo e intradispositivo de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.**

Fármaco	[ ] <sub>teórica</sub> (µg/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (µg/ml)	DE <sub>r</sub>	CV <sub>r</sub>	DE <sub>T</sub>	CV <sub>T</sub>
GLM	C <sub>25</sub> = 0,160	0,185	0,032	17,3%	0,027	14,6%
	C <sub>75</sub> = 4,000	4,774	0,594	12,4%	0,627	13,1%
TCZ	C <sub>25</sub> = 4,750	5,270	0,25	4,7%	0,428	8,1%
	C <sub>75</sub> = 19,000	21,540	0,75	3,5%	1,6	7,4%
UTK	C <sub>25</sub> = 0,201	0,196	0,012	6,1%	0,022	11,2%
	C <sub>75</sub> = 0,655	0,612	0,096	15,7%	0,105	17,2%
AcP antifármaco	[ ] <sub>teórica</sub> (UA/ml)	[ ] <sub>experimental</sub> (UA/ml)	DE <sub>r</sub>	CV <sub>r</sub>	DE <sub>T</sub>	CV <sub>T</sub>
Anti-GLM	C <sub>1</sub> = 75	73	4	5,2%	5	7,4%
	C <sub>2</sub> = 4000	3206	72	2,3%	186	5,8%
Anti-TCZ	C <sub>1</sub> = 50	50	2	3,2%	3	5,8%
	C <sub>2</sub> = 1250	1204	56	4,7%	89	7,4%
Anti-UTK	C <sub>1</sub> = 10	10	1	6,6%	1	13,7%
	C <sub>2</sub> = 300	300	12	3,9%	34	11,2%

Los resultados de los análisis de repetibilidad y de precisión total de los inmunoensayos de determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco se recogen en la **tabla 4.16**.

Los  $CV_r$  y  $CV_T$  en todos los casos se encontraron por debajo del 20%, lo que indica que la precisión intraensayo e intradispositivo respectivamente, de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad desarrollados fueron adecuadas.

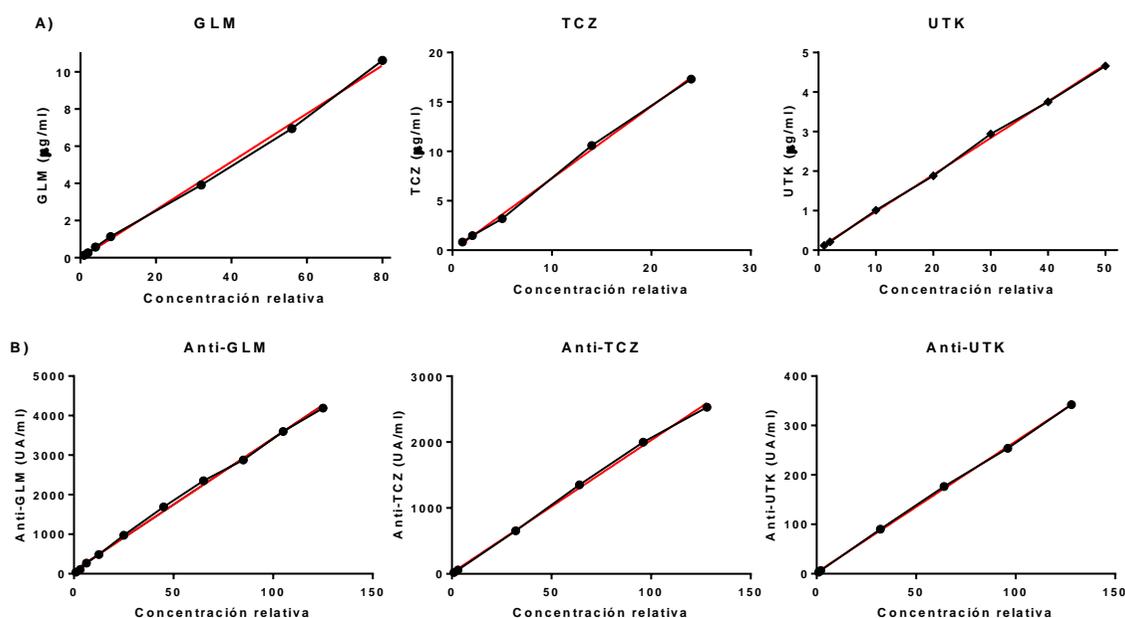
#### **4.6.4. Linealidad**

La determinación del rango lineal de los inmunoensayos para la determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco se llevó a cabo para definir el intervalo de concentraciones para las que, de manera más precisa y exacta, existe una relación directa entre la respuesta del instrumento de medida y la concentración de la muestra problema. Para ello se realizó un diseño experimental acorde con los requerimientos establecidos en la guía de regulación CLSI (CLSI EP06-A, 2003). Se analizaron muestras con diferentes concentraciones de fármaco o de anticuerpos antifármaco cubriendo todo el rango cuantificable definido por la curva de calibrado y las diluciones de muestra seleccionadas para cada caso. Se preparó una muestra por analito con concentración por encima del límite superior cuantificable y 8 diluciones a partir de ella de forma seriada para obtener concentraciones equidistantes hasta llegar a las concentraciones más bajas en las que se aplicó un factor de dilución 1:2. Además, la dilución de menor concentración se debía encontrar por debajo del límite inferior cuantificable. Adicionalmente se incluyó un CN. El estudio se llevó a cabo en un único día, con un único lote de reactivos y 4 réplicas por muestra.

Una vez seleccionadas las concentraciones de muestra, en las que todas las réplicas pudieron ser interpoladas en la curva de calibrado, se realizó un análisis de regresión polinómico para determinar el mejor ajuste de las concentraciones experimentales a una modelo lineal (línea recta), cuadrático (curva hiperbólica) o cúbico (curva sigmoidea). Partiendo de la hipótesis nula, es decir, que el conjunto de concentraciones propuesto no tenía una tendencia lineal, consideramos que existía linealidad cuando se observaban diferencias estadísticamente significativas entre el modelo lineal y el no lineal y además no existían diferencias estadísticamente significativas entre los modelos curvilíneos (cuadrático o cúbico) y el no lineal. Se determinaron los grados de libertad y se calculó la

$t$  de Student para un nivel de confianza del 95% según la tabla de distribución de valores de  $t$  (**anexo 2**).

En los casos en los que hubo diferencias significativas entre los modelos curvilíneos y el no lineal, se determinó el grado de no linealidad a través del cálculo de la diferencia entre las concentraciones predichas por el modelo no lineal de mejor ajuste y las concentraciones predichas por el modelo lineal. Se asumió linealidad cuando para todos los niveles de concentración se obtenía una diferencia inferior al 20%. En caso contrario, se reanalizaron los datos eliminando las concentraciones que con mayor probabilidad se desviaban de la linealidad por visualización gráfica o por encontrarse fuera del rango teórico de la curva de calibrado, hasta conseguir un conjunto de concentraciones de al menos 5 que cumpliera la linealidad.



**Figura 4.32.** Ajuste lineal del rango de concentraciones seleccionadas para el análisis de linealidad de los inmunoensayos de (A) biodisponibilidad e (B) inmunogenicidad. Se representa en el eje de ordenadas la concentración media experimental de las 4 réplicas de muestra y en el eje de abscisas la concentración relativa de cada concentración teórica respecto a la menor concentración del rango seleccionado. La curva de regresión lineal (—) representa el ajuste de los puntos de concentración a una línea recta.

Finalmente, con el rango lineal establecido, se calculó el porcentaje de la desviación estándar de repetibilidad por análisis de la varianza, para afirmar, en el caso de obtener un valor por debajo del 20%, que la precisión con la que se llevó a cabo el análisis para definir la linealidad fue adecuada.

En la **figura 4.32** se muestra gráficamente la linealidad de las concentraciones calculadas experimentalmente de los inmunoensayos para la determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco.

Los rangos lineales teóricos de los inmunoensayos para la determinación de niveles de fármaco y anticuerpos antifármaco fueron obtenidos con una precisión adecuada ( $DE_r \leq 20\%$ ) confirmando la correcta selección de los mismos (**tabla 4.17**).

**Tabla 4.17. Análisis de linealidad de los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.** Se representa el número de concentraciones con las que se realizó el análisis de linealidad, el rango lineal teórico de concentraciones y el porcentaje de la desviación estándar de repetibilidad.

Fármaco	Nº concentraciones para el análisis	Rango lineal teórico de concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	$DE_r$ (%)
GLM	7	0,1 – 8	6,8
TCZ	5	0,638 – 15	2,4
UTK	7	0,131 – 5	8,3
Anticuerpos antifármaco	Nº concentraciones para el análisis	Rango lineal teórico de concentraciones (UA/ml)	$DE_r$ (%)
Anti-GLM	9	56 – 5.000	1,7
Anti-TCZ	6	28 – 2.400	2,8
Anti-UTK	6	3 – 320	9,1

#### 4.6.5. Efectos interferentes

Para analizar la especificidad de los inmunoensayos de determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco se estudió el grado de susceptibilidad a sustancias potencialmente interferentes. Para los inmunoensayos de biodisponibilidad se analizaron 2 muestras representativas de las concentraciones de fármaco clínicamente relevantes, las concentraciones correspondientes al P25

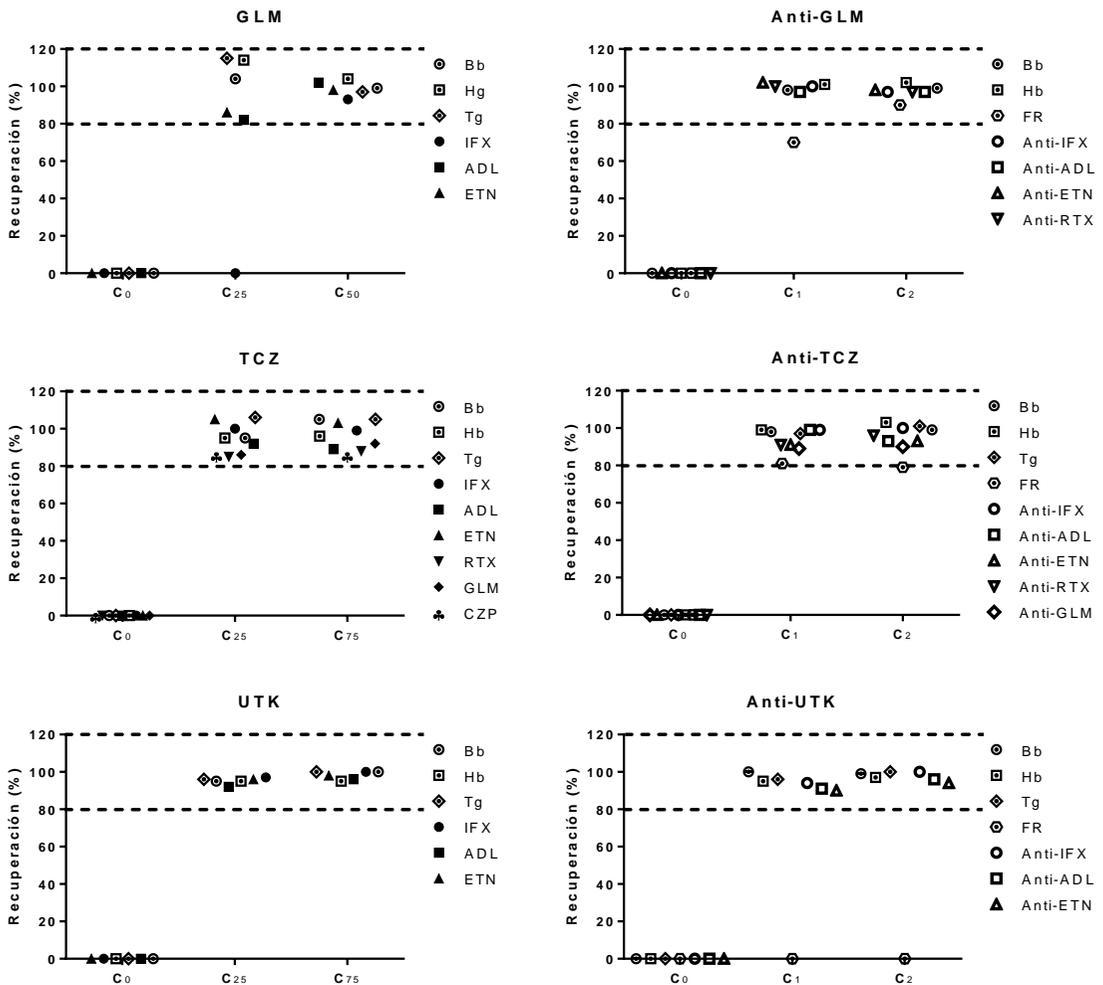
(C<sub>25</sub>) y al P75 (C<sub>75</sub>), excepto en el caso de GLM que se seleccionaron las concentraciones del P25 y del P50 (C<sub>50</sub>). Para los inmunoensayos de inmunogenicidad se analizaron 2 muestras con concentraciones comprendidas en la zona baja (C<sub>1</sub>) y en la zona alta (C<sub>2</sub>) del rango de cuantificación. En ambos tipos de inmunoensayos se incluyó adicionalmente una muestra negativa sin fármaco ni anticuerpos antifármaco (C<sub>0</sub>), todas ellas en presencia de las sustancias potencialmente interferentes elegidas.

El número de réplicas necesario para detectar efectos interferentes con un nivel de confianza y un poder estadístico del 95% en los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad depende del cociente entre el error sistemático en la medida que se considera clínicamente relevante ( $d_{\max}$ ) y la desviación estándar de repetibilidad (DE<sub>r</sub>) (**tabla 4.18**). En la **tabla 3.2 (ver apartado 3.2.13.5)** se relaciona la imprecisión expresada como múltiplo de la DE<sub>r</sub> y el número de réplicas necesarios para detectar el efecto interferente de dicha magnitud como tal. La desviación máxima permitida para considerar que no existe relevancia clínica se estableció de manera general en un 20% tal y como sugiere la FDA (*Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*).

**Tabla 4.18. Mínimo número de réplicas de muestra para el análisis de efectos interferentes en los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.**

Fármaco	[ ]teórica (µg/ml)	$d_{\max}$	DE <sub>r</sub>	$d_{\max}/DE_r$	nº réplicas
GLM	C <sub>25</sub> = 0,160	0,032	0,013	2,5	5
	C <sub>50</sub> = 0,500	0,114	0,044	2,6	5
TCZ	C <sub>25</sub> = 4,750	0,950	0,250	3,8	3
	C <sub>75</sub> = 19,00	3,800	0,750	5,1	3
UTK	C <sub>25</sub> = 0,201	0,040	0,012	3,3	3
	C <sub>75</sub> = 0,655	0,131	0,053	2,5	5
Anticuerpos antifármaco	[ ]teórica (UA/ml)	$d_{\max}$	DE <sub>r</sub>	$d_{\max}/DE_r$	nº réplicas
Anti-GLM	C <sub>1</sub> = 200	40	9	4	3
	C <sub>2</sub> = 4.000	800	72	11	3
Anti-TCZ	C <sub>1</sub> = 50	10	2	6	3
	C <sub>2</sub> = 1.250	250	56	4	3
Anti-UTK	C <sub>1</sub> = 10	2	1	3	3
	C <sub>2</sub> = 300	60	12	5	3

Aunque el número de réplicas necesario varió entre 3 y 5, se estableció un valor de 5 réplicas (máximo número de réplicas en otros estudios similares) para el análisis de efectos interferentes en todos los inmunoensayos.



**Figura 4.33. Efectos interferentes en los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad.** Se representa el promedio (5 réplicas) del porcentaje de recuperación de fármaco o de anticuerpos antifármaco en cada una de las 3 muestras analizadas en presencia de sustancias potencialmente interferentes: Bb, bilirrubina (500 mg/dl); Hb, hemoglobina (20 mg/dl); Tg, triglicéridos (3000 mg/dl); FR, factor reumatoide (25.000 UI/dl); IFX, infliximab; ADA, adalimumab; ETN, etanercept; RTX, rituximab; GLM, golimumab; CZP, certolizumab pegol ( $3 \times C_{\text{min}}\text{-SS}$ ); anticuerpos antifármaco (10.000 UA/ml).

Los resultados de los estudios de efectos interferentes se presentan a continuación como el porcentaje de recuperación de fármaco o de anticuerpos antifármaco en cada muestra y en presencia de cada interferente respecto al valor de la concentración experimental de cada muestra sin interferente. Para descartar un efecto interferente en la detección del analito el porcentaje de recuperación del mismo debía estar comprendido entre el 80-120% (**figura 4.33**).

En el inmunoensayo de GLM ninguna de las sustancias presentes en sangre (Hb, Bb y Tg) interfirió en la detección y cuantificación del fármaco en ninguna de las muestras positivas para GLM. Los otros fármacos biológicos con estructura y mecanismos de acción similares a GLM tampoco interfirieron excepto IFX en la muestra C<sub>25</sub> en la que no se recuperó nada del GLM presente. En el inmunoensayo de anticuerpos anti-GLM el único interferente fue el FR aunque solo se observó en la muestra de menor concentración (C<sub>1</sub>). Esta misma interferencia también se dio en las 2 muestras de anticuerpos anti-UTK en las que la presencia del FR enmascaró totalmente su detección.

#### **4.7. Correlación de Promonitor con otras metodologías disponibles**

En este estudio se evaluó la correlación y el grado de acuerdo entre Promonitor (PR) y otras tecnologías comerciales disponibles actualmente para la monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de GLM, TCZ y UTK. En la actualidad no existe un estándar de referencia, sin embargo, debido a la gran experiencia y al uso extendido de sus metodologías se seleccionaron los métodos ELISA y RIA para la determinación de niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco respectivamente, del Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (SQ) (Países Bajos) como comparador primario. En el caso del inmunoensayo para la determinación de niveles de TCZ y de anticuerpos anti-TCZ, adicionalmente, se incorporó un segundo comparador, el kit Lisa Tracker<sup>®</sup> (LT) de Theradiag, con tecnología ELISA para ambas determinaciones.

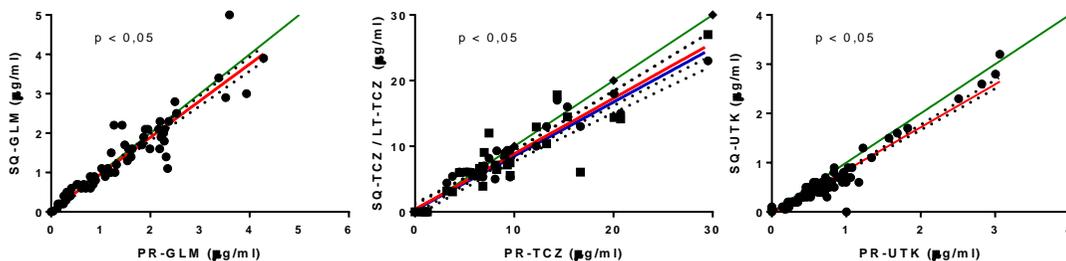
Se analizaron los niveles de GLM y de anticuerpos anti-GLM en 102 muestras de 48 pacientes con EspA (30 EA, 9 APs, 4 EspAi, 1 AIJ y 4 con patología desconocida) y los niveles de TCZ y de anticuerpos anti-TCZ en 38 muestras de 26 pacientes (23 AR, 1 AIJ, 1 AJC y 1 enfermedad de Still), ambas poblaciones procedentes del Servicio de Reumatología del HULP. Los/as pacientes se encontraban en tratamiento de mantenimiento con GLM o TCZ al inicio del estudio. Los niveles

valle de UTK y de anticuerpos anti-UTK se analizaron en 190 muestras de 40 pacientes con PsO procedentes del Servicio de Dermatología del HUB que iniciaron el tratamiento o se encontraban en mantenimiento con UTK al inicio del estudio. Los límites de detección o cuantificación de los ensayos se recogen en la **tabla 4.19**.

**Tabla 4.19. Límites de cuantificación de los ensayos de Promonitor (PR) y Sanquin (SQ) y de detección del kit Lisa Tracker® (LT). No aplica, n/a.**

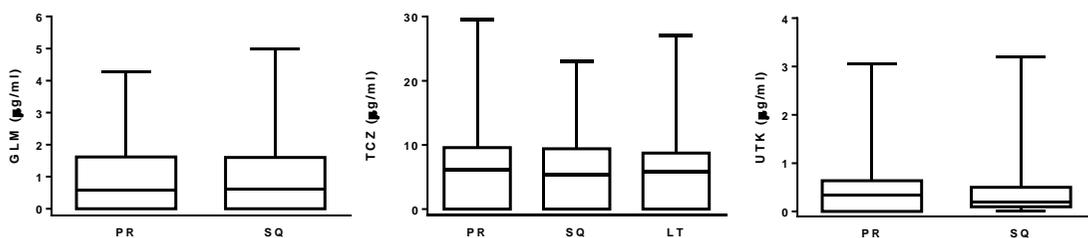
Fármacos	PR (µg/ml)	SQ (µg/ml)	LT (µg/ml)
GLM	0,036	0,005	n/a
TCZ	0,638	0,2	1
UTK	0,131	0,02	n/a
Anticuerpos antifármaco	PR (UA/ml)	SQ (UA/ml)	LT (µg/ml)
Anti-GLM	56	12	n/a
Anti-TCZ	28	12	0,005
ANTI-UTK	3	12	n/a

Se observó una correlación positiva entre los métodos para la determinación de los niveles de GLM ( $r$  0,98;  $p < 0,05$ ), de los niveles de TCZ ( $r$  PR-SQ 0,94,  $p < 0,05$ ;  $r$  PR-LT 0,92,  $p < 0,05$ ) y de los niveles de UTK ( $r$  0,94;  $p < 0,05$ ) (**figura 4.34**).



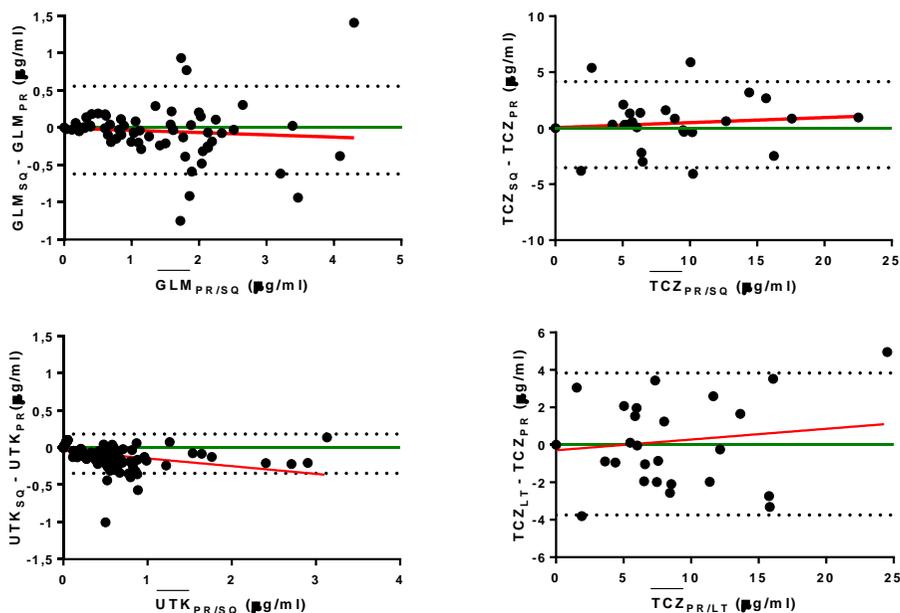
**Figura 4.34. Correlación de los niveles de GLM, TCZ y UTK obtenidos por los inmunoensayos de Promonitor (PR), Sanquin (SQ) y Lisa Tracker® (LT). Las líneas rojas, las azules, las verdes y las punteadas representan la regresión lineal de PR-SQ, PR-LT, la igualdad y el IC 95% respectivamente.**

No existieron diferencias entre los métodos elegidos para la determinación de los niveles de GLM (mediana 0,575 vs 0,600  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0 – 1,614 vs 0 – 1,600  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0,907$  para PR vs SQ, respectivamente), ni de los niveles de TCZ (mediana 6,16 vs 5,40 vs 5,77  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0 – 9,58 vs 0 – 9,40 vs 0 – 8,74  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0,756$ , para PR vs SQ vs LT, respectivamente), ni de los niveles de UTK (mediana 0,34 vs 0,20  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0 – 0,63 vs 0,10 – 0,50,  $p = 0,144$ , para PR vs SQ, respectivamente) (**figura 4.35**).



**Figura 4.35.** Comparación de los niveles de GLM, TCZ y UTK obtenidos por los inmunoensayos de Promonitor (PR), Sanquin (SQ) y Lisa Tracker® (LT). Se representa la mediana de los niveles de fármaco, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo, de un total de 102 muestras de pacientes tratados/as con GLM, 38 muestras de pacientes tratados/as con TCZ y 190 muestras de pacientes tratados/as con UTK ( $U$  de Mann-Whitney,  $*p < 0,05$ ).

En el análisis de Bland-Altman se estudió el grado de acuerdo entre los métodos (Bland y cols. 2010). La regresión lineal de los puntos no difirió significativamente del cero en ningún caso indicando la ausencia de cualquier error sistemático en los métodos en el rango de medida para la determinación de los niveles de GLM (diferencia de medias  $-0,03 \mu\text{g/ml}$ , IC95%  $-0,06 - 0,05$ ,  $p = 0,301$ ) y de los niveles de TCZ (diferencia de medias  $0,32 \mu\text{g/ml}$ , IC95%  $-3,53 - 4,17$ ,  $p = 0,41$ , para PR-SQ y diferencia de medias  $-0,05 \mu\text{g/ml}$ , IC95%  $-3,75 - 3,84$ ,  $p = 0,29$ , para PR-LT). Sin embargo, la regresión lineal de los puntos en la determinación de los niveles de UTK sí difirió significativamente del cero (diferencia de medias  $-0,08$ , IC95%  $-0,35 - 0,18$ ,  $p < 0,05$ ), indicando que Promonitor sobreestima la medida con respecto a la reportada por Sanquin (**figura 4.36**).



**Figura 4.36.** Grado de acuerdo entre los inmunoensayos Promonitor (PR), Sanquin (SQ) y Lisa Tracker<sup>®</sup> (LT) para la determinación de niveles de GLM, TCZ y UTK. Se representa la diferencia de los niveles de fármaco de cada muestra obtenidos con los 2 métodos (eje y) frente al promedio de los niveles de fármaco de cada muestra obtenidos con los 2 métodos (eje x), de un total de 102 muestras de pacientes tratados/as con GLM, 38 muestras de pacientes tratados/as con TCZ y 190 muestras de pacientes tratados/as con UTK. Las líneas rojas, las verdes y las punteadas, representan la regresión lineal, la igualdad y la media  $\pm$  1,96 SD respectivamente

Una única muestra fue reportada como negativa por Promonitor-GLM mientras que Sanquin la reportó como positiva y una única muestra fue reportada como positiva por Promonitor-TCZ mientras que Sanquin y Lisa Tracker<sup>®</sup> la reportaron como negativa (**tabla 4.20**). Una única muestra fue reportada como positiva por Promonitor-UTK mientras que Sanquin la reportó como negativa y 31 muestras fueron reportadas por Promonitor-UTK como negativas mientras que Sanquin dio un resultado positivo. Se obtuvieron buenos grados de acuerdo entre Promonitor-GLM y Sanquin (acuerdo positivo 99% y negativo 100%,  $\kappa$  de Cohen 1,0,  $p < 0,05$ ) y entre Promonitor-TCZ, Sanquin y Lisa Tracker<sup>®</sup> (acuerdo positivo 96% y negativo 93%,  $\kappa$  de Cohen 0,8,  $p \leq 0,005$ ). Sin embargo, Promonitor-UTK no ofreció los resultados esperados en relación al acuerdo positivo aunque el acuerdo negativo fue muy favorable (acuerdo positivo 81% y acuerdo negativo 96%,  $\kappa$  de Cohen 0,5,  $p < 0,05$ ).

**Tabla 4.20. Tablas de contingencia en la determinación de niveles de GLM, TCZ y UTK.** Se muestra el grado de acuerdo de positivos y de negativos entre Promonitor-GLM y Sanquin, entre Promonitor-TCZ, Sanquin y Lisa Tracker® y entre Promonitor-UTK y Sanquin.

	SQ-GLM (+)	SQ-GLM (-)		SQ-TCZ (+)	SQ-TCZ (-)
PR-GLM (+)	68	0	PR-TCZ (+)	23	1
PR-GLM (-)	1	33	PR-TCZ (-)	1	13

	SQ-UTK (+)	SQ-UTK (-)		LT-TCZ (+)	LT-TCZ (-)
PR-UTK (+)	131	1	PR-TCZ (+)	23	1
PR-UTK (-)	31	23	PR-TCZ (-)	1	13

En cuanto a la correlación de los ensayos Promonitor-ANTI-GLM y el RIA de Sanquin para la determinación de niveles de anticuerpos anti-GLM y de los ensayos Promonitor-ANTI-TCZ, el RIA de Sanquin y el ELISA de Lisa Tracker® para la determinación de niveles de anticuerpos anti-TCZ, todos los métodos proporcionaron idénticos resultados obteniéndose un grado de acuerdo positivo y negativo del 100% ( $\kappa$  de Cohen 1,0,  $p < 0,05$ ) e independientemente del método utilizado, se detectaron anticuerpos anti-GLM en 3 de las 102 muestras (6%) y en ninguna de las 38 muestras se detectaron anticuerpos anti-TCZ. Sin embargo, se observó una discrepancia en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-UTK de tal manera que el ensayo Promonitor-ANTI-UTK reportó 3 muestras como negativas mientras que Sanquin las reportó como positivas obteniéndose un grado de acuerdo positivo del 57% y negativo del 100% ( $\kappa$  de Cohen 0,7,  $p < 0,05$ ) (tabla 4.21).

**Tabla 4.21. Tablas de contingencia en la determinación de niveles de anticuerpos anti-GLM, anti-TCZ y anti-UTK.** Se muestra el grado de acuerdo de positivos y de negativos entre Promonitor-ANTI-GLM y Sanquin, entre Promonitor-ANTI-TCZ, Sanquin y Lisa Tracker® y entre Promonitor-ANTI-UTK y Sanquin.

	SQ-ANTI-GLM (+)	SQ-ANTI-GLM (-)		SQ-ANTI-TCZ (+)	SQ-ANTI-TCZ (-)
PR-ANTI-GLM (+)	3	0	PR-TCZ (+)	0	0
PR-ANTI-GLM (-)	0	99	PR-TCZ (-)	0	38

	SQ-ANTI-UTK (+)	SQ-ANTI-UTK (-)		LT-ANTI-TCZ (+)	LT-ANTI-TCZ (-)
PR-UTK (+)	4	0	PR-TCZ (+)	0	0
PR-UTK (-)	3	179	PR-TCZ (-)	0	38

#### 4.8. Correlación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica

##### 4.8.1. Correlación de los niveles de GLM y de anticuerpos anti-GLM con la respuesta clínica en pacientes con EspA

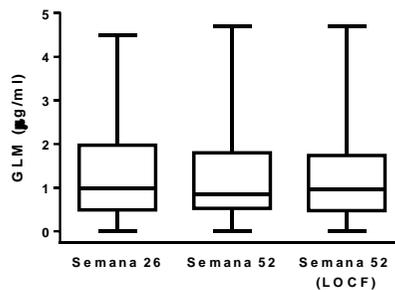
En el estudio se incluyeron 57 pacientes de los/as cuales 2 no disponían del índice de respuesta clínica al tratamiento (ASDAS) en ningún momento del seguimiento, sin embargo, se incluyeron en el análisis estadístico por disponer de otros datos de interés.

**Tabla 4.22. Características demográficas y clínicas de la población total y de los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as por el índice ASDAS a la semana 52 (LOCF) del seguimiento.** \* La cohorte de pacientes presenta 57 individuos, sin embargo, no se dispone del índice ASDAS de 2 pacientes (1 hombre y 1 mujer) en ningún momento del estudio pero sí de los niveles valle de GLM. n/a, no aplica.

	<b>Población total (n = 57*)</b>	<b>Respondedores/as ASDAS ≤ 2,1 (n = 36)</b>	<b>No respondedores ASDAS &gt; 2,1 (n = 19)</b>	<b>P</b>
<b>Características demográficas</b>				
Edad, años, mediana (IQR)	48 (36-55)	48 (37-55)	49 (37-57)	0,68
Hombres, n (%)	36 (71)	28 (78)	7 (19)	n/a
Mujeres, n (%)	15 (29)	6 (40)	8 (53)	n/a
IMC, mediana (IQR)	26 (22-28)	26(22-28)	26 (22-28)	0,82
<b>Tipo de EspA</b>				
EA, n (%)	38 (67)	27 (71)	10 (26)	n/a
EspAi, n (%)	7 (12)	3 (43)	3 (43)	n/a
APs, n (%)	8 (14)	5 (62)	3 (38)	n/a
EspA+EII, n (%)	4 (7)	1 (25)	3 (75)	n/a
<b>Actividad basal de la enfermedad</b>				
HLA-B27 positivo, n (%)	35 (69)	25 (71)	8 (23)	n/a
Duración EspA, años, mediana (IQR)	10 (5,5-19)	13 (6-23,2)	7 (5-15,2)	0,10
Uso previo de biológicos, n (%)	21 (41)	11(52)	8 (38)	n/a
PCR, mg/l, mediana (IQR)	7,67 (2,87-19,20)	7,63 (2,9-27,6)	7,78 (1,84-12,5)	0,43
VSG, mm/h, mediana (IQR)	11 (8-25,5)	10 (8-30)	14,5 (6,75-24,5)	0,73
ASDAS, mediana (IQR)	3,49 (2,08-4,01)	3,53 (2,79-4,22)	3,33 (2,83-3,79)	0,40
<b>Tratamientos concomitantes</b>				
Monoterapia, n (%)	19 (37)	13 (68)	5 (26)	n/a
Metotrexato, n (%)	17 (33)	12 (71)	4 (23)	n/a
Sulfasalazina, n (%)	24 (47)	14 (58)	9 (17)	n/a
Prednisona, n (%)	7 (14)	2 (29)	3 (43)	n/a

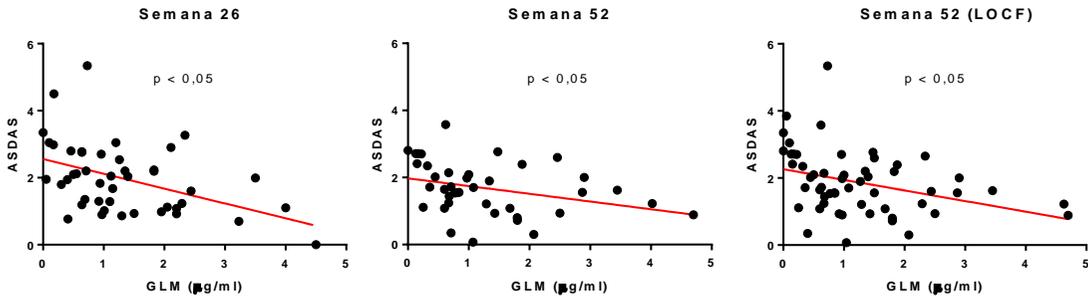
En el caso de encontrar valores perdidos a la semana 52 se empleó la aproximación LOCF (*Last Observation Carried Forward*) en la que dichos valores perdidos son reemplazados por los valores correspondientes al tiempo anterior disponible del seguimiento.

A la semana 52 (LOCF), 36 pacientes (63%) respondieron al tratamiento con GLM presentando valores de ASDAS  $\leq 2,1$  mientras que 19 (33%) no respondieron, con valores de ASDAS  $> 2,1$ . Las características demográficas y clínicas de la población total analizada se muestran en la **tabla 4.22**.



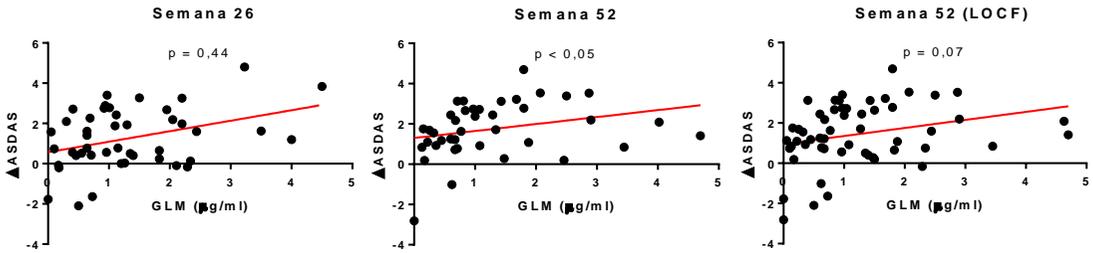
**Figura 4.37. Niveles valle de GLM a las semanas 26 y 52 del seguimiento.** Se representa la mediana de los niveles valle de GLM a las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 50, 41 y 57 pacientes respectivamente, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias en los niveles valle de GLM en la cohorte de pacientes del estudio en la semana 26 (mediana 0,99  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,49 - 1,97), ni en la semana 52 (mediana 0,84  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,52 - 1,80) ni en la semana 52 (LOCF) (mediana 0,96  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,47 - 1,94). La aplicación de la aproximación LOCF no modificó los niveles de GLM respecto a la semana 52 ( $p = 0,89$ ) (**figura 4.37**).



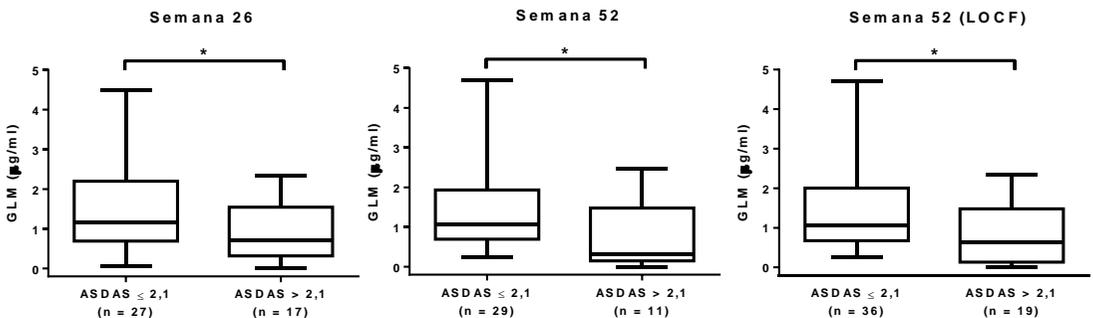
**Figura 4.38. Correlación de los niveles de GLM con la respuesta clínica al tratamiento (ASDAS).** Se representa la dispersión del par de valores GLM/ASDAS para cada paciente a las semanas 26 ( $n = 45$ ), 52 ( $n = 40$ ) y 52 (LOCF) ( $n = 55$ ) y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

Se encontró una correlación inversa de los niveles valle de GLM con la respuesta clínica al tratamiento a la semana 26 ( $r -0,41$ , IC95%  $-0,64 - -0,13$ ,  $p < 0,05$ ), a la semana 52 ( $r -0,43$ , IC95%  $-0,63 - -0,18$ );  $p < 0,05$ ) y a la semana 52 (LOCF) ( $r -0,44$ , IC95%  $-0,66 - -0,14$ ,  $p < 0,05$ ) del seguimiento (**figura 4.38**). Aunque en el modelo de regresión lineal univariante parecía que existían otras variables que influían en la respuesta clínica como HLAB27, el sexo, los tratamientos previos con biológicos y concomitantes basales, la duración de la enfermedad y el tiempo de tratamiento con GLM, en el modelo de regresión lineal multivariante la única variable que de manera independiente estaba asociada con la respuesta clínica fueron los niveles valle de GLM. No obstante, no se encontró correlación de los niveles valle de GLM con la mejoría clínica ( $\Delta ASDAS$ ) definida como la disminución del valor de ASDAS respecto al valor basal ( $\Delta ASDAS_0 - \Delta ASDAS_t$ ) a la semana 26 ( $r 0,12$ , IC95%  $-0,19 - 0,40$ ,  $p = 0,44$ ) ni a la semana 52 (LOCF) ( $r 0,25$ , IC95%  $-0,03 - 0,50$ ,  $p = 0,07$ ), sin embargo, sí a la semana 52 ( $r 0,41$ , IC95%  $0,10 - 0,64$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.39**).



**Figura 4.39.** Correlación de los niveles de GLM con la mejoría clínica ( $\Delta$ ASDAS). Se representa la dispersión del par de valores GLM/ $\Delta$ ASDAS para cada paciente a las semanas 26 ( $n = 45$ ), 52 ( $n = 43$ ) y 52 (LOCF) ( $n = 55$ ) y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

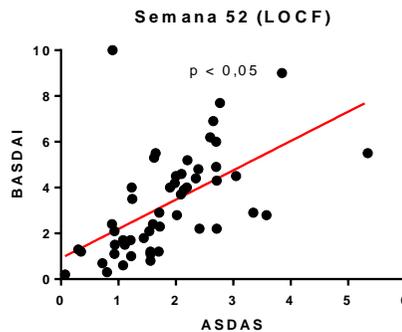
Los/as pacientes respondedores/as en base al índice ASDAS mostraron niveles valle de GLM mayores a la semana 26 (mediana 1,15 vs 0,71  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,69 – 2,20 vs 0,32 – 1,54,  $p < 0,05$ ), a la semana 52 (mediana 1,07 vs 0,32  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,69 – 1,94 vs 0,15 – 1,48,  $p < 0,05$ ) y a la semana 52 (LOCF) (mediana 1,06 vs 0,62  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 0,67 – 2,00 vs 0,13 – 1,48,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.40**).



**Figura 4.40.** Niveles valle de GLM de pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as por el índice ASDAS. Se representa la mediana de los niveles valle de GLM a las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 44, 40 y 55 pacientes respectivamente, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo ( $U$  de Mann-Whitney,  $*p < 0,05$ ).

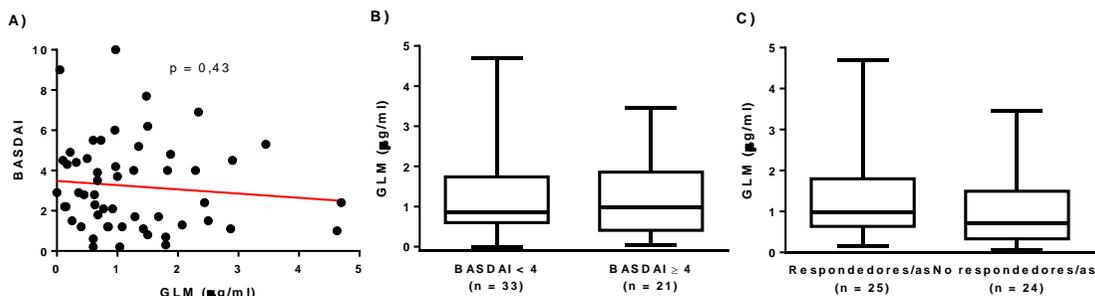
Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos para las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) fueron similares, se optó por escoger únicamente la semana 52 (LOCF) por ser la más representativa y completa para el seguimiento de los/as pacientes.

Aunque el índice de actividad de la enfermedad, ASDAS, es considerado como la principal herramienta de evaluación clínica, adicionalmente se recogió el índice BASDAI (*Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*).



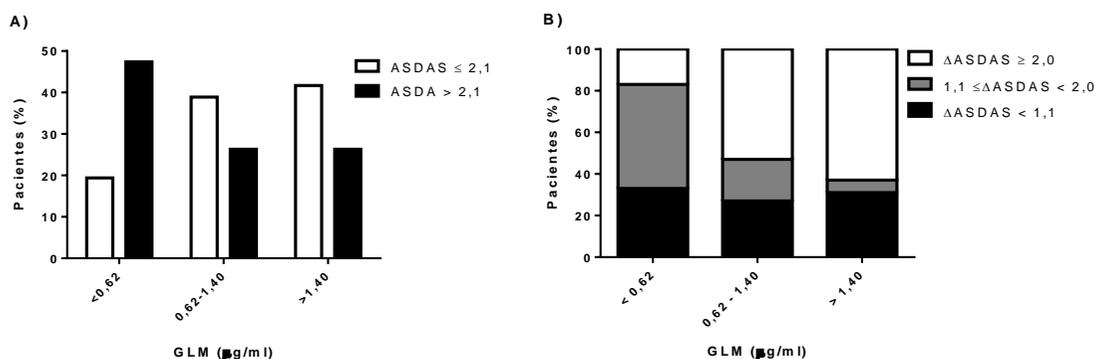
**Figura 4.41. Análisis de la equivalencia los índices de actividad BASDAI y ASDAS.** Se representa la dispersión del par de valores ASDAS/BASDAI para cada paciente ( $n = 53$ ) a la semana 52 (LOCF) y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

Los dos índices utilizados para registrar la respuesta al tratamiento, mostraron una correlación directa ( $r = 0,68$ , IC95%  $0,49 - 0,80$ ,  $p < 0,05$ ), lo que demuestra que los dos son igualmente válidos para el seguimiento de la actividad de la enfermedad (**figura 4.41**). Sin embargo, no se encontró una correlación de los niveles valle de GLM con el índice BASDAI ( $r = -0,11$ , IC95%  $-0,37 - 0,17$ ,  $p = 0,43$ ) (**figura 4.42.A**), por lo que los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as tampoco mostraron diferencias en los niveles valle de GLM, ya sea definiendo la respuesta clínica como la obtención de valores de BASDAI  $< 4$  (**figura 4.42.B**) (mediana  $0,85 \mu\text{g/ml}$ , IQR  $0,60 - 1,74$  vs  $0,97 \mu\text{g/ml}$ , IQR  $0,41 - 1,85$ ,  $p = 0,86$ ) o considerando respondedores/as a aquellos/as que muestran al menos una disminución del 50% del valor BASDAI (BASDAI50) respecto al valor basal de BASDAI al inicio del tratamiento (mediana  $0,97 \mu\text{g/ml}$ , IQR  $0,63 - 1,80$  vs  $0,70 \mu\text{g/ml}$ , IQR  $0,33 - 1,49$ ,  $p = 0,22$ ) (**figura 4.42.C**).



**Figura 4.42.** Correlación de los niveles valle de GLM con el índice BASDAI y distribución de los niveles valle de GLM en pacientes respondedores/as y no respondedores/as a la semana 52 (LOCF) del seguimiento. (A) Se representa la dispersión del par de valores GLM/BASDAI para cada paciente ( $n = 54$ ) y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ). La mediana de los niveles valle de GLM, el IQR y los valores máximo y mínimo se representan en función de las respuestas clínicas (B) BASDAI y (C) BASDAI50 a la semana 52 (LOCF) del seguimiento ( $U$  de Mann-Whitney,  $*p < 0,05$ ).

A continuación, los/as pacientes fueron estratificados/as en terciles (TC) en función de los niveles valle de GLM.



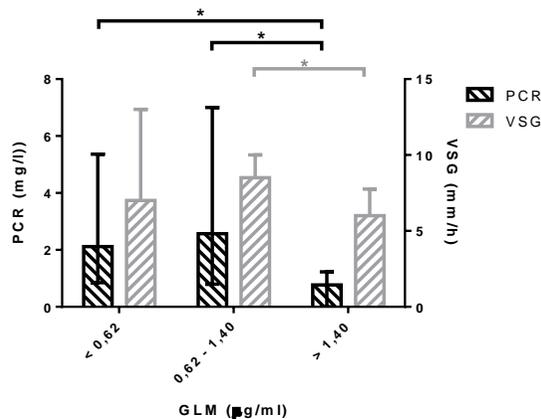
**Figura 4.43.** Pacientes estratificados en terciles en función de los niveles valle de GLM a la semana 52 (LOCF) del seguimiento. (A) Respuesta clínica: ASDAS  $\leq 2,1$  respuesta, ASDAS  $> 2,1$  sin respuesta. [TC<sub>1</sub>: GLM  $< 0,62$   $\mu\text{g/ml}$ , 16 pacientes (29%), TC<sub>2</sub>:  $0,62 \leq \text{GLM} \leq 1,40$   $\mu\text{g/ml}$ , 19 pacientes (34%), TC<sub>3</sub>: GLM  $> 1,40$   $\mu\text{g/ml}$ , 20 pacientes (36%)]. (B) Mejoría clínica a la semana 52 (LOCF):  $\Delta\text{ASDAS} < 1,1$  sin mejoría clínica,  $1,1 \leq \Delta\text{ASDAS} < 2,0$  mejoría clínica moderada,  $\Delta\text{ASDAS} \geq 2,0$  buena mejoría clínica. [TC<sub>1</sub>: GLM  $< 0,62$   $\mu\text{g/ml}$ , 12 pacientes (28%), TC<sub>2</sub>:  $0,62 \leq \text{GLM} \leq 1,40$   $\mu\text{g/ml}$ , 15 pacientes (35%), TC<sub>3</sub>: GLM  $> 1,40$   $\mu\text{g/ml}$ , 16 pacientes (37%)].

El 47% de los/as pacientes no respondedores/as se encontraban en el menor tercil (TC<sub>1</sub>: GLM  $< 0,62$   $\mu\text{g/ml}$ ) mientras el 42% de los/as pacientes respondedores/as lo hacían en el mayor tercil (TC<sub>3</sub>: GLM  $> 1,40$   $\mu\text{g/ml}$ ) (figura 4.43.A). En el TC<sub>1</sub> solamente 2 pacientes (17%) presentaron una

buena mejoría clínica, sin embargo, en el TC<sub>2</sub> y TC<sub>3</sub> fueron 8 pacientes (53%) y 10 pacientes (63%) respectivamente (**figura 4.43.B**).

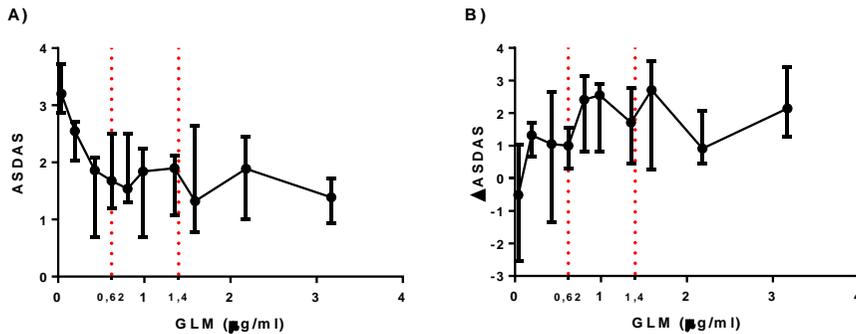
Adicionalmente, se correlacionaron los niveles valle de GLM con determinados parámetros asociados a la enfermedad, tales como la PCR y la VSG.

Los/as pacientes incluidos/as en TC<sub>3</sub> mostraron menores valores de PCR (TC<sub>3</sub>: mediana 0,77, IQR 0 - 1,23) que los incluidos en el resto de terciles (TC<sub>1</sub>: mediana 2,12, IQR 0,85 - 5,36,  $p < 0,05$ ; TC<sub>2</sub>: mediana 2,57, IQR (0,8 - 7),  $p < 0,05$ ). Asimismo, los/as pacientes incluidos/as en TC<sub>3</sub> mostraron menores valores de VSG (TC<sub>3</sub>: mediana 6, IQR 5,25 - 7,75) que los incluidos en TC<sub>2</sub> (TC<sub>2</sub>: mediana 8,5, IQR (6,75 - 10),  $p < 0,05$ ) (**figura 4.44**).



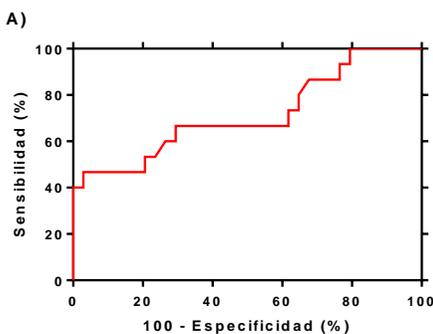
**Figura 4.44. Parámetros asociados a inflamación en EspA en función de los niveles valle de GLM.** Se representan los valores de PCR y VSG en función de los niveles valle de GLM por terciles. TC<sub>1</sub>: GLM < 0,62 µg/ml [PCR, n = 18 (32%); VSG, n = 11 (30%)], TC<sub>2</sub>: 0,62 ≤ GLM ≤ 1,40 µg/ml [PCR, n = 19 (34%); VSG, n = 14 (38%)], TC<sub>3</sub>: GLM > 1,40 µg/ml [PCR, n = 19 (34%); VSG, n = 12 (32%)] (*U* de Mann-Whitney, \* $p \leq 0,05$ ).

Para establecer la curva de concentración-efecto de GLM, los niveles valle de GLM de una cohorte de 55 pacientes fueron clasificados en 10 grupos en orden creciente y correlacionados con la respuesta (**figura 4.45.A**) y la mejoría clínica (**figura 4.45.B**). En ambos gráficos aparece delimitado el rango terapéutico por líneas punteadas donde niveles valle de GLM comprendidos entre 0,62 – 1,4 µg/ml parecen ser suficientes para alcanzar la respuesta y mejoría clínica. Niveles valle de GLM mayores que 1,4 µg/ml no resultan en una mejor respuesta ni en una mejoría clínica.



**Figura 4.45. Curva de concentración-efecto de GLM.** Se representan los niveles valle de GLM de cada grupo de pacientes correlacionado con la mediana y el IQR de los valores de (A) ASDAS ( $\leq 2,1$ ) y (B)  $\Delta$ ASDAS ( $\geq 2$ ). Los/as pacientes fueron estratificados/as en 10 grupos (7 grupos de 6 pacientes, 2 grupos de 4 pacientes y 1 grupo de 5 pacientes). El rango terapéutico óptimo aparece delimitado por líneas punteadas.

Aplicando el análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC, *Receiver Operating Characteristic*) sobre los datos de los niveles valle de GLM y ASDAS de los/as pacientes de EspA a la semana 52 (LOCF), se estableció una concentración valle de GLM de  $0,75 \mu\text{g/ml}$  como el punto de corte terapéutico con una sensibilidad del 72% (IC 95% 55-86) y una especificidad del 63% (IC 95% 38-84) (**figura 4.46**), incluido dentro del rango terapéutico obtenido con la curva de concentración-efecto.



	Sensibilidad % (IC95%)	Especificidad % (IC95%)
GLM $>0,70 \mu\text{g/ml}$	72 (55 - 86)	38 (34 - 80)
<b>GLM <math>&gt;0,75 \mu\text{g/ml}</math></b>	<b>72 (55 - 86)</b>	<b>63 (38 - 84)</b>
GLM $>0,80 \mu\text{g/ml}$	69 (52 - 84)	63 (38 - 84)
GLM $>0,84 \mu\text{g/ml}$	67 (49 - 81)	63 (38 - 84)
GLM $>0,85 \mu\text{g/ml}$	64 (46 - 79)	63 (38 - 84)

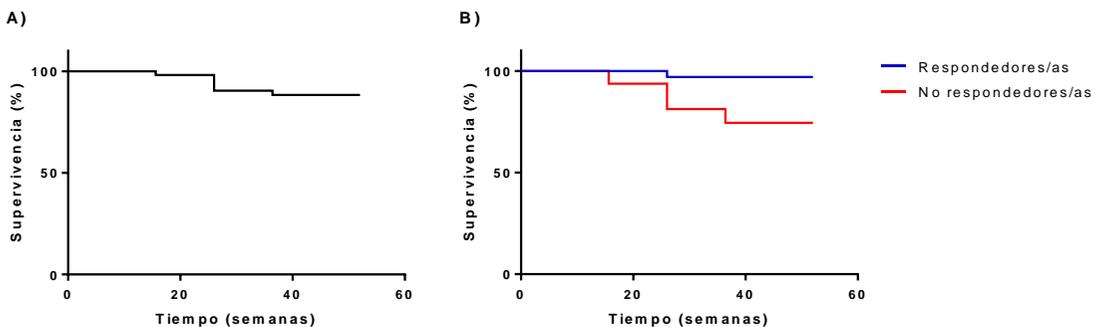
**Figura 4.46. Determinación de los niveles valle de GLM correspondientes al punto de corte terapéutico.** Se representa (A) la curva ROC a la semana 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 55 pacientes y (B) los potenciales puntos de corte terapéutico con las sensibilidades y especificidades asociadas. Se indica en negrita el punto de corte terapéutico seleccionado.

Por tanto, niveles valle de GLM inferiores a  $0,75 \mu\text{g/ml}$  se asociarían con una pérdida de respuesta al tratamiento. Así, 12 pacientes (54%) con niveles valle de GLM inferiores a  $0,75 \mu\text{g/ml}$

fueron no respondedores/as a la semana 52 (LOCF) del seguimiento mientras que 26 pacientes (79%) con niveles valle de GLM superiores a 0,75 µg/ml fueron respondedores/as ( $p < 0,05$ ).

El área bajo la curva ROC representa la robustez del ensayo para predecir la respuesta al tratamiento en función de los niveles valle de GLM. El área bajo la curva obtenida fue 0,72 (0,56 – 0,87), mayor que 0,5 ( $p < 0,05$ ), por lo que la determinación de los niveles valle de GLM sirve para predecir de forma eficaz y robusta la respuesta al tratamiento.

En la población de estudio 6 pacientes (12%) abandonaron el tratamiento con GLM a lo largo de las 52 semanas del seguimiento por ineficacia y/o efectos secundarios del tratamiento, de los cuales 5 (83%) lo hicieron antes de la semana 26 (**figura 4.47.A**). En nuestra cohorte de pacientes la supervivencia al tratamiento con GLM durante las 52 semanas del seguimiento fue menor en los/as pacientes no respondedores/as que en los/as pacientes respondedores/as (74% vs 97%,  $p < 0,05$ ) ya que abandonaron antes el tratamiento (**figura 4.47.B**).



**Figura 4.47. Supervivencia de los/as pacientes al tratamiento con GLM durante las 52 semanas del seguimiento.** Se representan las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia de (A) la población total y de (B) los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as (log rank,  $p < 0,05$ ).

Tras analizar la frecuencia de aparición de anticuerpos anti-GLM, solamente se detectaron estos en un/una paciente a la semana 52 del seguimiento, con niveles indetectables de GLM y un valor de ASDAS de 2,81 y, por lo tanto, sin respuesta al tratamiento con GLM.

#### 4.8.2. Correlación de los niveles de TCZ y de anticuerpos anti-TCZ con la respuesta clínica en pacientes con AR

En el estudio se incluyeron 34 pacientes de los/as cuales 1 no disponía del índice de respuesta (DAS28) en ningún momento del seguimiento, sin embargo, se incluyó en el análisis estadístico por disponer de otros datos de interés.

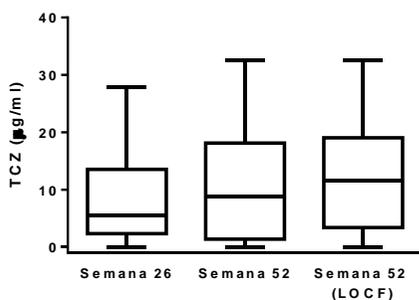
**Tabla 4.23. Características demográficas y clínicas de la población total y de los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as por el índice DAS28 a la semana 52 (LOCF) del seguimiento.** \* La cohorte de pacientes presenta 34 individuos, sin embargo, no se dispone del índice DAS28 de 1 paciente (mujer) en ningún momento del estudio pero sí de los niveles valle de TCZ.

	<b>Población total (n = 34*)</b>	<b>Respondedores/as DAS28 ≤ 3,2 (n = 20)</b>	<b>No respondedores/as DAS28 &gt; 3,2 (n = 13)</b>	<b>P</b>
<b>Características demográficas</b>				
Edad, años, mediana (IQR)	58,5 (46 – 70)	57,5 (46,0 - 68,5)	61,0 (55,0 - 72,0)	0,46
Mujer, n (%)	30 (88)	17 (59)	12 (41)	n/a
Hombre, n (%)	4 (12)	3 (75)	1 (25)	n/a
IMC, kg/m <sup>2</sup> , mediana (IQR)	27,3 (23 – 29,8)	27,3 (21,0 - 30,0)	27,6 (23,3 - 30,6)	0,68
Fumadores, n (%)	8 (23,5)	3 (37,5)	5 (62,5)	n/a
Exfumadores, n (%)	5 (14,7)	4 (80)	1 (20)	n/a
No fumadores, n (%)	20 (58,8)	12 (63,2)	7 (36,8)	n/a
<b>Actividad basal de la enfermedad</b>				
Artritis erosiva, n (%)	24 (71)	12 (50)	11 (46)	n/a
Duración de la AR, años, mediana (IQR)	12 (6,7 – 16,2)	10,5 (5 - 14)	15 (8 - 20,5)	<0,05
DAS28-VSG basal, mediana (IQR)	5,7 (4,6 – 6,5)	5,8 (4,8 – 6,5)	5,6 (4,3 – 6,6)	0,75
CDAI basal, mediana (IQR)	34 (20 – 42,8)	33 (20,8 - 40)	29,7 (19,7 - 43,2)	1,00
SDAI basal, mediana (IQR)	35,5 (21,2 – 44,7)	34 (21 - 44)	37,5 (19 - 44,5)	0,93
Articulaciones tumefactas, mediana (IQR)	11,5 (6 – 17,5)	11,5 (4,7 - 15,5)	10 (6 - 20)	0,82
Articulaciones inflamadas, mediana (IQR)	7,5 (5 – 12)	7,5 (5 - 12)	7 (5 - 12)	0,96
PCR basal, mg/l, mediana (IQR)	6,5 (1,7 – 32,6)	7,9 (1,9 - 31,1)	5,4 (0,8 - 35,9)	0,59
VSG basal, mg/l, mediana (IQR)	25 (14,7 – 40,2)	24,5 (15,5 - 34,7)	25 (11,5 - 42)	0,80
FR +, n (%)	28 (82)	14 (50)	13,0 (46)	n/a
ACPA +, n (%)	30 (88)	17 (57)	12 (40)	n/a
<b>Tratamientos</b>				
Tratamiento previo con FAME, n (%)	33 (97)	19 (59,4)	13 (39)	n/a
Tratamiento previo con biológicos, n (%)	20 (59)	10 (50)	10 (50)	n/a
Tratamiento concomitante basal				n/a
Monoterapia, n (%)	4 (12)	2 (50)	2 (50)	n/a
Metotrexato, n (%)	25 (73)	13 (52)	11 (44)	n/a
Otros FAME, n (%)	15 (44)	10 (67)	5 (33)	n/a

En el caso de encontrar valores perdidos a la semana 52, se empleó la aproximación LOCF (*Last Observation Carried Forward*) en la que dichos valores son reemplazados por los correspondientes al tiempo anterior disponible del seguimiento.

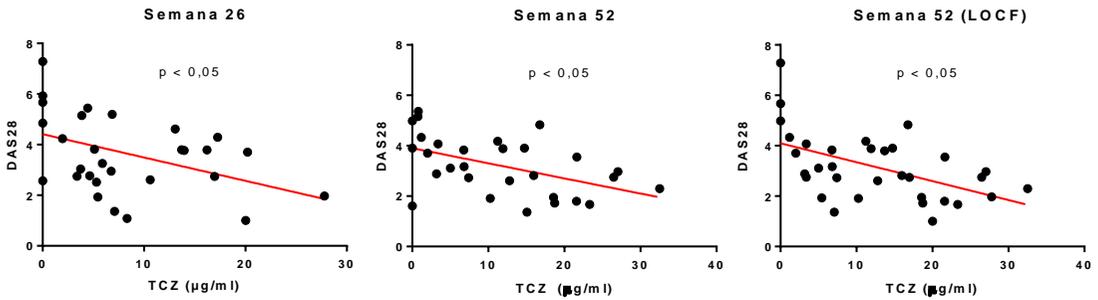
A la semana 52 (LOCF), 20 pacientes (59%) respondieron al tratamiento con TCZ presentando valores de DAS28  $\leq 3,2$  mientras que 13 (38%) no respondieron, con valores de DAS28  $> 3,2$ . Las características demográficas y clínicas de la población total analizada se muestran en la **tabla 4.23**.

No se encontraron diferencias en los niveles valle de TCZ en la cohorte de pacientes del estudio en la semana 26 (mediana 5,56  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 2,32 – 13,55), ni en la semana 52 (mediana 8,83  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 1,39 – 18,11,  $p = 0,34$ ) ni en la semana 52 (LOCF) (mediana 11,58  $\mu\text{g/ml}$ , IQR 3,39 – 19,05,  $p = 0,06$ ). La aplicación de la aproximación LOCF no modificó los niveles de TCZ respecto a la semana 52 ( $p = 0,43$ ) (**figura 4.48**).



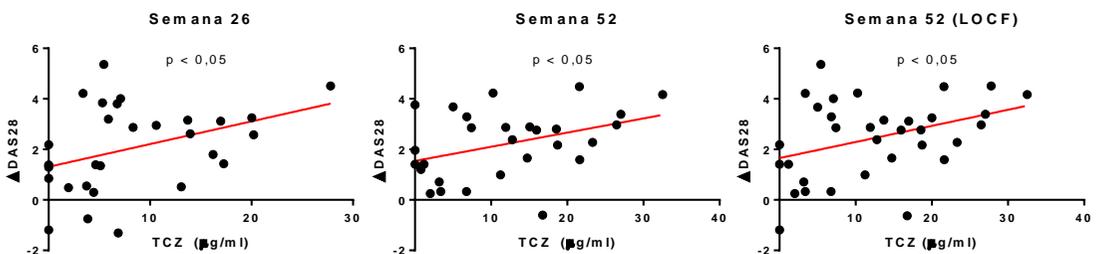
**Figura 4.48. Niveles valle de TCZ a las semanas 26 y 52 del seguimiento.** Se representa la mediana de los niveles valle de TCZ a la semana 26, 52 y 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 32, 32 y 34 pacientes respectivamente, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ ).

Se encontró una correlación inversa de los niveles valle de TCZ con la respuesta clínica al tratamiento a la semana 26 ( $r -0,43$ , IC95%  $-0,69 - -0,09$ ,  $p < 0,05$ ), a la semana 52 ( $r -0,49$ ,  $-0,73 - -0,15$ ,  $p < 0,05$ ) y a la semana 52 (LOCF) ( $r -0,52$ , IC95%  $-0,73 - -0,21$ ,  $p < 0,05$ ) del seguimiento (**figura 4.49**).



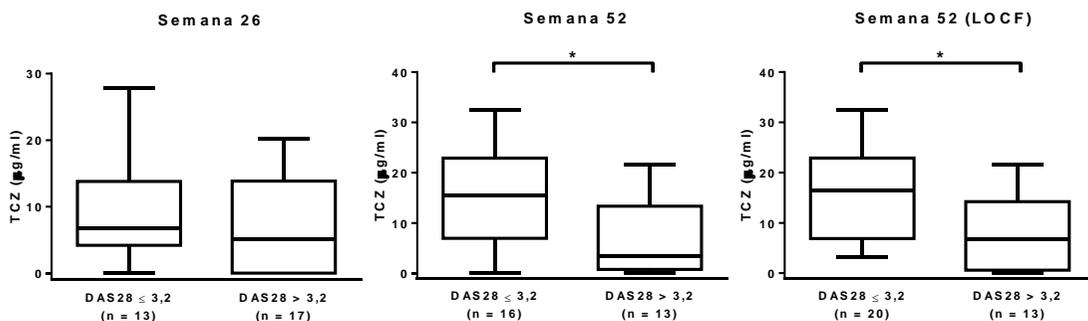
**Figura 4.49. Correlación de los niveles de TCZ con la respuesta clínica al tratamiento (DAS28).** Se representa la dispersión del par de valores TCZ/DAS28 para cada paciente a las semanas 26 (n = 30), 52 (n = 29) y 52 (LOCF) (n = 33) y la regresión lineal en rojo (Pearson,  $p < 0,05$ ).

Asimismo, se encontró una correlación directa de los niveles valle de TCZ con la mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28) definida como la disminución del valor de DAS28 respecto al valor basal ( $\Delta$ DAS28<sub>0</sub> -  $\Delta$ DAS28<sub>t</sub>) a la semana 26 ( $r$  0,39, IC95% 0,03 - 0,66,  $p < 0,05$ ), a la semana 52 ( $r$  0,40, IC95% -0,0 - 0,67,  $p < 0,05$ ) y a la semana 52 (LOCF) ( $r$  0,37, IC95% 0,03 - 0,63,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.50**).



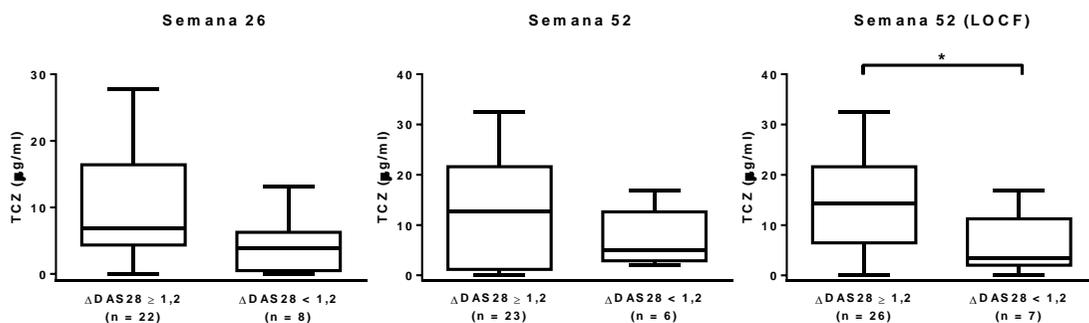
**Figura 4.50. Correlación de los niveles de TCZ con la mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28).** Se representa la dispersión del par de valores TCZ/ $\Delta$ DAS28 para cada paciente a las semanas 26 (n = 30), 52 (n = 29) y 52 (LOCF) (n = 33) y la regresión lineal en rojo (Pearson,  $p < 0,05$ ).

Los/as pacientes respondedores/as en base al índice DAS28 mostraron niveles valle de TCZ mayores a la semana 52 (mediana 15,52 vs 3,38 µg/ml, IQR 6,96 - 26,89 vs 0,77 - 13,33,  $p < 0,05$ ) y a la semana 52 (LOCF) (mediana 16,46 vs 6,76 µg/ml, IQR 6,88 - 22,89 vs 0,59 - 14,23,  $p < 0,05$ ) pero a la semana 26 mostraron niveles valle de TCZ similares a los/as no respondedores/as (mediana 6,75 vs 5,11 µg/ml, IQR 4,19 - 13,78 vs 0 - 13,83,  $p = 0,39$ ) (**figura 4.51**).



**Figura 4.51.** Niveles valle de TCZ de pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as con el índice DAS28. Se representa la mediana de los niveles valle de TCZ a las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 30, 29 y 33 pacientes respectivamente, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \**p* < 0,05).

Los/as pacientes que experimentaron una buena mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28  $\geq$  1,2) y los/as que no ( $\Delta$ DAS28 < 1,2), no mostraron diferencias en los niveles valle de TCZ a la semana 26 (mediana 6,92 vs 3,80 µg/ml, IQR 4,33 – 16,40 vs 0,49 – 6,26, *p* = 0,06) ni a la semana 52 (mediana 12,79 vs 5,07 µg/ml, IQR 1,18 – 21,59 vs 2,82 – 12,62, *p* = 0,33) pero sí a la semana 52 (LOCF) (mediana 14,23 vs 3,38 µg/ml, IQR 6,46 – 21,60 vs 2,01 – 11,24, *p* < 0,05) en la que los niveles valle de TCZ fueron mayores en los/as respondedores/as (**figura 4.52**).



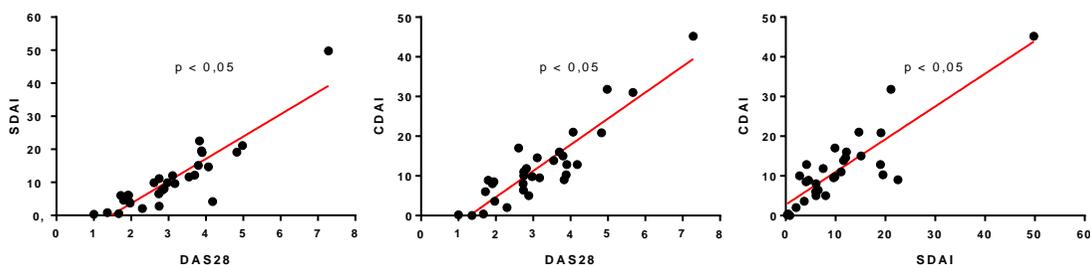
**Figura 4.52.** Niveles valle de TCZ en función de la mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28). Se representa la mediana de los niveles valle de TCZ a las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 30, 29 y 33 pacientes respectivamente, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \**p* < 0,05).

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos para las semanas 26, 52 y 52 (LOCF) fueron similares en relación a la respuesta clínica, se optó por escoger únicamente la semana 52

(LOCF) por ser la más representativa y completa para el seguimiento de los/as pacientes, y además, la única en la que se encontraron diferencias en la mejoría clínica.

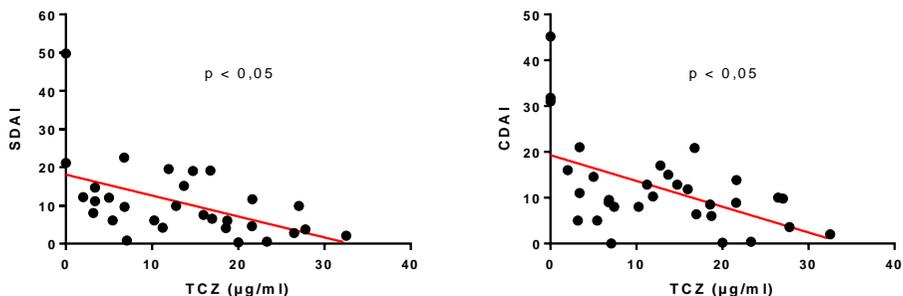
Aunque el índice de actividad de la enfermedad, DAS28, es considerado como la principal herramienta de evaluación clínica, adicionalmente se recogieron otros 2 índices: el índice simplificado de la actividad de la enfermedad (SDAI, *Simplified Disease Activity Index*) y una variante denominada índice clínico de actividad de la enfermedad (CDAI, *Clinical Disease Activity Index*) en la que para su obtención se elimina el valor de PCR.

Los 3 índices utilizados para registrar la respuesta al tratamiento, mostraron una correlación directa a la semana 52 (LOCF) (DAS28/SDAI,  $r$  0,83, IC95% 0,67 – 0,92,  $p < 0,05$ ; DAS28/CDAI,  $r$  0,83, IC95% 0,67 – 0,92,  $p < 0,05$ ) y SDAI/CDAI,  $r$  0,79, IC95% 0,59 – 0,90,  $p < 0,05$ ) lo que demuestra que los 3 son igualmente válidos para el seguimiento de la actividad de la enfermedad (figura 4.53).



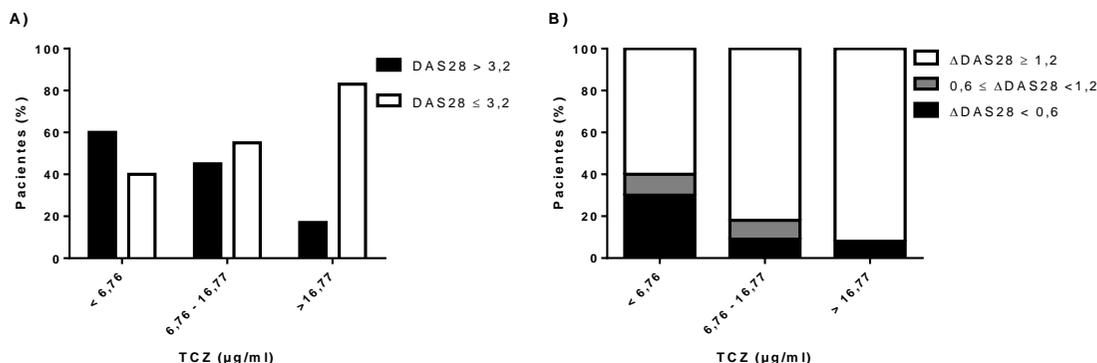
**Figura 4.53. Análisis de la equivalencia de los índices de actividad SDAI, CDAI y DAS28.** Se representa para cada paciente la dispersión del par de valores DAS28/SDAI ( $n = 30$ ), DAS28/CDAI ( $n = 31$ ) y SDAI/CDAI ( $n = 30$ ) a la semana 52 (LOCF) del seguimiento y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

Se encontró una correlación inversa de los niveles valle de TCZ con la respuesta clínica al tratamiento a la semana 52 (LOCF) del seguimiento (SDAI,  $r$  -0,58, IC95% -0,78 – -0,26,  $p < 0,05$ ; CDAI, -0,48, IC95%, -0,71 – -0,14,  $p < 0,05$ ) (figura 4.54).



**Figura 4.54. Correlación de los niveles valle de TCZ con los índices SDAI y CDAI a la semana 52 (LOCF) del seguimiento.** Se representa para cada paciente la dispersión del par de valores TCZ/SDAI (n = 30) y TCZ/CDAI (n = 32) y la regresión lineal en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

A continuación, los/as pacientes fueron estratificados/as en terciles en función de los niveles valle de TCZ.



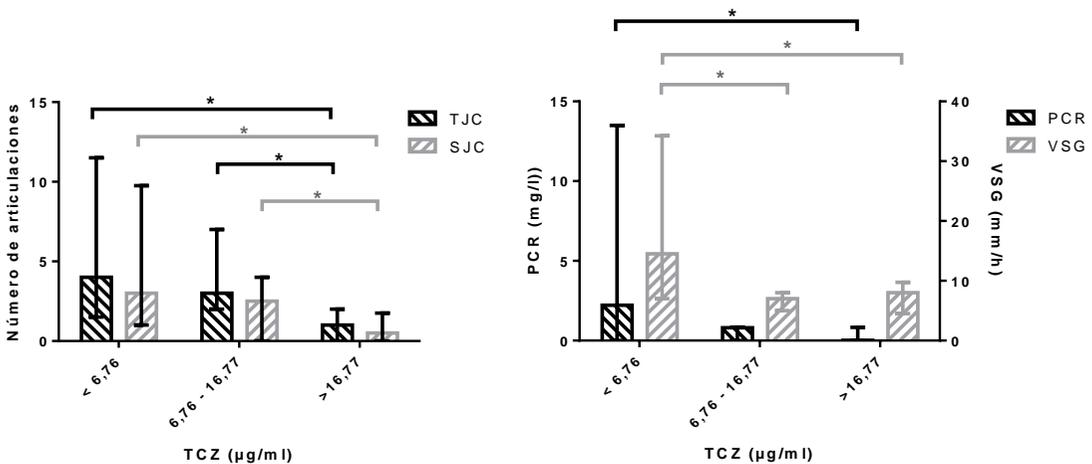
**Figura 4.55. Pacientes estratificados en terciles en función de los niveles valle de TCZ a la semana 52 (LOCF) del seguimiento.** (A) Respuesta clínica:  $DAS28 \leq 3,2$  respuesta,  $DAS28 > 3,2$  sin respuesta. [ $TC_1$ :  $TCZ < 6,76$  µg/ml, 10 pacientes (30%),  $TC_2$ :  $6,76 \leq TCZ \leq 16,77$  µg/ml, 11 pacientes (33%),  $TC_3$ :  $TCZ > 16,77$  µg/ml, 12 pacientes (36%)]. (B) Mejoría clínica:  $\Delta DAS28 < 0,6$  sin mejoría clínica,  $0,6 \leq \Delta DAS28 < 1,2$  mejoría clínica moderada,  $\Delta DAS28 \geq 1,2$  buena mejoría clínica. [ $TC_1$ :  $TCZ < 6,76$  µg/ml, 10 pacientes (30%),  $TC_2$ :  $6,76 \leq TCZ \leq 16,77$  µg/ml, 11 pacientes (33%),  $TC_3$ :  $TCZ > 16,77$  µg/ml, 12 pacientes (36%)].

El 60% de los/as pacientes no respondedores/as se encontraban en el menor tercil ( $TC_1$ :  $TCZ < 6,67$  µg/ml) mientras que el 83% de los/as pacientes respondedores/as lo hacía en el mayor tercil ( $TC_3$ :  $TCZ > 16,77$  µg/ml). A medida que aumentaban en los/as pacientes los niveles valle de TCZ también lo hacía el porcentaje de pacientes respondedores/as y disminuía el de no respondedores/as (figura 4.55.A). Aunque en el  $TC_1$  6 pacientes (60%) alcanzaron ya una buena mejoría clínica, en el

TC<sub>2</sub> y TC<sub>3</sub> la alcanzaron una mayor proporción de pacientes, concretamente 9 pacientes (82%) en el TC<sub>2</sub> y 11 pacientes (92%) en el TC<sub>3</sub> (**figura 4.55.B**).

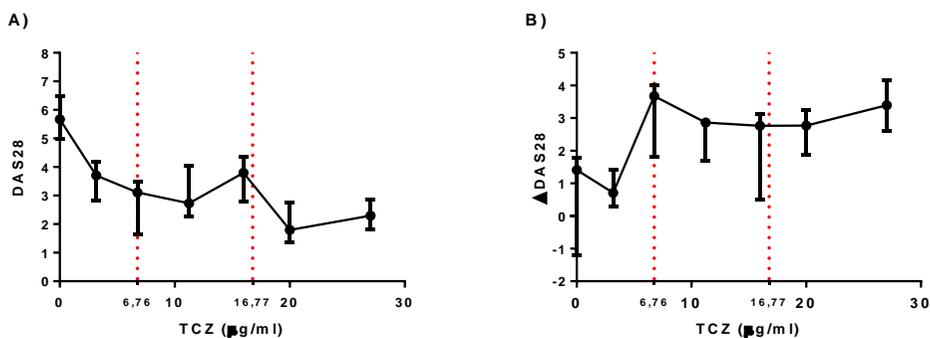
Adicionalmente, se correlacionaron los niveles valle de TCZ con determinados parámetros asociados a la enfermedad, tales como el recuento de articulaciones tumefactas (TJC, *Tender Joint Count*) e inflamadas (SJC, *Swollen Joint Count*), PCR y VSG.

Los/as pacientes incluidos/as en TC<sub>3</sub> mostraron menores valores de TJC (TC<sub>3</sub>: mediana 1, IQR 0 – 2,0) y SJC (TC<sub>3</sub>: mediana 0,5, IQR 0 – 1,75) que los/as incluidos/as en el resto de terciles (TJC, TC<sub>1</sub>: mediana 4, IQR 1,5 – 11,5,  $p < 0,05$ ; TJC, TC<sub>2</sub>: mediana 3, IQR 2 – 7,  $p < 0,05$ ; SJC, TC<sub>1</sub>: mediana 3, IQR 1 – 9,75,  $p < 0,05$ ; SJC, TC<sub>2</sub>: mediana 2, IQR 0 – 4,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.56.A**). Asimismo, los /as pacientes incluidos/as en TC<sub>3</sub> mostraron menores valores de PCR (TC<sub>3</sub>: mediana 0,01, IQR 0 – 0,83) que los/as incluidos/as en el TC<sub>1</sub> (TC<sub>1</sub>: mediana 2,22, IQR 0 – 13,49,  $p < 0,05$ ) y los /as pacientes incluidos/as en TC<sub>2</sub> y TC<sub>3</sub> mostraron menores valores de VSG (TC<sub>2</sub>: mediana 7, IQR 5 – 8; TC<sub>3</sub>: mediana 8, IQR 4,5 – 9,75) que los/as incluidos/as en el TC<sub>1</sub> (TC<sub>1</sub>: mediana 14,5, IQR 7 – 34,25,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.56.B**).



**Figura 4.56. Parámetros asociados a inflamación en AR en función de los niveles valle de TCZ.** Se representan los valores de TJC, SJC, PCR y VSG en función de los niveles valle de TCZ por terciles. TC<sub>1</sub>: TCZ < 6,76 µg/ml, 10 pacientes (30%), TC<sub>2</sub>: 6,76 ≤ TCZ ≤ 16,77 µg/ml, 11 pacientes (33%), TC<sub>3</sub>: TCZ > 16,77 µg/ml, 12 pacientes (36%) (*U* de Mann-Whitney, \* $p \leq 0,05$ ).

Para establecer la curva de concentración-efecto de TCZ, los niveles valle de TCZ de una cohorte de 33 pacientes fueron clasificados en 7 grupos en orden creciente y correlacionados con la respuesta (**figura 4.57.A**) y la mejoría clínica (**figura 4.57.B**). En ambos gráficos aparece delimitado el rango terapéutico por líneas punteadas donde niveles valle de TCZ comprendidos entre 6,76 – 16,77  $\mu\text{g/ml}$  parecen ser suficientes para alcanzar la respuesta y mejoría clínica. Niveles valle de TCZ mayores que 16,77  $\mu\text{g/ml}$  no resultan en una mejor respuesta ni en una mejoría clínicas.



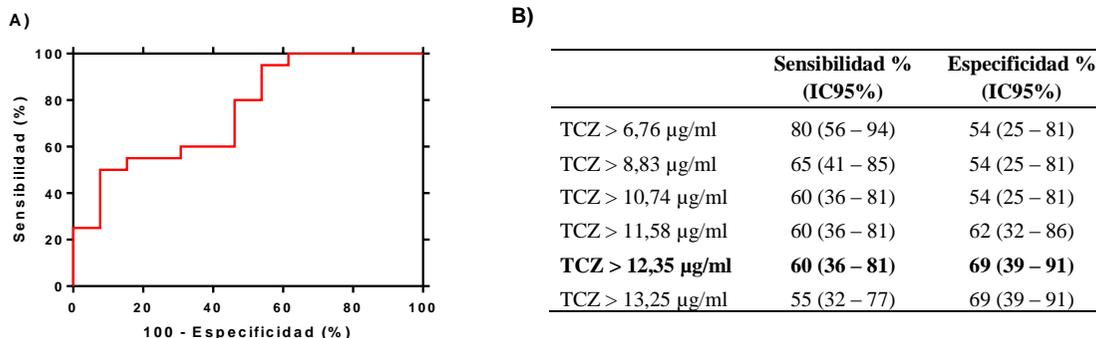
**Figura 4.57. Curva de concentración-efecto de TCZ.** Se representan los niveles valle de TCZ de cada grupo de pacientes correlacionados con la mediana y el IQR de los valores de (A) DAS28 ( $\leq 3,2$ ) y (B)  $\Delta$ DAS28 ( $\geq 1,2$ ). Los/as pacientes fueron estratificados/as en 7 grupos (6 grupos de 5 pacientes y 1 grupo de 3 pacientes). El rango terapéutico óptimo aparece delimitado por líneas punteadas.

Aplicando el análisis de la curva ROC sobre los datos de los niveles valle de TCZ y DAS28 de los/as pacientes con AR a la semana 52 (LOCF), se estableció una concentración valle de TCZ de 12,35  $\mu\text{g/ml}$  como el punto de corte terapéutico con una sensibilidad del 60% (IC 95% 36 - 81) y una especificidad del 69% (IC 95% 39 – 91) (**figura 4.58**), incluido dentro del rango terapéutico obtenido con la curva concentración-efecto.

Por tanto, niveles valle de TCZ inferiores a 12,35  $\mu\text{g/ml}$  se asociarían con una pérdida de respuesta al tratamiento. Así, 9 pacientes (50%) con niveles valle de TCZ inferiores a 12,35  $\mu\text{g/ml}$  fueron no respondedores/as a la semana 52 (LOCF) del seguimiento mientras que 12 pacientes (75%) con niveles valle de TCZ superiores a 12,35  $\mu\text{g/ml}$  fueron respondedores/as ( $p < 0,05$ ).

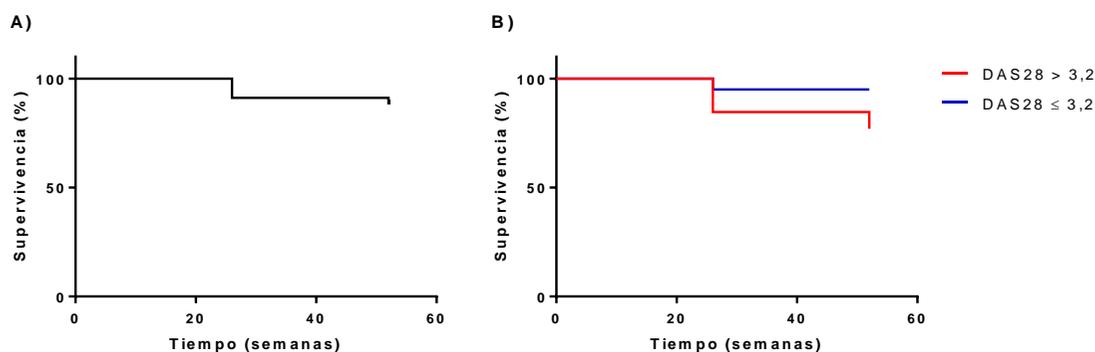
El área bajo la curva ROC representa la robustez del ensayo para predecir la respuesta al tratamiento en función de los niveles valle de TCZ. El área bajo la curva obtenida fue

0,75 (0,58 - 0,92), mayor que 0,5 ( $p < 0,05$ ), por lo que la determinación de los niveles valle de TCZ sirve para predecir de forma eficaz y robusta la respuesta al tratamiento.



**Figura 4.58. Determinación de los niveles de valle de TCZ correspondientes al punto de corte terapéutico.** Se representa (A) la curva ROC a la semana 52 (LOCF) del seguimiento de una cohorte de 33 pacientes y (B) los potenciales puntos de corte terapéutico con las sensibilidades y especificidades asociadas. Se indica en negrita el punto de corte terapéutico seleccionado.

En la población de estudio 4 pacientes (12%) abandonaron el tratamiento con TCZ a lo largo de las 52 semanas del seguimiento por ineficacia y/o efectos secundarios del tratamiento, de los cuales 3 (75%) lo hicieron antes de la semana 26 (**figura 4.59.A**). En nuestra cohorte de pacientes la supervivencia al tratamiento con TCZ durante las 52 semanas del seguimiento fue menor en los/as pacientes no respondedores/as que en los/as pacientes respondedores/as (77% vs 95%,  $p < 0,05$ ), sin embargo, ambos empezaron a abandonar el tratamiento al mismo tiempo (**figura 4.59.B**).



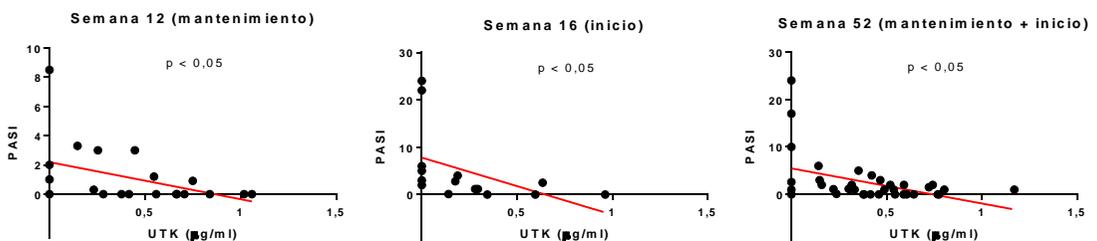
**Figura 4.59. Supervivencia de los/as pacientes al tratamiento con TCZ durante las 52 semanas del seguimiento.** Se representan las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia de (A) la población total y de (B) los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as (log rank,  $p < 0,05$ ).

### 4.8.3. Correlación de los niveles de UTK y de anticuerpos anti-UTK con la respuesta clínica en pacientes con PsO

En el estudio se incluyeron 37 pacientes, de los/as cuales 2 abandonaron el estudio a la semana 28 y 40 por falta de eficacia y un tercero a la semana 42 por un fallo renal, aunque estos/as 3 últimos/as pacientes sí fueron incluidos/as en el análisis estadístico por disponer de otros datos de interés.

A la semana 52, 33 pacientes (89%) y 20 pacientes (54%) respondieron al tratamiento con UTK reduciendo entre un 75% y un 90% (PASI75) y más de un 90% (PASI90) respectivamente, el valor del PASI basal. Las características demográficas y clínicas de la población total analizada se muestran en la **tabla 4.24**.

Se encontró una correlación inversa de los niveles valle de UTK con la respuesta clínica al tratamiento a la semana 52 del seguimiento de la población total ( $r -0,39$ , IC95%  $-0,52 - -0,25$ ,  $p < 0,05$ ). Aunque en el modelo de regresión lineal univariante parecía que existían otras variables que influían en la respuesta clínica como las edades de los/as pacientes en fecha del diagnóstico, al inicio del tratamiento con UTK y en el momento de inclusión en el estudio; el sexo, el PASI basal, el tiempo en tratamiento con UTK y el grupo terapéutico al que pertenecían los/as pacientes, en el modelo de regresión lineal multivariante la única variable que de manera independiente estaba asociada con la respuesta clínica era los niveles valle de UTK. La correlación más temprana que se encontró fue a las 12 semanas en los/as pacientes de mantenimiento ( $r -0,45$ , IC95%  $-0,75 - -0,01$ ,  $p < 0,05$ ) y a las 16 semanas en los/as de inicio ( $r -0,76$ , IC95%  $-0,92 - -0,32$ ,  $p < 0,05$ ) (**figura 4.60**).



**Figura 4.60. Correlación de los niveles de UTK con la respuesta clínica al tratamiento (PASI).** Se representa la dispersión del par de valores UTK/PASI para cada paciente de mantenimiento ( $n = 22$ ) a la semana 12, de inicio ( $n = 15$ ) a la semana 16 y para la población total ( $n = 37$ ) a la semana 52 del seguimiento. La regresión lineal se representa en rojo (Spearman,  $p < 0,05$ ).

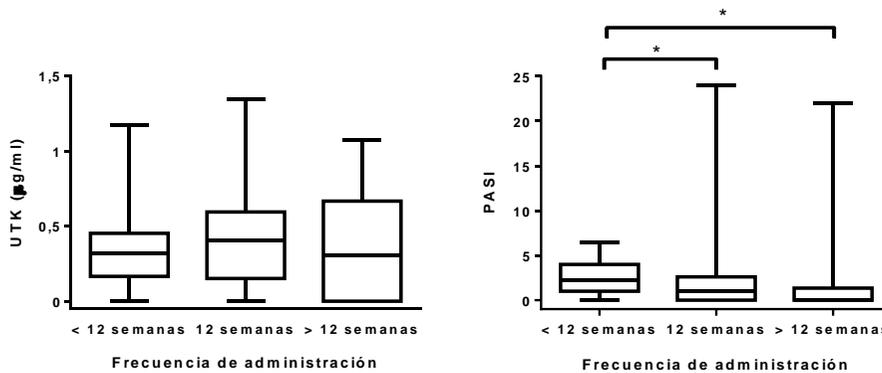
**Tabla 4.24. Características demográficas y clínicas de la población total y de los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as por el índice PASI a la semana 52 del seguimiento.** n/a, no aplica.

Variables del estudio	Población total (n = 37)	Respondedores/as PASI75 (n = 33)	No respondedores/as PASI75 (n = 4)	P	Respondedores/as PASI90 (n = 20)	No respondedores/as PASI90 (n = 17)	P
<b>Variables demográficas</b>							
Edad al inicio del estudio, años, mediana (IQR)	48,0 (39,0 – 57,5)	48,0 (38,0 – 55,5)	55,5 (47,0 – 65,5)	0,26	47,5 (38,5 - 52,0)	50,0 (39,5 - 65,0)	0,23
Edad al diagnóstico, años, mediana (IQR)	23,0 (14,0 – 39,0)	20,0 (14,0 – 39,0)	32,5 (26,2 – 58,2)	0,10	21,0 (14,0 - 32,0)	25,0 (16,5 - 42,5)	0,30
Edad al inicio del tratamiento con UTK, años, mediana (IQR)	48,0 (38,0 – 45,5)	46,0 (37,5 – 55,0)	56,5 (45,7 – 66,5)	0,17	44,5 (38,2 - 48,7)	51,0 (37,5 - 66,0)	0,14
Mujeres, n (%)	17 (46)	17 (100)	0 (0)	n/a	10 (59)	7 (41)	n/a
Hombre, n (%)	20 (54)	16 (80)	4 (20)	n/a	10 (50)	10 (50)	n/a
<b>Estado de la enfermedad</b>							
Duración de la enfermedad, años, mediana (IQR)	19,0 (11,0 – 35,5)	19 (12,0 – 33,5)	27 (7,7 – 44,7)	0,69	24,0 (12,0 - 34,0)	18,0 (7,0 - 41,7)	0,71
PASI inicio tratamiento con UTK, mediana (IQR)	13,0 (9,4 – 16,4)	12,7 (9,8 – 15,2)	16,8 (14,9 – 17,4)	0,22	10,0 (7,9 - 12,7)	14,7 (13,2 - 19,6)	<0,05
<b>Tratamientos</b>							
Grupo de inicio con UTK, n (%)	15 (40,5)	12 (80)	3 (20)	n/a	5 (33)	10 (67)	n/a
Grupo de mantenimiento con UTK, n (%)	22 (59,5)	21 (95,4)	1 (4,6)	n/a	15 (68)	7 (32)	n/a
Duración del tratamiento con UTK, meses, mediana (IQR)	5,0 (0,0 – 42,5)	9,0 (0,0 – 42,5)	0,0 (0,0 – 40,5)	0,46	24,5 (0,7 - 45,7)	0 (0 - 27)	0,07
Biológicos previos, n (%)	25 (67,6)	21 (84,0)	4 (16,0)	n/a	16 (25)	9 (36)	n/a
Un biológico, n (%)	8 (21,6)	6 (75)	2 (25)	n/a	6 (75)	2 (25)	n/a
Dos biológicos, n (%)	10 (27,0)	9 (90)	1 (10)	n/a	6 (60)	4 (40)	n/a
Tres biológicos, n (%)	7 (18,9)	6 (85,7)	1 (14,3)	n/a	4 (57)	3 (43)	n/a
Adalimumab, n (%)	16 (43,2)	14 (87,5)	2 (12,5)	n/a	9 (56,2)	7 (43,8)	n/a
Etanercept, n (%)	29 (51,3)	16 (84,2)	3 (15,8)	n/a	12 (63,2)	7 (36,8)	n/a
Efalizumab, n (%)	13 (35,1)	11 (84,6)	2 (15,4)	n/a	9 (69,2)	4 (30,8)	n/a

**Tabla 4.24. Características demográficas y clínicas de la población total y de los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as categorizados/as por el índice PASI a la semana 52 del seguimiento. n/a, no aplica.**

Variables del estudio	Población total (n = 37)	Respondedores/as PASI75 (n = 33)	No respondedores/as PASI75 (n = 4)	P	Respondedores/as PASI90 (n = 20)	No respondedores/as PASI90 (n = 17)	P
<b>Tratamientos concomitantes</b>	5 (13,5)	4 (80)	1 (20)	n/a	1 (20)	4 (80)	n/a
Metotrexato, n (%)	2 (5,4)	2 (100)	0 (0)	n/a	0 (0)	2 (100)	n/a
Leflunomida, n (%)	1 (2,7)	1 (100)	0 (0)	n/a	1 (100)	0(0)	n/a
Ciclosporina A, n (%)	2 (5,4)	1 (50)	1 (50)	n/a	0 (0)	2 (100)	n/a

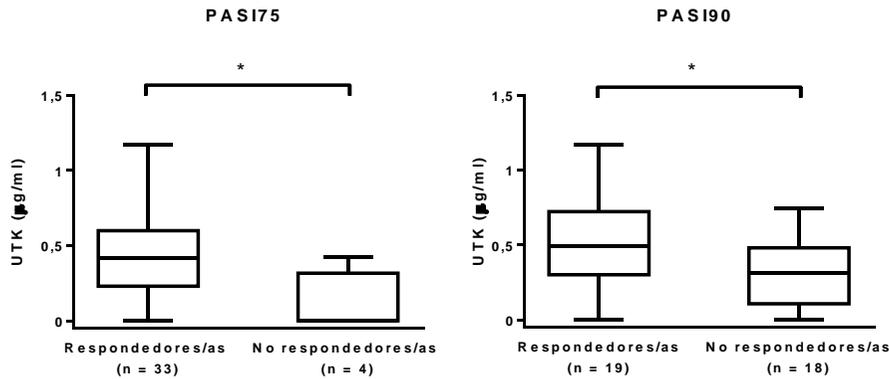
Se estudiaron los niveles valle de UTK en función de la frecuencia de administración. La frecuencia de administración recomendada es de una dosis de UTK cada 12 semanas, sin embargo, en la población estudiada si los/as pacientes presentaban en algún momento puntual un PASI elevado, eran sometidos/as a un tratamiento intensificado aumentando la frecuencia de administración (8 - 10 semanas) y si presentaban un PASI bajo, eran sometidos/as a un tratamiento más espaciado (14 - 19 semanas).



**Figura 4.61. Niveles valle de UTK y valores de PASI en función de la frecuencia de administración de UTK.** Se representa la mediana de los niveles valle de UTK y de los valores de PASI de una cohorte de 37 pacientes, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \**p* < 0,05).

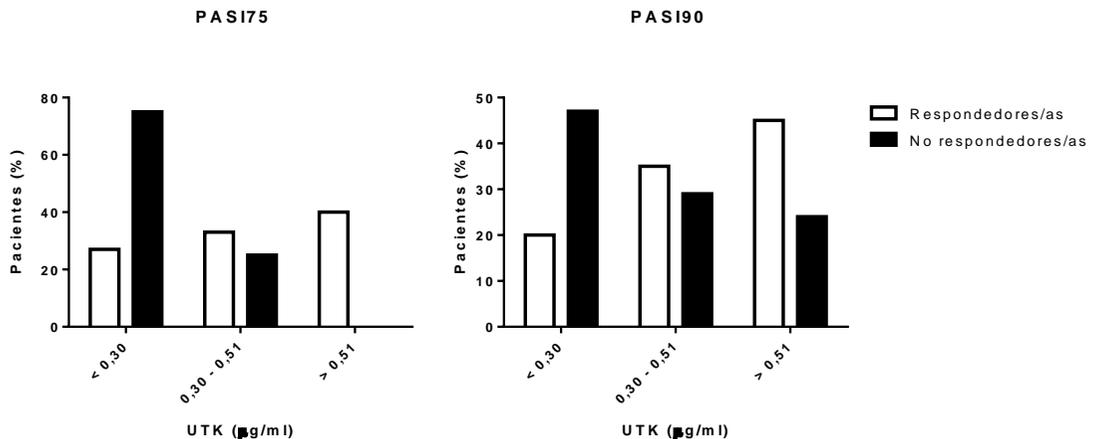
No se observaron diferencias en los niveles valle de UTK en los/as pacientes con la frecuencia recomendada de 12 semanas (mediana 0,41 µg/ml, IQR 0,15 - 0,59), ni en los/as que tuvieron tratamiento intensificado (0,32 µg/ml, IQR 0,18 - 0,443, *p* = 0,458) o espaciado (mediana 0,31 µg/ml, IQR 0 - 0,67, *p* = 0,383). Por el contrario, sí se observaron menores valores de PASI en los/as pacientes sometidos/as a un tratamiento con la frecuencia recomendada de 12 semanas (mediana 1,0, IQR 0 - 2,4, *p* < 0,05) y en los/as sometidos/as a un tratamiento espaciado (mediana 0, IQR 0 - 1,2, *p* < 0,05) frente a los/as que tuvieron un tratamiento intensificado (mediana 2,25, IQR 1,0 - 4,0) (**figura 4.61**).

Los/as pacientes respondedores/as presentaron niveles mayores de UTK que los/as no respondedores/as tanto para el PASI75 (mediana 0,42 µg/ml, IQR 0,23 - 0,60 vs < 0,131 µg/ml, IQR < 0,131 - 0,32, *p* < 0,05) como para el PASI90 (mediana 0,49 µg/ml, IQR 0,30 - 0,72 vs 0,31 µg/ml, IQR < 0,11 - 0,48, *p* < 0,05) (**figura 4.62**).



**Figura 4.62.** Niveles valle de UTK de pacientes respondedores/as y no respondedores/as para el PASI75 y PASI90. Se representa la mediana de los niveles valle de UTK a la semana 52 del seguimiento de una cohorte de 37 pacientes, junto con el IQR y los valores máximo y mínimo (*U* de Mann-Whitney, \**p* < 0,05).

A continuación, los/as pacientes fueron estratificados/as en terciles en función de los niveles valle de UTK.

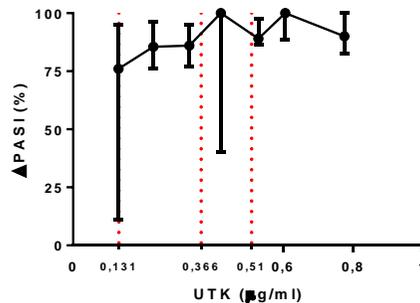


**Figura 4.63.** Pacientes estratificados en terciles en función de los niveles valle de UTK a la semana 52 del seguimiento. TC<sub>1</sub>: UTK < 0,30 µg/ml, 12 pacientes (32%), TC<sub>2</sub>: 0,30 ≤ UTK ≤ 0,51 µg/ml, 12 pacientes (32%), TC<sub>3</sub>: UTK > 0,51 µg/ml, 13 pacientes (36%).

El 75% y el 47% de los/as pacientes no respondedores/as para el PASI75 y para el PASI90 respectivamente, se encontraban en el menor tercil (TC<sub>1</sub>: UTK < 0,30 µg/ml), mientras que el 39% y el 45% de los/as pacientes respondedores/as para el PASI75 y para el PASI90 respectivamente, lo hacían en el mayor tercil (TC<sub>3</sub>: UTK > 0,51 µg/ml). A medida que en los/as pacientes aumentaban los

niveles valle de UTK también lo hacía el porcentaje de pacientes respondedores/as y disminuía el de no respondedores/as (**figura 4.63**).

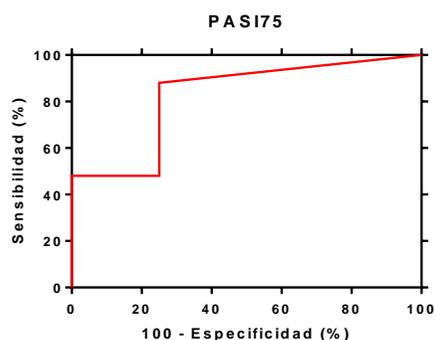
Para establecer la curva de concentración-efecto de UTK, los niveles valle de UTK de una cohorte de 37 pacientes fueron clasificados en 7 grupos en orden creciente y correlacionados con la disminución del valor del PASI respecto al basal ( $\Delta$ PASI) (**figura 4.64**). El rango de niveles valle de UTK delimitado por líneas punteadas parece ser suficiente para obtener una buena respuesta clínica. Para alcanzar el PASI75 es suficiente con presentar niveles detectables mientras que para alcanzar el PASI90 son suficientes concentraciones de 0,366  $\mu$ g/ml.



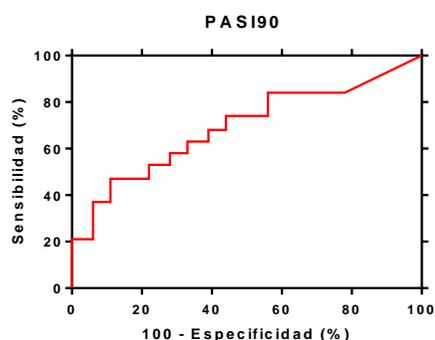
**Figura 4.64. Curva de concentración-efecto de UTK.** Se representan los niveles valle de UTK de cada grupo de pacientes correlacionados con la mediana y el IQR de la disminución de  $\Delta$ PASI ( $\geq 75\%$  y  $\geq 90\%$ ). Los pacientes fueron estratificados en 7 grupos (4 grupos de 5 pacientes, 2 grupos de 4 pacientes y 1 grupo de 9 pacientes). Los rangos terapéuticos óptimos aparecen delimitados por líneas punteadas.

Aplicando el análisis de la curva ROC sobre los datos de los niveles valle de UTK y PASI de los/as pacientes con PsO a la semana 52, se establecieron unas concentraciones valle de UTK de 0,137 y 0,366  $\mu$ g/ml como los puntos de corte terapéutico para alcanzar el PASI75 y el PASI90 respectivamente, con una sensibilidad del 88% (IC95% 72 – 97%) y una especificidad del 75% (IC95% 19 – 99%) para el PASI75 y con una sensibilidad del 68% (IC95% 43 – 87%) y una especificidad del 61% (IC95% 36 – 83%) para el PASI90 (**figura 4.65**), lo que concuerda con la información obtenida con la curva concentración-efecto, por lo tanto, niveles valle de UTK inferiores a dichos valores se asocian con una pérdida de respuesta al tratamiento con UTK. Así, 3 pacientes (75%) con niveles valle de UTK inferiores a 0,137  $\mu$ g/ml fueron no respondedores/as para el PASI75 y 29 pacientes (88%) con niveles valle de UTK superiores a 0,137  $\mu$ g/ml fueron respondedores/as a la semana 52 del seguimiento ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, 11 pacientes (65%) con niveles valle de UTK

inferiores a 0,366  $\mu\text{g/ml}$  fueron no respondedores/as para el PASI90 y 14 pacientes (70%) con niveles valle de UTK superiores a 0,366  $\mu\text{g/ml}$  fueron respondedores/as a la semana 52 del seguimiento ( $p < 0,05$ ).



	Sensibilidad % (IC95%)	Especificidad % (IC95%)
<b>UTK &gt;0,137 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>88 (72 – 97)</b>	<b>75 (19 – 99)</b>
UTK >0,146 $\mu\text{g/ml}$	84 (68 – 95)	75 (19 – 99)
UTK >0,154 $\mu\text{g/ml}$	82 (61 – 91)	75 (19 – 99)
UTK >0,191 $\mu\text{g/ml}$	79 (58 – 89)	75 (19 – 99)
UTK >0,229 $\mu\text{g/ml}$	76 (54 – 87)	75 (19 – 99)

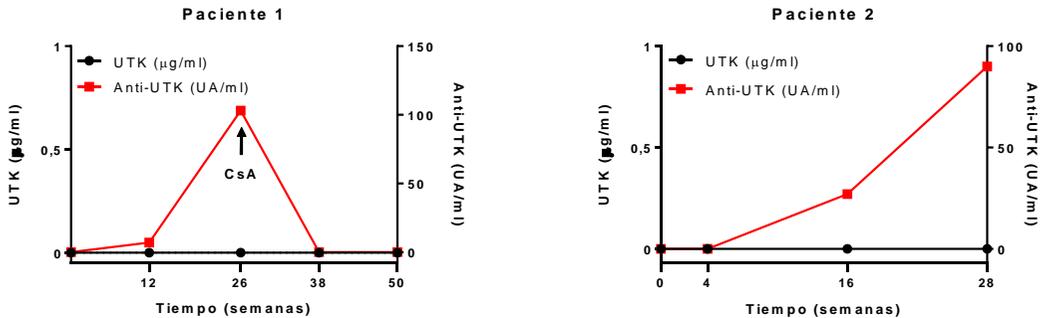


	Sensibilidad % (IC95%)	Especificidad % (IC95%)
UTK >0,313 $\mu\text{g/ml}$	74 (49 – 90)	50 (26 – 74)
UTK >0,324 $\mu\text{g/ml}$	74 (49 – 90)	56 (31 – 78)
UTK >0,342 $\mu\text{g/ml}$	68 (43 – 87)	56 (31 – 78)
<b>UTK &gt;0,366 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>68 (43 – 87)</b>	<b>61 (36 – 83)</b>
UTK >0,381 $\mu\text{g/ml}$	63 (38 – 84)	61 (36 – 83)

**Figura 4.65. Determinación de los niveles de valle de UTK correspondientes al punto de corte terapéutico.** Se representa la curva ROC (izquierda) a la semana 52 del seguimiento de una cohorte de 37 pacientes y los potenciales puntos de corte terapéutico con las sensibilidades y especificidades asociadas (derecha). Se indica en negrita los puntos de corte terapéutico seleccionados.

El área bajo la curva ROC representa la robustez del ensayo para predecir la respuesta al tratamiento en función de los niveles valle de UTK. El área bajo la curva obtenida en el análisis del PASI75 fue 0,83 (0,58 – 0,92) y en el del PASI90 fue 0,69 (0,52 – 0,86), en ambos casos mayor que 0,5 ( $p < 0,05$ ), por lo que la determinación de los niveles valle de UTK sirve para predecir de forma eficaz y robusta la respuesta al tratamiento.

Durante el estudio, se detectaron 2 pacientes (5,4%) con anticuerpos anti-UTK los cuales empezaron el tratamiento con UTK en el momento de su inclusión en el estudio (**figura 4.66**).



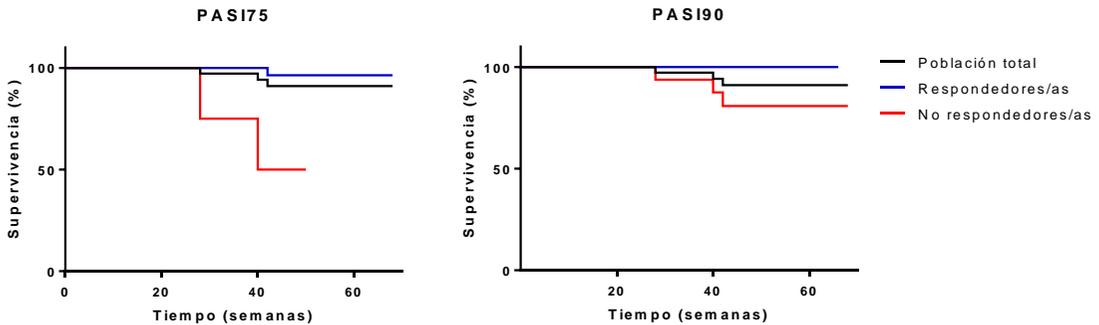
**Figura 4.66.** Niveles valle de UTK y de anticuerpos anti-UTK de los dos pacientes que desarrollaron anticuerpos antifármaco. Se representa la evolución de los niveles de UTK y de anticuerpos anti-UTK durante el seguimiento de los pacientes. CsA, ciclosporina A.

El paciente 1, un hombre de 48 años, desarrolló anticuerpos anti-UTK a las 12 semanas desde el inicio del tratamiento, con niveles valle de 7 UA/ml, pero que aumentaron hasta 103 UA/ml a la semana 26, momento en el que empezó a recibir ciclosporina A (CsA) como tratamiento concomitante. A la semana 38 presentaba niveles indetectables de anticuerpos anti-UTK (< 3 UA/ml) manteniéndose en tratamiento con UTK y CsA hasta que abandonó el tratamiento. El paciente 2, un hombre de 67 años al que le diagnosticaron PsO un año antes de su inclusión en el estudio y que previamente estuvo en tratamiento con ADL (8 meses), desarrolló anticuerpos anti-UTK a la semana 16 desde el inicio del tratamiento con UTK presentando niveles valle de 27 UA/ml que aumentaron hasta 90 UA/ml a la semana 28, momento en el que se suspendió el tratamiento por falta de eficacia.

Ambos pacientes con anticuerpos anti-UTK presentaron niveles de UTK menores que los que no desarrollaron anticuerpos (mediana  $\leq 0,131$  µg/ml, IQR 0 vs mediana 0,42 µg/ml, IQR 0,22 – 0,59,  $p < 0,05$ ) y valores de PASI mayores (mediana 17, IQR 10 – 24 vs mediana 1, IQR 0 – 2,  $p < 0,05$ ).

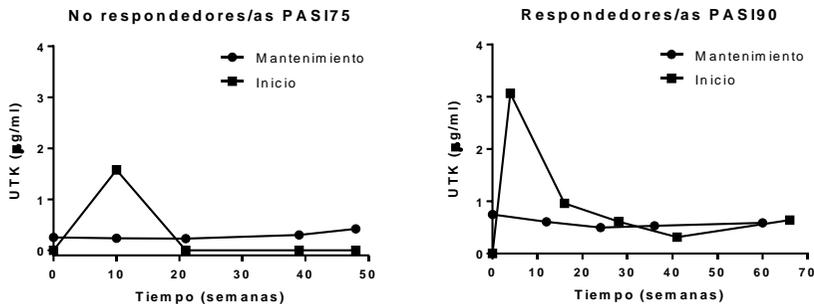
En la población de estudio 3 pacientes (8%) abandonaron el tratamiento con UTK a lo largo de las 52 semanas del seguimiento por ineficacia y/o efectos secundarios del tratamiento, de los/as cuales uno (33%) lo hizo a la semana 26 y los/as dos restantes alrededor de la semana 40 del

seguimiento (**figura 4.67**). En nuestra cohorte de pacientes la supervivencia al tratamiento con UTK durante las 52 semanas del seguimiento fue menor en los/as pacientes no respondedores/as que en los/as pacientes respondedores/as tanto para el PASI75 (50% vs 96%,  $p < 0,05$ ) como para el PASI90 (81% vs 100%,  $p < 0,05$ ) abandonando antes el tratamiento.



**Figura 4.67. Supervivencia de los/as pacientes al tratamiento con UTK durante las 52 semanas del seguimiento.** Se representan las curvas de Kaplan-Meier de la población total y de los/as pacientes respondedores/as y no respondedores/as para el PASI75 y para el PASI90 (log rank,  $p < 0,05$ ).

En la **figura 4.68** se observa la evolución típica de los niveles de UTK en la población estudiada para la peor y la mejor de las situaciones de respuesta clínica posibles que corresponden a la de los/as pacientes no respondedores/as para el PASI75 y a la de los/as pacientes respondedores/as para el PASI90 respectivamente.



**Figura 4.68. Perfil típico de la evolución de los niveles valle de UTK a lo largo de las 52 semanas del seguimiento.** Se representan los niveles valle de UTK del prototipo de pacientes no respondedores/as para el PASI75 y respondedores/as para el PASI90.

# **DISCUSIÓN**

---



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Diseño, desarrollo y optimización de los inmunoensayos ELISA

La monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos aporta información de gran utilidad en la clínica para el ajuste de la dosis y de la frecuencia de administración, pero además podría servir para predecir la respuesta clínica al tratamiento y anticipar los efectos adversos derivados de estos fármacos como por ejemplo las reacciones infusionales (Bendtsen y cols. 2006; Llinares-Tello y cols. 2012; Rosas y cols. 2014a; Scott y cols. 2016).

Existen competidores de ámbito internacional para la monitorización de fármacos biológicos con distintos tipos de metodologías. El Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países bajos) es una plataforma de análisis que utiliza ensayos ELISA de captura vía TNF $\alpha$  (para la determinación de la biodisponibilidad de antagonistas del TNF $\alpha$  (Wolbink y cols. 2005) como GLM), o vía IL-12 (para la determinación de la biodisponibilidad de UTK (Chiu y cols. 2015; Menting y cols. 2015a)), utilizando como sistema de detección un anticuerpo antiidiotipo marcado con la enzima HRP directamente o vía biotina-estreptavidina. Para los ensayos de inmunogenicidad utiliza ensayos RIA, donde los anticuerpos antifármaco son capturados de la muestra por la proteína A o un anticuerpo anti-Fc humano sobre una matriz de sefarosa y posteriormente detectados por los fármacos en formato F(ab')<sub>2</sub> marcados directamente con el radioisótopo <sup>125</sup>I (Wolbink y cols. 2006) o vía biotina-estreptavidina marcada radiactivamente. La empresa de innovación para bioterapias Theradiag (Francia) posee kits comerciales (LISA-TRACKER<sup>®</sup>) para la determinación de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos, basados en tecnología ELISA (Benucci y cols. 2016). Los ensayos de biodisponibilidad de GLM y TCZ se basan en el formato ELISA de captura vía TNF $\alpha$  e IL-6R respectivamente, con anticuerpos de detección anti-hIgG, y el de UTK en el formato ELISA sándwich empleando anticuerpos antiidiotipo, todos ellos con un sistema de detección basado en biotina-estreptavidina-HRP. Los ensayos de inmunogenicidad de Theradiag se basan, al igual que nuestros ensayos, en el formato ELISA puente en el que los anticuerpos antifármaco son capturados por los fármacos y detectados por los propios fármacos con el mismo sistema de detección que en sus ensayos de biodisponibilidad. Existen otros kits competidores para la determinación de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de fármacos biológicos como son los de Immundiagnostik (Alemania) y Matriks Biotechnology (Turquía), que disponen de kits basados en ELISA para la

cuantificación de GLM así como de anticuerpos anti-GLM con un sistema de detección con HRP. La empresa Prometheus Inc. (EEUU) utiliza ensayos de cambio de movilidad en fase líquida para la monitorización de fármacos biológicos (IFX, ADL, VDL) en pacientes con EII basados en marcadores fluorescentes y técnicas cromatográficas tanto para la cuantificación de fármaco como de anticuerpos antifármaco (Vande Casteele y cols. 2015). Por último, existen kits con la tecnología del gen reportero basados en células (*iLite<sup>TM</sup>*) introducidos en el mercado por la actualmente fusionada empresa Eurodiagnostika-Biomonitor (Suecia) para la determinación cuantitativa de los niveles de antagonistas del TNF $\alpha$  y semicuantitativa de los niveles de anticuerpos antifármaco (Lallemand y cols. 2011).

En base a la información disponible acerca de las tecnologías existentes, se seleccionó la tecnología ELISA para el desarrollo de los inmunoensayos para la determinación de niveles de fármaco así como de anticuerpos antifármaco por ser la más ampliamente utilizada (Bendtzen 2015), no requerir equipamientos especiales de alto coste ni personal altamente cualificado, ser fácilmente automatizable y permitir analizar un gran número de muestras por tanda. Además, la capacidad de diseñar inmunoensayos ELISA para casi cualquier antígeno y poder así desarrollar dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* con costes relativamente bajos pero a la vez fiables para la detección y cuantificación de infinidad de moléculas (anticuerpos, hormonas), ha revolucionado las técnicas bioquímicas ajustándose a los presupuestos cada vez mas limitados de los/as investigadores/as en el ámbito clínico. Con la tecnología ELISA pretendimos conseguir inmunoensayos *sensibles*, capaces de detectar fármacos y anticuerpos antifármaco a una concentración lo suficientemente baja para satisfacer los objetivos para los que fueron desarrollados; *específicos*, sin reactividad cruzada frente a otras moléculas estructuralmente similares que pudieran estar presentes en la misma muestra; *sencillos*, constituyendo métodos fáciles de desarrollar con la obtención relativamente rápida de resultados; *estables*, utilizando reactivos termoestables para obtener unas características analíticas robustas; *seguros*, incluyendo reactivos y componentes no peligrosos y que no requieren una manipulación especial más allá de las buenas prácticas de laboratorio; y *coste-efectivos*, pudiendo analizar un número elevado de muestras en poco tiempo de manera simultánea.

Entre todos los formatos ELISA existentes, seleccionamos el tipo sándwich para la determinación de los niveles de fármaco al ser más sensible, preciso y robusto que el directo, el competitivo e incluso el de captura. Sin embargo, para el desarrollo del inmunoensayo para la

determinación de niveles de GLM se seleccionó adicionalmente el ensayo de captura debido a su uso extendido entre la competencia, a la amplia experiencia de Progenika Biopharma, a Grifols Company, en el desarrollo de inmunoensayos de captura vía TNF $\alpha$  y a la elevada especificidad de unión ofrecida por el reconocimiento directo del antígeno. Esta opción no se consideró para los ensayos de biodisponibilidad de TCZ ni de UTK debido a la inexperiencia de Progenika Biopharma, a Grifols Company en el desarrollo de inmunoensayos ELISA de captura para otras dianas terapéuticas distintas del TNF $\alpha$ , por lo poco extendido que está este formato de inmunoensayo entre la competencia concretamente para estas dianas y por la dificultad adicional al tratarse de moléculas estructuralmente más complejas que el TNF $\alpha$ . Los ensayos de captura conllevan dos pasos para la realización del tapizado de las placas ya que los antígenos se inmovilizan a través de una proteína o un anticuerpo para conservar su configuración nativa, lo que provoca un aumento de los costes de producción así como un mayor tiempo de procesamiento durante su fabricación, pero ofrece mejores resultados que la inmovilización directa, técnica que aplica Theradiag en su ensayo de biodisponibilidad de TCZ al inmovilizar IL-6R en ausencia de una proteína adaptadora.

En el caso de los inmunoensayos para la determinación de niveles de anticuerpos antifármaco, seleccionamos el formato ELISA puente ampliamente utilizado y descrito en la literatura por su gran especificidad ya que aprovecha la funcionalidad multivalente de los anticuerpos antifármaco. Además, se descarta el uso de radiactividad o técnicas tan complejas como las basadas en células y, por tanto, los requerimientos regulatorios estrictos necesarios para la comercialización de kits basados en dichas tecnologías.

Existe una amplia variedad de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales, comercialmente disponibles y de los propios antígenos diana humanos recombinantes reconocidos específicamente por los fármacos para el desarrollo de los inmunoensayos.

Los inmunoensayos en los que se utilizan AcM presentan una sensibilidad inferior ya que solamente se une una molécula de AcM a una molécula de fármaco, a diferencia de lo que ocurre en los inmunoensayos en los que se utilizan AcP, en los que múltiples moléculas de AcP se unen a una sola molécula de fármaco aumentando por tanto, la sensibilidad. Sin embargo, los AcP empleados como sistema de detección necesitan ser purificados previamente para evitar uniones inespecíficas de otras proteínas marcadas con una enzima presentes en el suero que contiene los AcP y en muchos

casos también cuando se utilizan como anticuerpos de captura (Rispens y cols. 2011). Los AcM presentan una alta especificidad y afinidad por un único epítipo en el fármaco, lo que le confiere una mayor vulnerabilidad a cambios estructurales o conformacionales de dicho epítipo. El empleo de mezclas de AcM podría solventar dicha situación, aunque supondría un aumento de los costes y de la complejidad de la optimización del inmunoensayo.

Puesto que los AcM confieren mayor especificidad y, por tanto, menor ruido de fondo, para el desarrollo de este trabajo seleccionamos, como anticuerpos de captura y detección de los inmunoensayos de biodisponibilidad AcM diseñados por *HuCAL<sup>®</sup> Antibody Technology* (AbD Serotec, a Bio-Rad Company (Alemania)), con una tecnología basada en la expresión en fagos (*phage display*). Esta técnica requiere la utilización de proteínas purificadas como antígenos para la formación de anticuerpos específicos. En nuestro caso los antígenos fueron los propios fármacos: GLM (Simponi<sup>®</sup>), TCZ (Actemra<sup>®</sup>) y UTK (Stelara<sup>®</sup>). Los AcM obtenidos fueron fragmentos F(ab')<sub>2</sub> cuyo reducido tamaño (110 KDa) podría suponer, debido al bajo número de sitios accesibles y funcionales que presentan, una desventaja a la hora de unirse a una enzima o a otra molécula generadora de señal, disminuyendo así la sensibilidad del ensayo. Para minimizar esta situación, estos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> podrían haberse transformado en una IgG con fracción Fc. Sin embargo, esta opción se descartó y se optó por los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, ya que al estar desprovistos de la fracción Fc, se evita la aparición de inespecificidades de unión por reacción de Fc con ciertos receptores o por ser el blanco de anticuerpos heterófilos, como el FR o el sistema del complemento, disminuyendo por tanto, la susceptibilidad a la aparición de resultados falsos positivos. Asimismo, debido a su menor tamaño por comparación con la estructura IgG, los impedimentos estéricos serían menores por el menor volumen espacial conferido, lo que resulta beneficioso en los inmunoensayos en fase sólida estacionaria en los que la difusión a través de los límites de las capas de reacción es el paso limitante.

Para cada fármaco se obtuvo una batería de anticuerpos en formato F(ab')<sub>2</sub>, que reconocían cada uno de ellos un único epítipo, y distinto del resto, con afinidades diferentes y, por lo tanto, con uniones a través de fuerzas de distinta magnitud, como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y pares iónicos. Los anticuerpos obtenidos fueron específicos para el antígeno concreto, encontrándose pocas inespecificidades o reacciones cruzadas. En el caso de los AcM anti-GLM solo se observó reactividad cruzada con ADL. Este fármaco es un anticuerpo totalmente humano, como GLM. De entre los 28 anticuerpos obtenidos, se seleccionaron los 16 que no ofrecían señal cruzada

con ADL o presentaban niveles muy bajos de intensidad (**figura 4.1.A**). En el caso de TCZ, la especificidad de los anticuerpos anti-TCZ obtenidos fue más heterogénea, llegándose a obtener  $F(ab')_2$  que proporcionaron una señal débil o nula, probablemente debido a bajas afinidades por sus epítomos o a una localización de los mismos muy cercana entre sí o difícilmente accesibles dentro de la estructura tridimensional de TCZ. Se seleccionaron aquellos con una mayor intensidad de señal específica por TCZ (**figura 4.1.B**). En el caso de los anticuerpos anti-UTK no se observaron inespecificidades con otros antígenos de estructura similar, pero sí ofrecieron señales positivas frente a los inmunocomplejos formados entre UTK y la IL-12 e IL-23. Se seleccionaron aquellos anticuerpos con mayor intensidad de señal para UTK y menor intensidad de señal frente a los inmunocomplejos y además, aquel que mayor intensidad de señal ofreció para estos últimos, con el fin de estudiar cómo influía esto en la elección de la pareja de anticuerpos final (**figura 4.1.C**).

Tras la obtención de los AcM, se seleccionaron las parejas de anticuerpos adecuadas enfrentando todos los AcM disponibles entre sí para cada fármaco (**figura 4.2**). Se encontraron parejas formadas por distintos fragmentos  $F(ab')_2$  en orientación de captura y de detección válidas para los inmunoensayos de determinación de los niveles de los tres fármacos y otras parejas que no ofrecieron ninguna señal perceptible probablemente debido a impedimentos estéricos, por encontrarse los epítomos en el fármaco muy cercanos entre sí y no permitir la unión simultánea de dos anticuerpos, o a que la unión del fármaco al anticuerpo de captura pudiera haber provocado alguna alteración en el epítomo de unión del AcM de detección. En el desarrollo de inmunoensayos ELISA tipo sándwich hay que tener en cuenta que los anticuerpos seleccionados como captura y detección reconozcan distintos epítomos para evitar interferencias entre ellos. Teniendo en cuenta este principio, se descartó la combinación en la que el mismo anticuerpo actuaba como AcM de captura y de detección. Finalmente, se seleccionó la pareja que proporcionó el mayor ratio entre la señal específica de detección del fármaco correspondiente y la inespecífica del ruido de fondo siempre y cuando la contribución más importante al aumento del valor del ratio fuera la intensidad de señal específica y no el menor ruido de fondo. En cualquier caso el valor del ratio debía ser mayor de 5, impuesto de forma arbitraria desde el desconocimiento de las afinidades que íbamos a encontrar, con lo que presuponíamos una clara distinción entre la señal positiva del fármaco con respecto a la señal negativa del fondo, y la intensidad de señal del fondo no debía ser superior a 0,1 ua y lo más baja posible para evitar la aparición de resultados falsos positivos y conseguir una sensibilidad mayor en los inmunoensayos.

En el caso del inmunoensayo de determinación de niveles de UTK, el único AcM de detección funcional en el inmunoensayo fue aquel que proporcionó la máxima señal en la detección de los inmunocomplejos formados entre UTK y la IL-12 e IL-23 (**figura 4.2.C**). Puesto que la fracción de UTK unida a las IL debería ser despreciable frente a la fracción libre biológicamente activa (Brito-Luna *y cols.* 2016), se continuó la puesta a punto del inmunoensayo con este AcM.

Con la pareja seleccionada se procedió a la optimización de las condiciones de los inmunoensayos para obtener productos altamente sensibles y específicos y de gran robustez.

La inmovilización de los AcM de captura se llevó a cabo en un soporte sólido por adsorción pasiva, es decir, por formación de enlaces no covalentes entre las regiones hidrofóbicas de los anticuerpos y la superficie plástica apolar del soporte. Este método es fácil de realizar y no requiere el uso de una complicada química de inmovilización como en las uniones covalentes en las que hay que someter el soporte a un pretratamiento adecuado. La proporción de proteína unida al soporte puede variar del 5% al 95% y la capacidad de inmovilización es directamente proporcional a la hidrofobicidad del soporte sólido por lo que es de suma importancia buscar las mejores condiciones para el tapizado. Se emplearon placas de 96 pocillos de poliestireno altamente hidrofóbico, de uso muy extendido en este tipo de inmunoensayos ELISA, provistas de la tecnología Maxisorp™ que asegura una capacidad superior de unión a proteínas. Se eligieron pocillos de fondo plano por ser los más utilizados en los métodos de detección basados en espectrofotometría en lugar de los de fondo redondeado, más comúnmente usados en determinaciones visuales directas. La inmovilización de los anticuerpos de captura a concentraciones bajas puede alterar su funcionalidad y a concentraciones altas se puede producir agregación proteica, disminuyendo la eficiencia de inmovilización, por la posible aparición de neoepítos. Además, esta inmovilización podría provocar la desnaturalización parcial de los anticuerpos que, siempre y cuando no afecte a los parátos de las regiones variables de unión al antígeno, no sería un inconveniente. En esta situación podrían exponerse más residuos hidrofóbicos capaces de interactuar con el soporte al mismo tiempo que se orientarían los residuos hidrofílicos hacia el exterior, aumentando la eficiencia sin perder la capacidad de unión al antígeno. Por otra parte, una orientación de los anticuerpos inadecuada en el soporte podría conllevar una menor sensibilidad del inmunoensayo que podría solucionarse inmovilizando los anticuerpos al soporte a través de la fracción Fc. En nuestros inmunoensayos de biodisponibilidad no era una opción factible por tratarse de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> desprovistos de la región Fc. En el caso de los

inmunoensayos de inmunogenicidad sí podría haberse considerado esta aproximación, sin embargo, como los resultados obtenidos con la adsorción pasiva directa fueron satisfactorios, no se necesitó de una química de inmovilización más complicada por medio de proteínas intermediarias como la Proteína A o G. En estos inmunoensayos el anticuerpo de captura es el fármaco el cual presenta patrones de glucosilación en la fracción Fc, que podría haber disminuido la eficiencia de inmovilización por su carácter polar. En el caso de haber necesitado aumentar la eficiencia de inmovilización, se podría haber pretratado los fármacos con disoluciones ácidas aumentando así su hidrofobicidad, asumiendo, por otro lado, el riesgo de desnaturalización de la proteína. En la selección del tampón de inmovilización era importante evitar aquellos cuya formulación contara con detergentes o proteínas ya que competirían por la unión al soporte, disminuyendo por tanto, la inmovilización de los anticuerpos de interés. El tampón de inmovilización que se utilizó fue carbonato/bicarbonato 0,05 M a pH 9,6 ya que este pH es superior al punto isoeléctrico de los anticuerpos de captura permitiendo que estos precipiten e interaccionen con el soporte de manera más eficiente. A diferencia de la fuerza iónica, la temperatura y el tiempo de incubación son factores que influyen en la eficiencia de inmovilización, sin embargo, no observamos variación en los resultados finales de los inmunoensayos cuando la incubación con el anticuerpo de captura se realizó a temperatura ambiente durante 2 - 6 h o a 4°C durante toda la noche, por lo que el tapizado se realizó a temperatura ambiente durante 2 h para todos los inmunoensayos (resultados no mostrados). Aunque la tasa de difusión de los anticuerpos hacia el soporte es mayor cuando la inmovilización se lleva a cabo con agitación de la placa, en nuestros inmunoensayos solo se aplicó este principio para la unión del TNF $\alpha$  al anti-TNF $\alpha$  en el tapizado para el ensayo de inmunocaptura de GLM, ya que sin agitación se requerían tiempos mucho mayores para producirse la unión. Para lavar el exceso de anticuerpo de captura no inmovilizado se utilizó un tampón con detergente (PBS + 0,2% Tween 20). Tras eliminar el exceso de anticuerpos de captura no unido se aplicó un tampón de bloqueo de uniones inespecíficas a base de caseína (UCDB) la cual es inerte en la reacción frente a los fármacos y anticuerpos antifármacos con los que trabajamos. Esta proteína se adsorbe al soporte sólido entre los posibles espacios que han dejado los anticuerpos de captura inmovilizados para evitar que los anticuerpos de detección y moléculas de baja afinidad en las muestras a analizar, se unan al soporte y originen inespecificidades. Con la intención de integrar los inmunoensayos en un kit para el diagnóstico *in vitro* donde las placas ELISA ya están tapizadas (pretapizado) debíamos tratar la placa con el anticuerpo de captura inmovilizado con un reactivo estabilizante que asegure, al menos, 12 meses de estabilidad a 2 - 8°C, siendo deseables 19 meses. En un primer momento se seleccionó el reactivo

StabDry (composición a base de azúcares), que no consiguió otorgar a todos los productos los 19 meses deseables por lo que se sustituyó por el reactivo DBS-C (composición a base de caseína) que actúa como bloqueante y estabilizante a la vez, por lo que también sustituía al reactivo UCDB. Este cambio, junto con el cambio de estufas de convección natural por estufas de vacío para realizar el secado final de las placas, supuso una reducción del tiempo empleado en el preapizado de las placas ELISA de 2 días laborales a una única jornada laboral de 8 h.

El **sistema de detección** seleccionado para los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad consistió en los AcM o fármacos respectivamente, unidos directamente a una enzima que generara una señal detectable por colorimetría al reaccionar con un sustrato determinado. La enzima seleccionada fue HRP, la más utilizada para marcar anticuerpos en inmunoensayos ELISA. Al ser una glucoproteína de pequeño peso molecular (44 KDa) con 6 residuos de lisina participantes en la unión a los anticuerpos y con una tasa de recambio elevada, permite la generación de una fuerte señal en periodos de tiempo cortos. La HRP es una enzima más estable, más económica y con ella se consiguen mayores sensibilidades que con otras enzimas, como la fosfatasa alcalina, en las mismas condiciones del inmunoensayo. La utilización de un sistema de detección formado por un anticuerpo primario y otro secundario conlleva la obtención de sensibilidades mayores, ya que cada anticuerpo primario presenta varios epítomos que pueden unirse al anticuerpo secundario amplificándose así la señal. Aun así, este formato de sistema de detección se descartó debido a la gran susceptibilidad a uniones inespecíficas por la presencia del anticuerpo secundario y al paso extra de incubación que supone, incrementando el tiempo de procesado de las muestras por parte del usuario final.

El marcaje de los AcM con la HRP se realizó de manera directa por medio del método del peryodato aprovechando el carácter altamente glucosilado de la HRP y haciendo reaccionar los grupos amino de los AcM con los grupos aldehído de la HRP, para obtener un producto intermedio con un enlace imina o base de Schiff inestable. Este enlace, es reducido en presencia de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  para estabilizar el producto final por formación de un enlace amino secundario. El pretratamiento de la HRP con peryodato es un paso importante en la oxidación de los azúcares de la HRP para conseguir grupos aldehído funcionales ya que concentraciones altas y tiempos de reacción excesivos pueden dañar su estructura. En nuestro caso la HRP comercial que utilizamos fue un líofilo ya pretratado, por lo que desconocemos el protocolo de oxidación.

La reacción de conjugación se puede llevar a cabo a **pH** 7,2 y 9,6 por recomendación del fabricante (Pierce, EEUU). A priori podíamos pensar que la eficiencia de conjugación fuera mayor a pH 9,6 ya que para que se diera la reacción debía existir una fracción elevada de grupos amino desprotonados ( $\text{NH}_2$ ) para lo cual el pH del medio en el que se llevara a cabo el proceso debía ser superior al  $\text{pK}_a$  de los grupos amino que se encuentra en 9,6. Por debajo de este pH, los grupos amino predominantes estarían protonados ( $\text{NH}_3^+$ ) y alrededor de pH 7 la reacción podría no tener lugar. Sin embargo, todos los AcM y los fármacos conjugados a HRP a pH 7,2 ofrecieron una señal específica mayor que la obtenida con la conjugación a pH 9,6. Esto es debido, presumiblemente, a que a pH 7,2 la fracción existente de grupos amino desprotonados fue suficiente para que la reacción de aminación reductora entre los anticuerpos y la HRP se llevara a cabo satisfactoriamente. En el caso del inmunoensayo de inmunogenicidad de UTK, el proceso de conjugación de UTK a HRP no varió significativamente en función del pH, lo que indicaría una menor sensibilidad de la estructura de UTK a cambios de pH. En el caso del inmunoensayo de inmunogenicidad de TCZ, si bien es cierto que la reacción a pH 7,2 ofrecía valores de intensidad superiores a los obtenidos a pH 9,6, el pH seleccionado para llevar a cabo la reacción fue 9,6. La menor señal obtenida a este pH, junto con una menor concentración de AcM de detección, permitió un cambio en la curva de calibrado con un último calibrador más elevado; esto evitó la aparición de muestras falsamente positivas (**figuras 4.26 y 4.27**).

Aunque los resultados de la conjugación directa fueron adecuados, este método podría proporcionar conjugados en los que las dos proteínas presenten entrecruzamientos múltiples entre los diferentes grupos funcionales que cada proteína puede presentar y el complejo resultante sería susceptible de sufrir impedimentos estéricos al encontrarse ambas proteínas muy juntas entre sí, lo que podría afectar al comportamiento del conjugado. Para minimizar este hecho se podría realizar la reacción de conjugación introduciendo un agente espaciador de acoplamiento bifuncional, como ocurre en los acoplamientos homobifuncionales y heterobifuncionales en los que la reacción de conjugación entre el anticuerpo y la enzima se lleva a cabo entre dos grupos funcionales iguales y distintos respectivamente.

La estequiometría de la conjugación o **relación molar** entre el anticuerpo y la HRP es otro factor determinante en la optimización del sistema de detección. Un mayor ratio de conjugación (mayor cantidad de HRP sin variación en la cantidad de anticuerpo a marcar) proporciona una

intensidad de señal mayor en la detección del analito específico. En los inmunoensayos de biodisponibilidad la relación molar seleccionada fue 1:6 por ofrecer intensidades de señal específicas similares a la relación molar 1:8 e intensidades de señal inespecífica inferiores (**figura 4.11**). En el caso de los inmunoensayos de inmunogenicidad, la relación molar seleccionada fue 1:8 por ofrecer señales específicas superiores a las obtenidas con la relación 1:6, sin aumentos significativos de las señales inespecíficas (**figura 4.12**). Los inmunoensayos de biodisponibilidad llevan un  $F(ab')_2$  como AcM de detección y los de inmunogenicidad una IgG, esta diferencia en la estructura (110 KDa vs 150 KDa) podría indicarnos la necesidad de un mayor número de moléculas de HRP necesarias para la conjugación de los fármacos, por comparación con los AcM de los ensayos de biodisponibilidad.

La actividad enzimática de la HRP se midió mediante la degradación de un sustrato cromogénico y el registro de la subsiguiente generación de un producto coloreado. Existen diferentes sustratos: TMB, ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azinobis[etilbenzotiazolina-6-sulfonato]) u OPD (o-fenilendiamina). Se seleccionó el sustrato TMB por ser el que proporciona mayores valores de absorbancia con bajas señales de ruido de fondo y por no ser mutagénico. Para parar la reacción se adiciona un ácido fuerte como el ácido sulfúrico para desnaturalizar la enzima y provocar un viraje de color de azul. Para parar la reacción entre el sustrato y la enzima se pueden utilizar otros ácidos, como por ejemplo el ácido clorhídrico, utilizado en los primeros productos Promonitor, pero este ácido fue sustituido por ácido sulfúrico ya que provocaba la corrosión de las conducciones de los analizadores automáticos como por ejemplo del Triturus<sup>®</sup> desarrollado por Grifols. El color obtenido se mide por espectrofotometría usando un lector de placas. La señal obtenida es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Para la medida espectrofotométrica se emplean 2 longitudes de onda. La primera a 450 nm, que corresponde al máximo de absorbancia del producto, y la segunda a 620 nm, como longitud de referencia. Esta longitud de onda de referencia se emplea para minimizar el efecto de áreas con suciedad, opacas o irregulares que pueden provocar lecturas erróneas.

Los inmunoensayos desarrollados en esta Tesis Doctoral son a punto final, es decir, la cuantificación de los analitos se realiza una vez se ha parado la reacción entre la enzima y el sustrato tras la adición del ácido. Puesto que no se monitorizaba toda la reacción enzimática, es muy importante establecer el momento en el que se ha de parar la reacción para poder comparar los resultados obtenidos en los diferentes experimentos. Para establecer este tiempo de parada, se monitorizó la reacción entre la enzima y el sustrato registrando a 620 nm la cantidad de color azul

generado. El tiempo óptimo de reacción es aquel en el que se observa una máxima señal específica sin aumento de la señal inespecífica. En el caso de los inmunoensayos de biodisponibilidad, excepto GLM, se estableció como tiempo óptimo de reacción 30 minutos. En el caso de GLM, observamos que a los 15 minutos se alcanzaba el máximo de señal (**figura 4.13**). Esta diferencia podría ser debida al diferente formato de inmunoensayo, siendo el de GLM el único vía TNF $\alpha$ . En los inmunoensayos de inmunogenicidad por similitud con el resto de los inmunoensayos Promonitor desarrollados para tal fin hasta la fecha se mantuvo dicho tiempo. Los ELISA a punto final se basan en asunciones tales como que al parar la reacción la enzima y el sustrato, ésta finaliza, sin embargo, esto únicamente se consigue si la mezcla con el ácido es completa, o que las propiedades ópticas del cromóforo no varían desde que se para la reacción hasta que se registra la intensidad de señal. Nosotros hemos visto que la lectura debía ser dentro de los 15 minutos siguientes a la parada de la reacción para evitar decaimiento de la señal (resultados no mostrados). Una forma de evitar estos problemas asociados a los ELISA a punto final, sería realizar ELISA cinéticos en los que se añade el sustrato a cada pocillo y se monitoriza constantemente el incremento de densidad óptica a lo largo del tiempo, sin embargo, este tipo de aproximación presenta mayor complejidad a la hora de interpretar los resultados por parte del usuario final. Tanto en los ELISA a punto final como en los ELISA cinéticos es importante que la adición del sustrato se realice con la menor diferencia posible en tiempo desde el primero hasta el último pocillo. La forma de minimizar esta diferencia es empleando lectores con inyección automática o, como en nuestro caso, pipetas multidispensadoras asegurándonos así de que la adición de la solución de parada se realizaba siguiendo la misma pauta que se había seguido en la adición del sustrato y respetando los tiempos entre adición y adición.

Con las condiciones del pretapizado establecidas y el sistema de detección seleccionado y optimizado, a continuación se seleccionaron las **concentraciones de los AcM de captura y de detección** con las que conseguir la máxima sensibilidad en la detección de los analitos. La cantidad de anticuerpo de captura que puede unirse al soporte depende del tamaño de la propia molécula y de la superficie del pocillo. Se probaron distintas concentraciones en el rango de 0,25 - 2,00  $\mu\text{g/ml}$ , teniendo en cuenta que a menores concentraciones la funcionalidad de los anticuerpos disminuiría, por no alcanzar la saturación del pocillo lo que origina un aumento en la variabilidad de los resultados y a concentraciones mayores se podría producir una heterogeneidad conformacional en las proteínas inmovilizadas por efecto de las proteínas vecinas e incluso la agregación de las mismas, lo que limita de la robustez de los inmunoensayos e incrementa el coste al añadir más anticuerpo del

necesario. Analizamos tres concentraciones de los fármacos y de los anticuerpos antifármaco (alta, baja y cero) para seleccionar las concentraciones de los AcM de captura y de detección adecuadas. Se seleccionaron aquellas concentraciones en las que la señal específica fue mayor y la inespecífica menor, con la mínima variabilidad interensayo. Las concentraciones seleccionadas para los distintos tipos de inmunoensayo fueron variables. En los inmunoensayos de biodisponibilidad las concentraciones del anticuerpo de captura establecidas fueron similares (aproximadamente 2 µg/ml) mientras que las de detección fueron más variables aunque siempre inferiores a las de captura para los 3 inmunoensayos (**figura 4.6**). Este hecho revelaba una mayor afinidad de los AcM de detección por el fármaco correspondiente que la de los AcM de captura, lo cual se corresponde con los resultados de los ELISA de control de calidad llevados a cabo por AbD Serotec, a Bio-Rad Company (Alemania) (**figura 4.1**). En los 3 inmunoensayos de inmunogenicidad, se necesitaba una concentración de AcM de captura entre 4 y 8 veces inferior a la empleada en los inmunoensayos de biodisponibilidad para obtener la misma intensidad de señal específica, lo que nos indica una mayor afinidad de los fármacos por sus antígenos que la de los AcM por los suyos. Sin embargo, las concentraciones de los AcM de detección fueron idénticas a las de captura salvo en el caso del inmunoensayo de inmunogenicidad de UTK que fue superior (**figura 4.7**).

Los **tiempos de incubación** en las distintas etapas de las que se componen los inmunoensayos, a excepción del tiempo de incubación tras la adición del TMB, no fueron optimizados. Se estableció 1 h para la incubación tanto de la muestra como del sistema de detección por similitud con otros inmunoensayos desarrollados por Progenika Biopharma, a Grifols Company. Tiempos de incubación más cortos requerirían concentraciones de detección mayores, debido a la obtención de intensidades de señal débiles, lo que supone un aumento de la disponibilidad de materia prima y por lo tanto del coste, y tiempos más largos podrían provocar una menor sensibilidad, sobre todo con anticuerpos de baja afinidad, un incremento del riesgo de aparición de uniones inespecíficas y supondrían una extensión del análisis de las muestras por parte del usuario final.

Un paso crítico en el desarrollo de inmunoensayos es el **lavado entre dos pasos consecutivos**. Estos lavados se realizan con el fin de eliminar los AcM de captura, de detección y antígenos no unidos, sin arrastrar aquellos que sí lo estén. La no eliminación de las moléculas no unidas reduciría la sensibilidad y la precisión del inmunoensayo teniendo más repercusión a concentraciones del analito más bajas. En el caso de los AcM de captura se empleó el régimen de

lavados estándar aplicado en el tapizado de todas las placas Promonitor (3 lavados con 200 µl de PBS-T 0,2%). En el caso de los antígenos de la muestra que no se han unido al AcM de captura y las moléculas de AcM de detección no unidas al antígeno, se analizaron 2 parámetros: el volumen de la disolución de lavado (200 µl y 300 µl, doble del volumen de muestra y de AcM de detección y pocillo lleno respectivamente) y el número de ciclos de lavado. Observamos un aumento de la señal inespecífica por encima de 0,1 ua utilizando un régimen de lavados de 3 ciclos en lugar de 5, sin observarse un aumento de la señal específica. Asimismo, no observamos una variación en la intensidad de señal ni específica ni inespecífica con el volumen de la disolución de lavado, indicándonos que el empleo del doble de volumen de muestra y de AcM de detección es suficiente para eliminar las moléculas no unidas (resultados no mostrados). La combinación que se seleccionó fue la de 5 ciclos con 200 µl de disolución de lavado.

En los ensayos ELISA cuantitativos la concentración del analito en las muestras se determina mediante el empleo de una curva de calibrado construida con varios estándares. Las **curvas de calibrado** empleadas en nuestros inmunoensayos se prepararon empleando como matriz que simulara la de las muestras de pacientes a analizar, un suero humano comercial (NHS) obtenido de una mezcla combinada de plasmas de donantes varones con el grupo sanguíneo AB minimizando así las variaciones naturales entre individuos, y diluido en el tampón #AA-1, en los inmunoensayos de biodisponibilidad (**figura 4.9**), o en el tampón #SA-1, en los de inmunogenicidad (**figura 4.10**). En el caso de los inmunoensayos de biodisponibilidad, el estándar fue el mismo fármaco a cuantificar, tomando como concentración de referencia la indicada por el fabricante. En el caso de los inmunoensayos de inmunogenicidad, se añadieron como estándares sueros positivos para anticuerpos antifármaco generados en conejos. Estas curvas de calibrado deberían haberse construido con anticuerpos antifármaco humanos. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de aparición de anticuerpos antifármaco en las poblaciones estudiadas, a la imposibilidad de disponer de grandes volúmenes de suero humano y al comportamiento variable encontrado por Progenika Biopharma, a Grifols Company, en las curvas de calibrado de otros proyectos preparadas con una mezcla combinada de sueros procedentes de varios/as pacientes con anticuerpos antifármaco, se optó por la producción de AcP en modelos animales. La producción de AcP antifármaco específicos se realizó por la empresa Proteogenix (Francia) mediante inmunización activa en animales. El modelo animal que Proteogenix seleccionó para tal fin fue el conejo por tratarse de la especie más utilizada en este tipo de investigación, en contraposición a la cabra, oveja, caballo y burro utilizados para la obtención

de AcP con fines comerciales, y por presentar un óptimo balance entre el bajo coste de mantenimiento y los grandes volúmenes de suero que se obtienen. Normalmente se suele utilizar más de un ejemplar debido a las diferencias significativas observadas entre ellos a pesar de haber sido inmunizados con el mismo material, sin embargo, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se empleó un único conejo New Zeland, para abaratar los costes, pero del que se obtuvieron unos volúmenes de suero elevados, aproximadamente 70-80 ml para cada uno de los 3 fármacos (GLM, TCZ y UTK). El sitio de inyección es un factor determinante ya que durante la inmunización se pretendía promover una liberación ralentizada del inmunógeno o al menos reducir su aclaramiento del organismo. Esto lo consiguieron con la administración subcutánea en múltiples sitios de inyección cerca de los ganglios linfáticos, para causar menos malestar al animal. Otro factor importante es la frecuencia de administración para asegurar la máxima secreción de anticuerpos con distintos isotipos cada uno de los cuales reconociendo distintos epítomos en los fármacos con afinidades y especificidades variables. Tanto la afinidad como la especificidad son factores dependientes de la pureza del inmunógeno, de forma que este debía ser lo más puro posible para evitar la generación indeseada de anticuerpos contra las impurezas presentes. Se emplearon como inmunógenos los fármacos puros, sin haberlos sometido a un proceso de fragmentación. La inmunización con el inmunógeno se realizó junto con un adyuvante para prolongar la exposición de los fármacos *in vivo*, liberando el fármaco lentamente en el sitio de inyección y así obtener un mayor título de AcP. La administración inicial fue intradérmica seguida de 2 dosis de recuerdo espaciadas de tal manera que la primera fue a las 2 semanas tras la inicial, para disponer de la máxima secreción de anticuerpos IgM y la siguiente a las 5 semanas, para disponer del máximo predominio de anticuerpos IgG de mayor afinidad, antes de que su concentración descendiera gradualmente. A las 5 semanas se analizó el título de anticuerpos por ELISA y con la previsión de poder aumentarlo, Proteogenix administró 2 inyecciones subcutáneas más del fármaco correspondiente a las 5 y 8 semanas. La exanguinación de los conejos se realizó a las 12 semanas. El título de AcP antifármaco obtenido fue de 1:300.000 para los 3 proyectos (anti-GLM, anti-TCZ y anti-UTK) conforme a un ensayo ELISA de control de calidad efectuado. Para confirmar la positividad de dichos sueros, realizamos un inmunoensayo puente sin optimizar empleando como CN el suero de los conejos antes de las inmunizaciones. En los tres casos se obtuvieron resultados positivos (**figura 4.5**). A pesar de que el título reportado por Proteogenix fue igual para los 3 sueros, observamos que para obtener la misma intensidad de señal con cada suero debíamos realizar diferentes diluciones de los mismos. Así, vimos que los conejos inmunizados con GLM presentaban un mayor título de AcP anti-GLM (mayor dilución de suero), seguidos de los que

fueron inmunizados con UTK y el menor título se encontró en los sueros de los conejos inmunizados con TCZ (menor dilución de suero). Estos resultados que, a priori, podrían reflejar el potencial inmunogénico de los fármacos, no se corresponden con la inmunogenicidad esperada derivada de sus estructuras. GLM y UTK al ser AcM totalmente humanos deberían ser menos inmunogénicos que TCZ, el cual es humanizado con las regiones determinantes de complementariedad de origen murino. Estas diferencias también podrían ser debidas a la antigenicidad de los fármacos, es decir, a la afinidad en su unión a los AcP, y al sistema inmunológico de los conejos. Con el fin de confirmar estos resultados y de disponer de la concentración de los AcP presentes, se procedió a la cuantificación en colaboración con el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos). Para la cuantificación, Sanquin emplea un RIA donde los anticuerpos antifármaco son capturados de la muestra por la proteína A o por un anticuerpo anti-Fc humano sobre una matriz de sefarosa y posteriormente detectados por los fármacos en formato F(ab')<sub>2</sub> marcados directamente con el radioisótopo <sup>125</sup>I (Wolbink y cols. 2006) o vía biotina-estreptavidina marcada radiactivamente. Los títulos reportados por Sanquin fueron de 23.040 UA/ml y 455.000 UA/ml para los AcP anti-TCZ y anti-UTK respectivamente. En el caso de los AcP anti-GLM, no se pudo emplear esta aproximación ya que Sanquin emplea un RIA en el que únicamente consiguen detectar anticuerpos anti-GLM humanos. Los anticuerpos anti-GLM, así como el resto de las inmunoglobulinas presentes en la muestra, se unen directamente a un anticuerpo anti-Fc humano inmovilizado sobre sefarosa y la detección se lleva a cabo empleando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> de GLM biotilado junto con estreptavidina marcada radiactivamente. Para la cuantificación de los AcP anti-GLM construimos una curva de calibrado con una muestra de paciente referenciada por Sanquin. Por interpolación en dicha curva obtuvimos un valor de 1.335.668 UA/ml. A la vista de estos resultados, podríamos considerar que GLM es el fármaco con mayor potencial inmunogénico o que los AcP anti-GLM presentan mayor afinidad por GLM que el resto de los AcP antifármaco por sus respectivos fármacos.

En el caso de los inmunoensayos de biodisponibilidad el material de referencia para preparar los calibradores fueron los propios fármacos que se adquirieron de la casa comercial que los produce y/o distribuye a una concentración determinada. Aunque podrían existir diferencias entre los distintos lotes en cuanto a homogeneidad y estabilidad del principio activo, asumimos que dichas diferencias no podían ser relevantes ya que constituyen una terapia efectiva en pacientes de diversas patologías, han de ser inyectados en el organismo, y por lo tanto en todos los casos la pureza y la concentración están controladas y estandarizadas.

En el caso de los inmunoensayos de inmunogenicidad, el material para la construcción de las curvas de calibrado fueron los sueros inmunes de conejo con los AcP antifármaco. Dicho material no necesitó ser purificado ya que para la fabricación de las curvas estos debían diluirse mucho, diluyéndose, por tanto, el resto de componentes potencialmente interferentes. Además, el ELISA puente es altamente específico, como ya se ha comentado. Sin embargo, con el fin de intentar estandarizar las unidades para poder reportar unidades menos arbitrarias (por ejemplo ng/ml), llevamos a cabo la purificación de los sueros y así determinar qué cantidad de AcP puros (ng/ml) se correspondía con la concentración obtenida por Promonitor (UA/ml) (**tabla 4.12**). Idealmente deberíamos haber realizado la purificación de una muestra positiva para anticuerpos antifármaco para disponer como material de referencia de anticuerpos antifármaco humanos purificados, sin embargo, debido a la escasez de muestras positivas y al pequeño volumen de muestra disponible no fue viable y se procedió con los anticuerpos antifármaco de conejo, aún sabiendo que al variar la naturaleza de los anticuerpos antifármaco los resultados podrían ser diferentes.

La purificación se podía haber llevado a cabo por una simple separación física a través de la precipitación con sulfato de amonio (Behrouz *y cols.* 2016) o sodio seguida de diálisis o filtración en gel o técnicas con mayor rendimiento, aunque más laboriosas, como la cromatografía de intercambio iónico en gradiente (Urmann *y cols.* 2010). Sin embargo, se seleccionó el método de purificación por cromatografía de afinidad muy utilizado (Calabozo *y cols.* 2001), basado en la unión reversible entre antígenos y anticuerpos aprovechando la especificidad inmunológica de los AcP por sus fármacos correspondientes y porque además, con los métodos anteriores se hubiera conseguido una purificación parcial, aislando inespecíficamente todas las inmunoglobulinas presentes. El éxito del proceso reside en 3 aspectos importantes: i) la pureza relativa de los fármacos que serán inmovilizados en el soporte sólido (resina de agarosa); ii) la afinidad de los AcP por los fármacos y iii) la facilidad para eluirlos posteriormente del interior de la columna. A pesar de que asumimos un buen grado de pureza de los fármacos, confirmamos su pureza por visualización directa en un gel de poliacrilamida (**figura 4.28**). En estos geles en condiciones desnaturizantes se observaron únicamente las bandas correspondientes a las cadenas pesadas (50 KDa) y ligeras (25 KDa) de los fármacos con gran intensidad y solo en el caso de GLM se observaron 2 bandas adicionales entre 25 y 30 KDa significativamente menos intensas que podrían tratarse de impurezas introducidas durante su fabricación, sin embargo, aceptamos el grado de pureza intrínseco y decidimos no someter el fármaco a tratamientos de purificación para evitar posibles alteraciones estructurales y/o funcionales. La

eficiencia de acoplamiento de los 3 fármacos a la resina fue mayor del 96% indicando una excelente afinidad de los fármacos por la agarosa estableciéndose una unión covalente sólida. La cinética de unión de los AcP a los fármacos puede ralentizarse durante la purificación por inmovilización por la inmovilización de los fármacos a un soporte sólido, de manera que los tiempos para alcanzarse el equilibrio en la unión pueden alargarse. Nosotros hicimos reaccionar los AcP con los fármacos en el interior de la columna durante 1 h, que es el tiempo usual para alcanzar el equilibrio cuando se quiere purificar anticuerpos de gran afinidad. En nuestro caso, al tratar con una población heterógena de anticuerpos antifármaco, asumimos que pudieran coexistir anticuerpos de distintas afinidades específicas encontrando también anticuerpos de baja afinidad los cuales necesitan un mayor tiempo para alcanzar el equilibrio e incluso podrían no unirse a los fármacos a pesar de estar presentes en elevadas concentraciones. Sin embargo, adoptamos el tiempo de incubación estándar para que se produjera la unión. La eficiencia de unión de los AcP a los 3 fármacos inmovilizados fue del 100%, de manera que todos los AcP presentaban altas afinidades por los fármacos con interacciones fuertes y estables que soportaron los pertinentes lavados que se realizaron tras su unión al fármaco para eliminar los posibles AcP no unidos. No obstante, esta fuerte afinidad y unión de enlace de los AcP a los fármacos podría suponer una dificultad para su elución. La elución se llevó a cabo alterando el pH del sistema, de manera que los AcP se eluyeron utilizando glicina a pH 2,8 suponiendo que en estas drásticas condiciones no se desnaturalizaran las proteínas. La tendencia observada en la elución de los AcP anti-TCZ y anti-UTK reveló una mayor recuperación de AcP en el primer eluato y a medida que se recogían las sucesivas fracciones la recuperación disminuía, al contrario de lo observado para los AcP anti-GLM, para los que el eluato más concentrado se obtuvo en la segunda elución, probablemente debido a la mayor afinidad constatada de los AcP anti-GLM por GLM. Los rendimientos de elución de los AcP no fueron superiores al 25% siendo el más bajo el de los anticuerpos anti-GLM, revelando una menor sensibilidad a la ruptura de los enlaces en condiciones ácidas. Estos bajos rendimientos de elución podrían explicarse por: i) la ausencia de optimización del protocolo de elución para nuestros anticuerpos, es decir, es posible que si se hubieran recogido más de los 4 eluatos que se obtuvieron hubiera aumentado el rendimiento a expensas de un mayor riesgo de desnaturalización de los mismos y ii) por la distinta naturaleza de la población de los AcP. Estos AcP presentan afinidades específicas por diferentes epítomos del fármaco, de manera que podría pensarse que para la elución de toda la diversidad presente se deberían utilizar diferentes métodos de elución. Realmente esta suposición nos llevó a realizar una elución básica con trietilamina (TEA) a pH 9,0 con los AcP anti-GLM para comprobar si aumentaba el rendimiento. Con TEA los

rendimientos fueron significativamente inferiores a los obtenidos con glicina (datos no mostrados) así que debido a su alta toxicidad y a la pobre contribución a disponer de una muestra con una población de AcP más representativa del suero inmune, se decidió no continuar con este eluyente para la elución de los AcP anti-TCZ y anti-UTK. Además, se observó que la funcionalidad de los AcP anti-GLM eluidos con TEA analizada en el inmunoensayo Promonitor era inferior a la obtenida utilizando glicina a pesar de presentar, los distintos eluatos, concentraciones de AcP purificados similares, revelando una mayor drasticidad del eluyente al desnaturalizar los AcP de manera importante. Como el objetivo final de la purificación no era conseguir un alto rendimiento de elución sino establecer una relación entre unidades de medida (UA/ml y ng/ml), lo cual fue factible, ni se aumentó el número de eluciones hasta conseguir recoger todos los AcP del interior de la columna ni se aplicaron otros métodos de elución distintos. El grado de pureza de los AcP purificados fue estudiado por SDS-PAGE para comprobar el rendimiento final del proceso de purificación (**figura 4.29**). El patrón electroforético de los distintos eluatos de AcP antifármaco reveló las bandas de mayor intensidad correspondientes a las cadenas pesadas (50 KDa) y ligeras (25 KDa) aunque estas últimas apenas eran visibles con la tinción con azul brillante de Coomassie a excepción de las de los AcP anti-UTK. Las bandas a 25 KDa fueron más resolutivas con la tinción de plata donde se apreció un incremento de la anchura de las mismas. El grado de pureza final de los AcP purificados se aceptó como adecuado ya que las intensidades de las bandas de interés fueron significativamente mayores que el resto. Aún así, con el fin de confirmar la identidad de las bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida, se realizó una transferencia Western tanto por el método clásico como por un método alternativo más sencillo (detección directa) de aplicabilidad factible debido a la disposición de anticuerpos primarios específicos marcados con HRP. Tanto en el método indirecto como en el directo se obtuvieron las mismas bandas correspondientes a las cadenas ligeras y pesadas de los AcP antifármaco (**figura 4.30**).

Las curvas de calibrado en los inmunoensayos de unión a ligandos, como es el caso del ELISA, se caracterizan generalmente por una relación no lineal entre la respuesta y la concentración del analito. La expresión matemática que más se aproxima es una relación sigmoidea con el límite inferior (asíntota) cercana al ruido de fondo y la asíntota superior a la respuesta máxima. En nuestras curvas de calibrado el mejor ajuste se consiguió con un modelo de regresión de 4 parámetros logísticos (4 PL) en lugar de 5 PL debido a la ausencia de una asimetría pronunciada de las curvas (Findlay y cols. 2007).

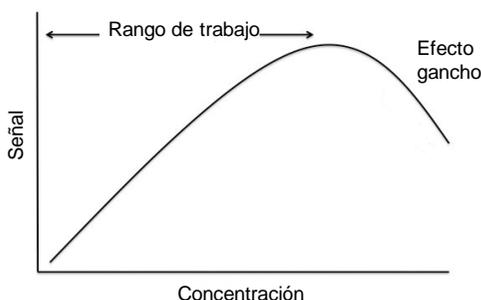
Los inmunoensayos Promonitor llevan **controles de calidad** del ensayo. El CP consiste en el tampón de dilución (#AA-1/#SA-1 + NHS) con una cantidad determinada de fármaco o de anticuerpos antifármaco. Dicha concentración está localizada dentro del rango lineal de la curva de calibrado, en las inmediaciones del punto de inflexión de la curva sigmoidea descrita. Idealmente, la concentración del CP debe cuantificarse por otro método validado pero en nuestro caso no se llevó a cabo por los buenos resultados obtenidos de la correlación de Promonitor con otros métodos. El CN consiste en el mismo tampón de dilución en el que se preparan los calibradores de la curva pero sin fármaco o anticuerpos antifármaco. El CN se emplea como medida del ruido de fondo del inmunoensayo. Ambos controles reflejan el grado de correcta ejecución del análisis.

Debido al limitado rango dinámico inherente a la tecnología ELISA, las muestras deben diluirse antes de emplearlas en el inmunoensayo. Estas **diluciones de muestra** dependen de la curva de calibrado y de las concentraciones del analito a cuantificar. En el inmunoensayo de biodisponibilidad de GLM, las diluciones 1:4 y 1:80 cuantifican un rango de concentraciones comprendidas entre 0,036 - 12,8  $\mu\text{g/ml}$  por lo que las concentraciones encontradas en los/as pacientes de AR (GLM 0,43 - 1,36  $\mu\text{g/ml}$  (Kneepkens y cols. 2014)) y CU (GLM 0,83 - 3,14  $\mu\text{g/ml}$  (Adedokun y cols. 2016)) se cuantificarán correctamente. En el inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ, las diluciones seleccionadas 1:5 y 1:30 cuantifican un rango de concentraciones comprendidas entre 0,638 - 27  $\mu\text{g/ml}$ , rango que cubre las concentraciones encontradas en los/as pacientes de AR (TCZ < 20  $\mu\text{g/ml}$ ; (Sigaux y cols. 2017)). En el inmunoensayo de biodisponibilidad de UTK, las diluciones 1:2 y 1:10 se seleccionaron para cuantificar un rango de concentraciones comprendidas entre 0,131 - 5  $\mu\text{g/ml}$ , el cual engloba los niveles descritos en la bibliografía de 0,2 - 0,4  $\mu\text{g/ml}$  (Chiu y cols. 2015; Menting y cols. 2015a), sin embargo, debido a la presencia de niveles superiores en pacientes con EII (Ficha Técnica de UTK, FDA 2016) se recomienda efectuar una dilución mayor.

En el caso de los inmunoensayos de inmunogenicidad, las diluciones empleadas son 1:2 y 1:10. El objetivo de estos inmunoensayos es detectar la presencia de anticuerpos en los primeros momentos tras su aparición, por ello se emplean las diluciones más bajas posibles.

Con el fin de conseguir esta detección temprana, nos planteamos emplear en el inmunoensayo la muestra sin diluir, sin embargo, se descartó puesto que podía provocar el llamado “efecto gancho” (*hook*). Este fenómeno puede ocurrir debido a la presencia de concentraciones

excesivamente altas del analito en la muestra, las cuales saturan simultáneamente los anticuerpos de captura y de detección provocando, por tanto, un descenso en la intensidad de la señal de detección reportando resultados falsamente bajos (**figura 5.1**). Este efecto se minimiza e incluso anula con el uso de diluciones de muestra (Vaidya y cols. 1988).



**Figura 5.1. Efecto gancho (hook) de dosis altas.** Se representa una curva dosis-respuesta en la que se observa el efecto gancho a altas concentraciones del analito por saturación del sistema de anticuerpos de captura y de detección.

El tipo de muestra utilizado para la determinación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco fue suero, frecuentemente preferible para su empleo en inmunoensayos, en lugar de plasma o sangre total. La utilización de plasma requiere la elección de un correcto anticoagulante ya que algunos de ellos pueden inhibir la actividad de la enzima generadora de la señal del inmunoensayo así como las reacciones entre los anticuerpos y sus antígenos. La sangre total raramente es empleada en inmunoensayos debido a los efectos interferentes de los anticoagulantes y a los efectos de la matriz sobre las reacciones inmunológicas, sin embargo, recientemente se están usando para la monitorización de fármacos biológicos en pruebas de laboratorio en la cabecera del/a paciente (*point-of-care*) en los que se aplica sangre capilar tras su recolección por punción en la piel.

A pesar del uso de muestras de suero para realizar las determinaciones, observamos que existía correlación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármacos en dicho tipo de muestra con aquellos obtenidos en muestras de plasma (resultados no mostrados), sin embargo, nuestros inmunoensayos no están validados para el empleo de plasma.

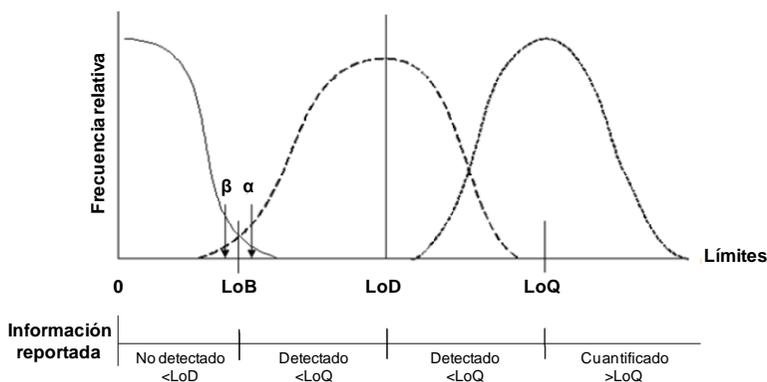
## 5.2. Escalado industrial y validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos ELISA

Tras optimizar los inmunoensayos, y previamente a la transferencia al Departamento de Producción, se procedió en el Departamento de I+D a realizar **escalados a tamaño industrial** para comprobar las prestaciones de los inmunoensayos y poner así en marcha la operatividad de los inmunoensayos a escala comercial. El paso de escala de laboratorio a escala industrial implica el manejo de grandes volúmenes de material así como de instrumental de distinto tamaño y naturaleza y equipamiento con especificaciones diferentes. El único problema con el que nos encontramos fue durante el escalado del inmunoensayo de biodisponibilidad de TCZ (**figura 4.16**), pero por causas ajenas al proceso en sí. Se detectó una contaminación microbiana en la disolución de TCZ, probablemente debido a una manipulación inadecuada por no trabajar en condiciones estériles controladas, que provocó la degradación del fármaco (**figuras 4.20 y 4.21**). Puesto que este hecho se podría extrapolar al Departamento de Producción, se intentó evitar añadiendo azida sódica a una concentración final de 0,05% a todos los fármacos y se implementó un sistema para el correcto alcuotado y almacenamiento de los mismos. La azida a dicha concentración es un agente conservante y biocida (Russo y cols. 2008) y no afecta a los inmunoensayos (resultados no mostrados). La única precaución que hay que tener en cuenta es dializar el fármaco antes de proceder a su marcaje con HRP. Una vez solventado este inconveniente, no se encontraron diferencias en las curvas de calibrado ni en los valores de CP ni CN al escalar los reactivos de los inmunoensayos: placas, curvas de calibrado, controles de calidad y sistema de detección; indicando, por tanto, que los inmunoensayos podrían ser transferidos al Departamento de Producción (**figura 4.23**). Los reactivos tampón de lavado, tampón de dilución, sustrato de la HRP y solución de parada no se escalaron ya que son comunes a todos los productos Promonitor y ya están ampliamente validados. Durante la fase de I+D no siempre es posible emplear diferentes lotes de materias primas por lo que, durante la fase de transferencia y previo a la fabricación de lotes comercializables, se fabricaron 3 lotes de cada reactivo a diferentes escalas empleando, en la medida de lo posible, diferentes lotes de materias primas así como efectuando el proceso diferentes operarios/as para analizar la variabilidad que pudieran introducir en los productos.

Los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad han de ser evaluados para asegurar que reúnen las prestaciones técnicas requeridas para obtener resultados válidos y reproducibles y cumplir objetivo para el que fueron diseñados, desarrollados y optimizados. La

validación de las prestaciones técnicas de los inmunoensayos se realizó en base a las guías del *Clinical & Laboratory Standards Institute*. Los parámetros analizados fueron: ruido de fondo, límite de cuantificación, precisión, linealidad y efectos interferentes.

La capacidad de detección de un analito es una característica importante en un procedimiento de medida. Existen diferentes aproximaciones que implican un aumento de nivel cuantitativo desde el límite superior en mediciones de muestras blanco sin analito (LoB, límite de blanco), a través de una medición dicotómica de presencia/ausencia de analito (LoD, límite de detección), hasta la mínima cantidad de analito que puede ser medida de manera fiable con respecto a unos objetivos prefijados de precisión y exactitud (LoQ, límite de cuantificación). El LoB es menor que el LoD y éste menor o igual que el LoQ (**figura 5.2**).



**Figura 5.2. Representación gráfica del posicionamiento de los formatos relacionados con los límites de capacidad de detección para reportar una magnitud.** Distribución de los resultados mostrados para una muestra blanco, una muestra con niveles bajos del analito cercanos al LoD y una muestra con niveles bajos del analito cercanos al LoQ. Los símbolos  $\alpha$  y  $\beta$  hacen referencia a la posibilidad de falsos positivos y falsos negativos respectivamente.

Los parámetros más comúnmente asociados a procedimientos de análisis son el LoD, que hace referencia a la sensibilidad analítica, y el LoQ, que hace referencia a la sensibilidad funcional. Nuestros inmunoensayos vienen definidos por el **LoQ** por ser más utilizado en métodos de análisis en el ámbito clínico, donde es importante determinar una magnitud con precisión y exactitud adecuadas. Sin embargo, también determinamos el LoB, como la concentración igual a 2 desviaciones estándar sobre una muestra sin analito; en nuestro caso hemos seleccionado el CN por simular la matriz de los calibradores de la curva y el NHS por simular la matriz sérica de las muestras aplicadas al

inmunoensayo. Esta concentración proporciona información sobre la capacidad para reportar una muestra como positiva cuando realmente lo es. Para todos los inmunoensayos desarrollados la concentración correspondiente al LoB obtenida tanto con el tampón de dilución como con la matriz NHS se encontraba por debajo del LoQ, por lo que se consideran muestras negativas y, por lo tanto, no influyen en la intensidad de señal de detección de los analitos, ofreciendo unos ruidos de fondo permitidos (**figura 4.31**).

Los valores de una medida menores que el LoQ pero mayores que el LoB, es decir, lo que correspondería al LoD, hacen referencia a que el analito se encuentra presente en la muestra pero los niveles detectados no deberían usarse para interpretaciones clínicas, como ocurre por ejemplo con el kit Lisa Tracker<sup>®</sup> de Theradiag para la determinación de los niveles de TCZ, cuya sensibilidad viene definida por el LoD. Resultados por encima del LoD y por debajo del LoQ podrían ser reportados pero asociados a una elevada incertidumbre en el resultado. En los inmunoensayos para la determinación de los niveles de fármaco el LoQ más bajo fue conseguido para GLM (0,036 µg/ml) seguido de UTK (0,131 µg/ml) y el más alto fue para TCZ (0,638 µg/ml), para el que las concentraciones clínicamente relevante en pacientes de AR se encuentran en rangos mucho mayores que para el resto de fármacos analizados (Ficha Técnica de TCZ, EMA 2009). En los inmunoensayos para la determinación de los niveles de anticuerpos antifármaco el LoQ más bajo fue para anti-UTK (3,0 UA/ml), seguido de anti-TCZ (28 UA/ml) y de anti-GLM (58 UA/ml). Con los valores de LoQ establecidos, los inmunoensayos de biodisponibilidad son capaces de detectar y cuantificar concentraciones de fármaco inferiores a aquellas con mayor relevancia clínica y los de inmunogenicidad son capaces de detectar y cuantificar aquellas concentraciones presentes en los estadios iniciales del desarrollo de respuestas inmunogénicas.

Durante el análisis de **precisión** se determinaron 2 parámetros: i) la repetibilidad (precisión intraensayo) y ii) la precisión total (precisión intradispositivo). La repetibilidad se determinó calculando la desviación estándar de repetibilidad ( $DE_r$ ) directamente con los resultados obtenidos en el análisis de 4 réplicas de cada una de las 2 muestras seleccionadas en un único ensayo manteniendo constantes todas las condiciones experimentales. Este tipo de precisión refleja la línea basal del ruido del ensayo, es decir, la imprecisión más baja que es capaz de alcanzarse en la práctica rutinaria a una concentración de analito dada. Estas variaciones contributivas son debidas al azar, como en la aspiración de los volúmenes de reactivos y muestras, y específicas del ensayo. La repetibilidad

analizada en los inmunoensayos desarrollados deriva del promedio de los resultados independientes obtenidos en 6 días.

La precisión intradispositivo es denominada por el CLSI como precisión total, sin embargo, en el marco de la Organización Internacional de Estandarización (ISO, *International Organization of Standardization*) se denomina precisión intermedia ya que algunas condiciones se mantienen constantes como el laboratorio, el instrumento de medida y el operador. Si estas condiciones del ensayo variaran, la precisión resultante se denominaría reproducibilidad. La precisión total se determinó calculando la desviación estándar total ( $DE_T$ ) integrando la  $DE_r$  y las variabilidades interdía (6 días) e interensayo (2 ensayos al día). Asimismo, se tuvo en consideración la variabilidad interlote al incluir 2 lotes de reactivos distintos.

Los protocolos de verificación de la precisión de los inmunoensayos desarrollados fueron diseñados para la realización en un laboratorio, usando un operador, a lo largo de 6 días, realizando 2 ensayos cada día, usando 2 lotes de reactivos y con 2 muestras replicadas 4 veces. La imprecisión de repetibilidad ( $CV_r$ ) y total ( $CV_T$ ) para ambas muestras analizadas y para todos los inmunoensayos de biodisponibilidad e inmunogenicidad fue inferior al 20% demostrando una precisión adecuada entre ensayos, días y lotes de reactivos (**tabla 4.16**). En todos los casos los valores de  $CV_r$  de las 2 muestras analizadas para cada analito fueron menores que los de  $CV_T$  ya que existen menos fuentes de variabilidad.

Un método analítico cuantitativo es lineal cuando existe una relación definida por una línea recta y verificada matemáticamente entre las concentraciones observadas u obtenidas a través de la aplicación del método y los valores reales del analito. La propiedad de la **linealidad** es de gran importancia en los métodos analíticos y clínicos. El método estadístico seleccionado para establecer y verificar la linealidad de los inmunoensayos desarrollados fue el polinómico como sucesor del método de “falta de ajuste” o LoF (*Lack-of-Fit*). Ambos se basan en la inclusión de 2 modelos estadísticos alternativos (lineal y no lineal) y en la determinación relativa a cuál de los 2 es más probable que sea el verdadero modelo. Sin embargo, el polinómico se aproxima a un modelo paramétrico específico para la alternativa no lineal para la que es capaz de identificar sus condiciones características e incluye el parámetro de precisión intraensayo (repetibilidad) de una manera positiva

para el método. Una mejor precisión conlleva mejores decisiones mientras que una precisión pobre no es factible para poder establecer el rango lineal de manera efectiva.

Para establecer el rango de linealidad se dispuso de 10 concentraciones diferentes del analito conseguidas por dilución desde la más concentrada, cubriendo todas las concentraciones susceptibles de encontrarse en la práctica clínica habitual. Estas concentraciones incluían una concentración ligeramente superior al límite superior de cuantificación y otra ligeramente inferior al límite inferior de cuantificación, definidos ambos por la curva de calibrado y las diluciones de muestra seleccionadas, un CN, las concentraciones propias de los límites superior e inferior de cuantificación y 5 concentraciones equidistantes, en la medida de lo posible, entre los límites superior e inferior de cuantificación. El hecho de disponer de las concentraciones fuera del rango de cuantificación de la curva significa que si la linealidad se alcanza incluyendo dichas concentraciones, la totalidad del rango cuantificable será lineal. Las muestras ideales corresponderían a una mezcla de sueros de pacientes con una concentración del analito ligeramente superior al límite superior de cuantificación que se diluiría con una mezcla de sueros de pacientes con concentraciones del analito ligeramente inferior al límite inferior de cuantificación, de esta manera mezclando ambas muestras en las proporciones adecuadas, se conseguiría disponer del rango de concentraciones deseado. Debido a la dificultad de encontrar muestras de pacientes con las concentraciones deseadas, especialmente para el caso de muestras positivas para anticuerpos antifármaco, optamos por utilizar muestras preparadas de forma artificial en una matriz de suero comercial (NHS), al que se añadió fármaco o anticuerpos antifármaco, puesto que la guía CLSI-EPO-6A contempla como válidas este tipo de muestras.

En los inmunoensayos de biodisponibilidad (**figura 4.32.A, tabla 4.17**), el rango lineal mejor descrito por estar construido con un número mayor de concentraciones y más amplio por no haber eliminado ninguna concentración del rango cuantificable, fue el del inmunoensayo de UTK, cuyo rango lineal englobaba la concentración correspondiente al LoQ y aquellas clínicamente relevantes. En el caso del inmunoensayo de GLM, el rango seleccionado para determinar la linealidad no fue del todo acertado ya que el LoQ no estaba incluido y se ha perdido la posibilidad de establecer la linealidad hasta el límite superior de cuantificación. Sin embargo, las concentraciones de fármaco con mayor relevancia clínica sí se encuentran en el rango lineal descrito y, además, determinadas con una precisión adecuada. En el caso del inmunoensayo de TCZ, se observó una recuperación decreciente a concentraciones más altas, donde el grado de no linealidad superaba el valor permitido,

por lo tanto, se perdió amplitud en el rango lineal al disminuir el valor superior de concentración por debajo incluso del P75, sin embargo, dicha concentración fue cuantificada con una precisión adecuada durante el estudio de precisión anteriormente comentado.

Respecto a los inmunoensayos de inmunogenicidad (**figura 4.32.B, tabla 4.17**), únicamente en el de GLM se consiguió establecer un rango lineal correspondiente a la totalidad del rango de cuantificación, sin embargo, en los de TCZ y UTK la zona de la curva de concentraciones más altas se desviaba de la linealidad, por lo tanto, se perdió amplitud en el rango lineal al disminuir el valor superior de concentración. A pesar de ello, las concentraciones presentes en los estadios iniciales del desarrollo de respuestas inmunogénicas a los 3 fármacos se encontrarían en el rango lineal descrito donde también se encuentran, a parte de la concentración correspondiente al LoQ, las concentraciones que hemos considerado representativas de respuestas inmunogénicas de carácter alto y moderado determinadas con una precisión adecuada.

Las **sustancias interferentes** son una importante fuente de error en la medición de magnitudes clínicas (Kroll y cols. 1994). Es crucial que estas interferencias se evalúen para evitar una interpretación errónea de los resultados al confundir los efectos interferentes con cambios en la condición del paciente causando en muchos casos un peligro para la salud del mismo. Por lo tanto, los inmunoensayos desarrollados fueron evaluados para determinar la susceptibilidad a sustancias potencialmente interferentes tanto de origen endógeno como exógeno. Durante la fase de generación de los AcM antifármaco específicos, en el diseño de los inmunoensayos, se observó la ausencia de reactividades cruzadas frente a otros fármacos relacionados estructuralmente con el fármaco a medir y otras moléculas como BSA, GST y h-IgG1Kap-ctrl, entre otras. La generación de los AcM para los inmunoensayos de biodisponibilidad a través de la tecnología de expresión en fagos confirió especificidad por el fármaco en cuestión, evitando así potenciales reactividades cruzadas (**figura 4.1**). Sin embargo, aunque el grado de reactividades cruzadas refleje la especificidad del inmunoensayo no es una medida útil de su susceptibilidad a interferencias.

Previamente al inicio del estudio, se ha de decidir qué magnitud del efecto constituye una interferencia con el uso clínico de los resultados de la medida ya que un diseño experimental apropiado para un estudio de efectos interferentes depende del grado de discrepancia que se considera clínicamente significativo. Los límites permitidos de un efecto interferente pueden establecerse

teniendo en cuenta los criterios de precisión así como la variabilidad fisiológica del analito, la experiencia clínica y la variabilidad de la propia metodología. Sin embargo, en nuestro caso se estableció un margen de error del 20% como valor general permitido en inmunoensayos ELISA (*Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001*).

El número de réplicas requerido por muestra para un nivel de confianza y poder estadístico deseados (95%) acorde con los requerimientos mínimos aceptables recomendados en la guía CLSI EP7-A2 varió entre 3-5 pero para dotar de homogeneidad al diseño de los experimentos se realizaron 5 réplicas por muestra (**tabla 4.18**). El estudio se llevó a cabo con 2 muestras con concentraciones clínicamente relevantes en el caso del análisis de los efectos interferentes en la detección de los fármacos y 2 muestras de concentraciones representativas de las zonas baja y alta del rango de cuantificación de los anticuerpos antifármaco. Las sustancias potencialmente interferentes que se analizaron fueron aquellas de origen endógeno relacionadas con estados patológicos o con muestras mal procesadas representativas de estados de hemólisis, ictericia y lipemia, analizando hemoglobina, bilirrubina y triglicéridos, respectivamente, y el FR como representativo de anticuerpos heterófilos. Entre las sustancias potencialmente interferentes de origen exógeno se analizaron fármacos y anticuerpos antifármaco relacionados estructuralmente con el fármaco y los anticuerpos antifármaco a detectar. A pesar de que la guía recomienda emplear 2 concentraciones de sustancia interferente solamente se utilizó una, aproximación igualmente válida. Las concentraciones de las sustancias potencialmente interferentes de origen endógeno fueron aquellas encontradas más comúnmente en estados patológicos. En relación con la guía CLSI EP7-A2, los fármacos estructuralmente relacionados con el fármaco a detectar y cuantificar deberían prepararse como sustancias interferentes a una concentración 3 veces superior a la concentración más alta reportada tras una dosis terapéutica (pico de concentración agudo o concentración máxima) o a la máxima concentración esperable si se conoce. Sin embargo, no se aplicaron estas recomendaciones porque a los/as pacientes no se les administra diferentes fármacos biológicos simultáneamente y la posología y farmacocinética de los fármacos son significativamente diferentes. Como aproximación más razonable y conservadora se analizaron concentraciones 3 veces superiores al promedio de las concentraciones valle en estado estacionario ( $C_{\min}$ -SS) de medicaciones biológicas previas. En el caso de los anticuerpos antifármaco como interferentes en los inmunoensayos de inmunogenicidad al desconocerse las concentraciones potencialmente presentes, fueron analizados a una concentración arbitraria lo suficientemente elevada como para detectarse la interferencia en el caso de que se produjera (10.000 UA/ml).

En los inmunoensayos de determinación de los niveles de fármaco, ninguna de las sustancias potencialmente interferentes afectó al comportamiento de las muestras negativas, es decir, no se obtuvieron falsos positivos. Asimismo, ninguna de las sustancias presentes en la sangre (Hb, Tg y Bb) interfirió en los inmunoensayos. No se observó interferencia con ninguna medicación biológica previa excepto con el fármaco IFX en el inmunoensayo de GLM, concretamente con la muestra de concentración baja, para la que se esperaba reportar una concentración de 0,16  $\mu\text{g/ml}$  y fue reportada como negativa (**figura 4.33**). Esta interferencia en cierto modo es esperable y explicable por el hecho de que la placa ELISA pretapizada para el inmunoensayo de GLM utiliza como anticuerpo de captura el inmunocomplejo formado por un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  unido a TNF $\alpha$ , siendo la misma diana que para IFX por lo que ambos fármacos compiten por unirse al mismo epítipo del TNF $\alpha$ . Por otra parte, la vida media de IFX es de 9 días y un paciente en tratamiento con IFX no iniciará tratamiento con GLM antes de 8 semanas después del último ciclo de IFX y, dado que GLM se administra cada mes, es altamente improbable que el remanente de IFX en la circulación sanguínea en el momento valle de GLM (12 semanas tras la infusión de IFX) pudiera interferir en la medida de GLM. La muestra de concentración alta de GLM no se vio afectada por la presencia de IFX debido a que hay más concentración de GLM que puede unirse al TNF $\alpha$ . Además, cualquier potencial interferencia de IFX podría solamente ocurrir durante el primer ciclo de tratamiento de GLM, ya que durante los siguientes ciclos de GLM no se encontraría IFX en sangre.

En los inmunoensayos de determinación de los niveles de anticuerpos antifármaco, ninguna de las sustancias potencialmente interferentes afectó al comportamiento de las muestras negativas, es decir, no se obtuvieron falsos positivos. Asimismo, ninguna de las sustancias presentes en la sangre (Hb, Tg, Bb, FR) interfirió en los inmunoensayos, excepto FR. La recuperación de los anticuerpos anti-GLM en la muestra de menor concentración fue del 70%, mientras que las 2 muestras positivas para anticuerpos anti-UTK en presencia de FR fueron reportadas como negativas, anulando completamente la capacidad del inmunoensayo para detectar anticuerpos anti-UTK (**figura 4.33**). En el caso del inmunoensayo de anticuerpos anti-TCZ el FR afectó menos a la recuperación obteniéndose recuperaciones cercanas al límite inferior aceptable. El mecanismo por el que el FR podría enmascarar la detección de los anticuerpos antifármaco sería consecuencia de su alta reactividad conferida por su polivalencia, al tratarse de una IgM, y por el bajo grado de restricciones estéricas que presenta. El FR se uniría a la fracción Fc de los anticuerpos de manera que quedan en cierto modo secuestrados imposibilitando su detección parcial, como en el caso de los anticuerpos

anti-GLM y anti-TCZ, o total, como en el caso de los anticuerpos anti-UTK, sobre los que el FR podría tener más afinidad (Tatarewicz y cols. 2010). En realidad UTK es un fármaco administrado en pacientes con PsO en los que no está presente el FR a diferencia de lo que sucede en la AR, así que este hallazgo no tendría relevancia clínica. Hay pacientes con PsO con un componente reumático (APs) en los que sí puede estar presente el FR, pero en estos casos el tratamiento de elección no sería UTK sino ETN. Este tipo de interferencias podrían evitarse añadiendo a la muestra gammaglobulina como neutralizante de la acción del FR, inactivándolo y por lo tanto, impidiendo su unión a los anticuerpos antifármaco a detectar y cuantificar, como se hemos observado en la eliminación parcial de resultados falsos positivos durante la cuantificación de anticuerpos anti-TCZ. En el caso de que la presencia de FR conllevara la aparición de falsos positivos como consecuencia de su unión a los anticuerpos de captura y/o detección del inmunoensayo, podrían usarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Kato y cols. 1979) o anticuerpos de gallina a los que no se une el FR (Larsson y cols. 1991), sin embargo, no hemos analizado ninguna de estas opciones.

Se identificaron por lo tanto 2 sustancias interferentes, IFX y FR, sin embargo, no se continuó con el estudio y no se determinó la relación entre las concentraciones de IFX y de FR con el grado de interferencia. Las limitaciones de este estudio estaban relacionadas con las distintas propiedades que puedan tener las sustancias comerciales utilizadas con respecto a las circulantes *in vivo* y al posible enmascaramiento de la interferencia a las concentraciones analizadas de sustancia interferente y analito.

### **5.3. Correlación de los inmunoensayos ELISA con otras metodologías**

La monitorización de los niveles valle de fármaco y de anticuerpos antifármaco se está convirtiendo en una importante herramienta complementaria a la evaluación clínica de los/as pacientes y de gran utilidad para ajustar la posología de los tratamientos. Existen diferentes estudios que asocian la pérdida secundaria de respuesta a la producción de anticuerpos antifármaco neutralizantes y a la presencia niveles bajos de fármaco (Garces y cols. 2013; Plasencia y cols. 2012). Gracias al empleo de estas herramientas se están estableciendo rangos terapéuticos óptimos para varias enfermedades (Chen y cols. 2015a; Rosas y cols. 2014a) y ya hay publicados varios algoritmos terapéuticos como guía para el manejo de los/as pacientes (Rosas y cols. 2014a; Steenholdt y cols.

2014a). También se ha demostrado que en la práctica clínica habitual la determinación de los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco es coste-efectiva debido a la personalización de estos tratamientos biológicos (Krieckaert y cols. 2015; Steenholdt y cols. 2014b). Sin embargo, la principal limitación de su implantación en la rutina médica radica en el hecho de que la magnitud de los resultados varía entre los diferentes ensayos y tecnologías existentes, no encontrándose un estándar que permita comparar los resultados. En este estudio se evaluó la correlación y el grado de acuerdo entre los inmunoensayos desarrollados con otros métodos disponibles: i) los métodos empleados por el Servicio de Análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos), acreditado para dicho fin por el Gobierno Alemán y ii) los kits comerciales Lisa Tracker<sup>®</sup>. Todos los ensayos se basan en la tecnología ELISA a excepción de los ensayos de determinación de los anticuerpos antifármaco empleado por Sanquin que se basan en la tecnología RIA.

Para la comparación de los métodos de GLM y anti-GLM en EsPA se utilizó un número adecuado de muestras superando el centenar (102 muestras) procedentes de 48 pacientes con subtipos patológicos heterogéneos disponiendo por tanto de una población representativa de la enfermedad. Estos/as pacientes eran tratados con 50 mg de GLM cada 4 semanas administrado por vía subcutánea (Martin y cols. 2015).

Los dos métodos comparados, Sanquin y Promonitor, para la determinación de los niveles de GLM, mostraron una correlación de Spearman positiva con una tendencia a incrementar simultáneamente no observándose diferencias entre ambos métodos (**figura 4.34**). Asimismo, se obtuvo un grado de acuerdo casi perfecto por análisis de Bland-Altman, al observar que la regresión lineal de los puntos de concentración no difirió significativamente del cero, indicando la ausencia de cualquier error sistemático en la medida por parte de ambos métodos en el rango de medida (**figura 4.36**). El grado de acuerdo positivo no fue del 100% puesto que una muestra fue reportada como positiva por Sanquin, con una concentración de 10 ng/ml, pero negativa por Promonitor (**tabla 4.20**). Esta discrepancia fue debida, con alta probabilidad, a la diferente sensibilidad de ambos métodos, 5 ng/ml para Sanquin y 36 ng/ml para Promonitor. El rango de medida de ambos ensayos fue lo suficientemente amplio como para la cuantificación de cualquier concentración clínicamente relevante.

En el caso de los niveles de anticuerpos anti-GLM se obtuvo un 100% de acuerdo tanto positivo como negativo entre ambos métodos encontrándose 3 muestras positivas para anticuerpos anti-GLM (3 pacientes, 6%) independientemente del método utilizado (**tabla 4.21**). La sensibilidad y la especificidad del ELISA de Promonitor fueron igual a la del RIA de Sanquin en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-GLM en la cohorte de pacientes del estudio. La incidencia de anticuerpos anti-GLM fue más baja que la descrita con anterioridad (Kneepkens y cols. 2014).

Para la comparación de los 3 métodos de biodisponibilidad e inmunogenicidad de TCZ, la disponibilidad de muestras fue más reducida (38 muestras) procedentes de 26 pacientes con AR (88%), AIJ (4%), ACJ (4%) y enfermedad de Still (4%).

Los 3 métodos utilizados para la determinación de los niveles de TCZ, Sanquin, Lisa Tracker<sup>®</sup> y Promonitor, mostraron una correlación de Spearman positiva con una tendencia a incrementar simultáneamente no observándose diferencias entre ellos (**figura 4.34**). El grado de acuerdo por análisis de Bland-Altman fue casi perfecto tanto entre Promonitor y Sanquin como entre Promonitor y Lisa Tracker<sup>®</sup>, al observarse que la regresión lineal de los puntos de concentración no difería significativamente del cero, indicando la ausencia de cualquier error sistemático en la medida por parte de los 3 métodos en el rango de medida (**figura 4.36**). Únicamente se detectó una discrepancia en una muestra la cual fue reportada como positiva para TCZ por Promonitor mientras que Sanquin y Lisa Tracker<sup>®</sup> la reportaron como negativa (**tabla 4.20**). En este caso, al contrario que para GLM, esta diferencia no puede justificarse en base a las sensibilidades de los métodos puesto que la muestra presentaba una concentración de TCZ de 3,81 µg/ml según Promonitor, muy por encima de los límites de detección o de cuantificación de los 3 métodos (LoD de Lisa-Tracker<sup>®</sup> 1,0 µg/ml; LoQ de Sanquin 0,2 µg/ml; LoQ de Promonitor 0,638 µg/ml). La menor sensibilidad de Lisa Tracker<sup>®</sup> podría deberse a que no utiliza un anticuerpo monoclonal antifármaco específico, sino que el TCZ de la muestra se une al IL-6R inmovilizado directamente en la placa ELISA, con los problemas de afinidad que conlleva la adsorción directa de proteínas globulares sobre una superficie plástica. Por el contrario, suponemos que la mayor sensibilidad de Sanquin podría deberse al empleo de anticuerpos de captura y/o de detección con mayor afinidad por TCZ y al empleo de un sistema de detección biotinilado aunque su contribución podría ser menor ya que Lisa Tracker<sup>®</sup> emplea el mismo formato de detección. A pesar de todo, el grado de acuerdo positivo fue del 96% y el negativo del

93%. El rango de medida de todos los ensayos fue lo suficientemente amplio como para la cuantificación de cualquier concentración clínicamente relevante.

En el caso de los anticuerpos anti-TCZ, ninguno de los métodos detectó la presencia de estos en la cohorte de pacientes estudiada (**tabla 4.21**), indicando una baja inmunogenicidad de TCZ, datos que se corresponden con estudios que indican que la incidencia de anticuerpos anti-TCZ es nula (Sigaux y cols. 2017) o inferior al 1% tras 6 meses de tratamiento. Sin embargo existen estudios en los que sí se ha detectado la presencia de anticuerpos anti-TCZ con una incidencia inferior al 1% tras 6 meses de tratamiento (Benucci y cols. 2016). La especificidad del ELISA de Promonitor fue igual a la del ELISA de Lisa Tracker<sup>®</sup> y a la del RIA de Sanquin en la determinación de los niveles de anticuerpos anti-TCZ en la cohorte de pacientes del estudio.

Para la comparación de los métodos de biodisponibilidad e inmunogenicidad de UTK se utilizó un número adecuado de muestras superando el centenar y mayor al resto de los estudios realizados (190 muestras) procedentes de 37 pacientes con PsO. Estos/as pacientes eran tratados/as con 45 mg de UTK cada 12 semanas administrado por vía subcutánea. En el caso de tratarse de pacientes de inicio de tratamiento en el momento de su inclusión en el estudio, se les administraba una dosis de inducción a las 4 semanas de la primera administración.

Ambos métodos para la determinación de los niveles de UTK, Sanquin y Promonitor, mostraron una correlación de Spearman positiva con una tendencia a incrementar simultáneamente no observándose diferencias entre ambos métodos (**figura 4.34**). Sin embargo, el grado de acuerdo, analizado por Bland-Altman, entre los métodos no fue el esperado. La regresión lineal de los puntos de concentración difirió significativamente del cero, indicando la presencia de un error sistemático por parte de Promonitor en el rango de medida (**figura 4.36**). Este error sistemático se manifestó como una sobreestimación de la medida por parte de Promonitor, sin embargo, se puede aceptar esta desviación en la medida porque, aunque Sanquin posee una experiencia constatada en el análisis de biológicos, no es el estándar de referencia. Durante la comparación, observamos discrepancias adicionales en los resultados reportados por ambos métodos. Una de las muestras positivas reportadas por Promonitor (1,0 µg/ml) fue reportada como negativa por Sanquin y 31 muestras reportadas como negativas por Promonitor, fueron reportadas como positivas por Sanquin (**tabla 4.20**). En el caso de la muestra positiva para Promonitor y negativa para Sanquin comprobamos que esta muestra

corresponde a una segunda visita de un/a paciente en terapia de mantenimiento con PASI bajo, cuyas subsiguientes muestras, hasta completar el año de seguimiento, presentaron niveles elevados de UTK, respondiendo a la terapia satisfactoriamente, si bien es cierto que, al inicio del estudio, en la primera visita tampoco presentaba niveles detectables de UTK aunque igualmente presenta un PASI bajo (igual al de la segunda visita). No es posible determinar a qué se debe la discrepancia en la medida. Por otro lado, en lo referente a las 31 muestras reportadas como negativas por Promonitor cuando Sanquin las reportó como positivas, podemos explicarlo por los diferentes límites de cuantificación, 0,131  $\mu\text{g/ml}$  y 0,02  $\mu\text{g/ml}$  para Promonitor y Sanquin respectivamente, ya que todas estas muestras presentaban concentraciones por debajo de 0,131  $\mu\text{g/ml}$ . Debido a estas discrepancias el grado de acuerdo positivo fue del 81% y el negativo del 96% obteniendo una kappa de Cohen de 0,5 inferior al límite aceptable (0,8 – 1,0). Para disminuir las discrepancias e incluso eliminarlas deberíamos aumentar la sensibilidad del ensayo Promonitor. Entre las diferentes opciones disponibles se encuentra la posibilidad de someter a los AcM de captura y/o de detección a un procedimiento de maduración de la afinidad en el que se vuelve a efectuar una recombinación genética, pero en este caso solo de las regiones CDR de las regiones variables de las cadenas ligeras (LCDR3) o pesadas (HCDR2) para aumentar la diversidad de anticuerpos. Posteriormente, éstos se enfrentarían a UTK en varios ciclos con condiciones cada vez más restrictivas para seleccionar finalmente el anticuerpo de mayor afinidad.

En relación a los resultados de la determinación de los niveles de anticuerpos anti-UTK, Promonitor reportó 4 muestras como positivas mientras que Sanquin reportó como positivas 7, es decir, obtuvimos una discrepancia en 3 muestras, lo que hizo que el grado de acuerdo positivo fuese del 57% y el negativo del 100%, obteniendo en este caso también una kappa de Cohen inferior al valor permitido (kappa de Cohen = 0,5) (**tabla 4.21**). Estos datos indicarían que la especificidad de ambos ensayos fuese similar y la sensibilidad del RIA superior que la del ELISA. Sin embargo, todo apunta a que Sanquin estaría reportando falsos positivos para anticuerpos anti-UTK porque 2 de las 3 muestras discrepantes corresponden a la primera muestra de 2 pacientes de inicio, es decir, 2 pacientes que no habían recibido aún la primera dosis de UTK. En el caso de la tercera muestra discrepante observamos por parte de Sanquin un resultado positivo tanto para fármaco como para anticuerpos antifármaco, lo cual dada la sensibilidad de la técnica RIA, es posible, no siéndolo para la técnica ELISA. Sin embargo, basándonos en el mismo argumento que para UTK, el RIA, aunque es más sensible que el ELISA, tampoco es estándar de referencia en la determinación de los niveles de

anticuerpos anti-UTK, por lo que no podemos saber a ciencia cierta cuál de los 2 métodos se desvía de la realidad. En cualquier caso la incidencia de anticuerpos anti-UTK en la cohorte de pacientes estudiada fue del 5% (2 pacientes), muy similar a la observada en otros estudios (Chiu *y cols.* 2015) aunque algo más alejada que la observada en un estudio clínico (9,3%) en el que se determinaron los anticuerpos anti-UTK con un inmunoensayo más sensible, como es el de electroquimioluminiscencia, en una cohorte de pacientes más grande (Ritchlin *y cols.* 2014).

Las principales diferencias entre los métodos para determinar los niveles de fármaco residen en los reactivos empleados y en los pasos que configuran el procedimiento del ensayo, así como en las diferentes sensibilidades inherentes a cada tipo de técnica. Existen pocos estudios comparativos y frecuentemente se reportan diferencias sistemáticas en las concentraciones de fármaco con diferentes tipos de ensayos e incluso con ensayos que comparten el mismo formato y tecnología. Quizá esto sea debido a una falta de optimización de las condiciones del ensayo y/o a la utilización de reactivos no específicos para el fármaco en cuestión (Castele *y cols.* 2012). Sin embargo, en nuestro estudio hemos demostrado que es posible la obtención de similares resultados con diferentes ensayos y tecnologías, lo cual está estrechamente ligado a la calidad en el diseño y en el desarrollo de los inmunoensayos. Este factible intercambio de metodologías es seguro en la práctica clínica incluso en ausencia de un estándar de referencia y debería conllevar al establecimiento de acciones y rangos terapéuticos similares.

El tiempo en el que se recoge la muestra es especialmente importante en la monitorización de los niveles circulantes de fármacos biológicos. Los tiempos apropiados durante el intervalo de dosificación varían entre diferentes fármacos dependiendo de la pauta de administración y, por ende, de sus características de absorción y distribución. Es importante la estandarización de la toma de la muestra en cuanto a realizarla en el mismo momento para una correcta interpretación de los resultados y para poder comparar los resultados intra o interindividuales. La aproximación más convencional para determinar los niveles de fármaco y de anticuerpos antifármaco es llevar a cabo los análisis en muestras de suero recogidas al final de un ciclo terapéutico, es decir, antes de la siguiente dosis, lo que se conoce como niveles valle, reflejando, normalmente, las concentraciones en el estado estacionario. Este es el momento en el que los niveles de fármaco son más bajos; si son detectables, reflejan la presencia de fármaco durante todo el ciclo terapéutico y de no ser así, no es posible determinar en qué momento desapareció el fármaco. El momento valle podría tener un efecto

negativo en la optimización de la posología de tratamientos con un intervalo de dosificación espaciado ya que hasta la siguiente dosis el clínico no puede ajustar la posología en base a los niveles de fármaco (Menting *y cols.* 2015a). Para solventar este problema una aproximación válida sería la realización de estudios que predigan los niveles valle a partir de los niveles más cercanos a la administración del fármaco (Hoekman *y cols.* 2015). En relación a la determinación de los anticuerpos antifármaco, el momento valle es la mejor opción debido a que la mayoría de los ensayos para su determinación son sensibles a la presencia del fármaco, por lo que no podrían ser detectados en sueros recogidos a tiempos cercanos a la administración del fármaco (Hart *y cols.* 2011b).

#### **5.4. Correlación de los niveles de fármaco con la respuesta clínica**

GLM es un AcM humano efectivo en el tratamiento de las EspA que puede desencadenar una respuesta inmunogénica a través de la producción de anticuerpos que neutralizan su actividad biológica (Chen *y cols.* 2015b). Los limitados resultados acerca de la inmunogenicidad de GLM nos llevaron a analizar la relación entre los niveles valle de GLM, anticuerpos anti-GLM y la respuesta clínica.

En la cohorte de pacientes estudiada ( $n = 57$ ) la relación entre hombres y mujeres fue de 2,4:1, coincidiendo con la frecuencia descrita en estudios epidemiológicos (Ghasemi-Rad *y cols.* 2015), por tanto, disponíamos de una población representativa en cuanto al sexo de los/as pacientes.

Los niveles de GLM se mantuvieron constantes a la semana 26 y la semana 52 en el conjunto de nuestra población, no observándose diferencias entre dichas semanas, probablemente debido al alcance del estado estacionario a las 12 semanas desde el inicio del tratamiento (**figura 4.37**) (Ficha Técnica de GLM, EMA 2009). Encontramos una correlación inversa entre los valores de ASDAS y los niveles de GLM a la semana 26 y a la semana 52 del seguimiento, de manera que los/as pacientes con mayores niveles de GLM presentaban una actividad de la enfermedad menor, respondiendo por tanto al tratamiento (**figura 4.38**). En nuestra cohorte casi el 70% de los/as pacientes fueron respondedores/as ( $ASDAS > 2,1$ ) al tratamiento a las 52 semanas del seguimiento con una actividad de la enfermedad baja ( $ASDAS = 1,34$ ) y presentando la mayoría de ellos/as niveles mayores de GLM que los/as no respondedores/as (**figura 4.40**). Esta diferencia en los niveles

valle de GLM entre respondedores/as y no respondedores/as también se ha encontrado en otros estudios realizados en pacientes con EA tras 6 meses de tratamiento (Chen y cols. 2015b) y en pacientes con AR tras un año (Kneepkens y cols. 2014). Asimismo, la correlación directa de los valores de GLM con la mejoría clínica, definida como la disminución de los valores de ASDAS con respecto a los basales al menos en una magnitud de 1,1, fue significativa a la semana 52, tal y como se observa a la semana 26 para GLM en otros estudios (Chen y cols. 2015b) así como con otros fármacos (ADL, ETN) para el tratamiento de las mismas patologías reumáticas tanto a la semana 26 como a la 52 (Chen y cols. 2015c).

El índice BASDAI apareció con anterioridad al ASDAS como herramienta para evaluar la actividad de la enfermedad de pacientes con EA tratados/as con antagonistas del TNF $\alpha$ . A través de una EVA se recoge información sobre el dolor de espalda, la fatiga, el dolor y la inflamación de articulaciones periféricas, la sensibilidad localizada y la duración y severidad de la rigidez matutina (Zochling 2011). Los/as pacientes con un valor de BASDAI < 4 presentan una baja actividad de la enfermedad respondiendo, por tanto, al tratamiento mientras que un valor de BASDAI  $\geq$  4,0 significa ausencia de respuesta (Braun y cols. 2003). Normalmente, se utiliza el BASDAI50 para evaluar la respuesta clínica el cual se define como la disminución de al menos el 50% del valor de BASDAI respecto al valor basal (Chen y cols. 2015b). En nuestro estudio, aunque el índice de actividad de la enfermedad considerado como la principal herramienta de evaluación clínica fue el ASDAS, también se recogió el índice BASDAI y se observó una correlación entre ambos índices a la semana 52 del seguimiento de los/as pacientes con EspA tratados/as con GLM (**figura 4.41**). Sin embargo, la correlación de los niveles de GLM con el BASDAI o con el BASDAI50 no fue significativa a la semana 52 del seguimiento (**figura 4.42.A**), al contrario de lo observado cuando la clasificación de la respuesta se llevó a cabo con el índice ASDAS. Estas diferencias podrían deberse a que las poblaciones de pacientes respondedores/as y no respondedores/as fueran distintas debido a las diferencias en la categorización de la respuesta con ambos índices, ya que el índice BASDAI presenta una menor sensibilidad para clasificar a los/as pacientes respondedores/as respecto al ASDAS (Fagerli y cols. 2012; Vastesaeger y cols. 2014). Sin embargo, sí se observaron diferencias en los niveles valle de GLM en función de la respuesta BASDAI50 en una cohorte de pacientes con EA (Chen y cols. 2015b), lo cual podría estar relacionado con el hecho de que en la población estudiada no solo hay pacientes con EA sino con otras patologías englobadas dentro de las EspA.

La asociación entre los niveles valle de antagonistas del TNF $\alpha$  y la respuesta clínica ha sido evaluada en diversos estudios. Pouw y cols. analizaron la curva de concentración – efecto en 221 pacientes con AR tratados/as con ADL identificando un rango terapéutico de 5 – 8  $\mu\text{g/ml}$  para un efecto clínico óptimo (Pouw y cols. 2015), mientras que Vande Casteele y cols. observaron que pacientes con EEI conseguían una buena respuesta clínica con unos niveles valle de IFX de 3 – 7  $\mu\text{g/ml}$  (Vande Casteele y cols. 2015). Por el contrario, Kneepkens y cols. analizaron la curva de concentración – efecto en 162 pacientes tratados/as con ETN sin encontrar una ventana terapéutica válida (Kneepkens y cols. 2015). En nuestro estudio, la curva de concentración – efecto de GLM mostró un rango óptimo de niveles de GLM de 0,62 – 1,4  $\mu\text{g/ml}$  para desarrollar una respuesta clínica (ASDAS < 2,1) en pacientes con EspA (**figura 4.45.A**). Niveles de GLM comprendidos en dicho rango también se correlacionaron con una buena mejoría clínica ( $\Delta\text{ASDAS} > 2,0$ ) (**figura 4.45.B**). Sin embargo, para obtener una sensibilidad y especificidad aceptable en la predicción de la respuesta clínica, el punto de corte terapéutico se encontraría en 0,75  $\mu\text{g/ml}$  (**figura 4.46**), ya que si se mantiene el punto de corte terapéutico en 0,62  $\mu\text{g/ml}$  la especificidad en la predicción de la respuesta disminuye hasta el 54%. Este punto de corte terapéutico corroboró la concentración de GLM a partir de la cual se obtenía una buena mejoría clínica, sin embargo, la discrepancia entre el punto de corte terapéutico (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ) y la mínima concentración necesaria para la respuesta al tratamiento (0,62  $\mu\text{g/ml}$ ) podría deberse a que la prueba diagnóstica no presenta el 100% de sensibilidad ni especificidad y/o al posible efecto introducido al minimizar la variabilidad interindividual por la agrupación de pacientes para el análisis de la curva de concentración-efecto. No ocurre lo mismo entre el punto de corte terapéutico y la mejoría clínica ya que en la curva ROC la concentración de GLM, correspondiente al punto de corte terapéutico, se obtuvo con independencia del valor de  $\Delta\text{ASDAS}$ . Por otra parte, niveles de GLM superiores a 1,4  $\mu\text{g/ml}$  no provocaron un aumento de la respuesta ni de la mejoría clínicas. Estos hallazgos sugieren que la presencia de niveles de GLM dentro del rango descrito es suficiente para el control de la enfermedad y que niveles de GLM superiores a 1,4  $\mu\text{g/ml}$  también los son para mantener unos valores bajos de PCR y de VSG (**figura 4.44**). Esta correlación de los niveles de GLM con los valores de PCR y de VSG también fue descrita en otro estudio realizado con pacientes con AR (Kneepkens y cols. 2014).

Ninguno de los parámetros basales analizados pudo actuar como marcador predictivo de la respuesta clínica, sin embargo, sí los niveles de GLM, por lo que la monitorización de GLM podría ser útil en el establecimiento de la posología adecuada enfocada a conseguir estrategias terapéuticas

personalizadas. La respuesta a GLM fue independiente del uso previo de otros fármacos biológicos o incluso de la concomitancia con otros tratamientos, sin embargo, algunos estudios han demostrado que el uso de MTX aumenta los niveles de GLM reduciendo su aclaramiento (Chen y cols. 2015b) aunque en nuestro estudio los pacientes con MTX no mostraron niveles de GLM diferentes de los pacientes en monoterapia (**tabla 4.22**).

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones como podría ser el reducido número de pacientes, sin embargo, hasta donde sabemos, el presente estudio es el primero que muestra la asociación de los niveles de GLM con la actividad de la enfermedad en pacientes con EspA durante el primer año de tratamiento y establece un rango terapéutico y, más concretamente, un punto de corte terapéutico de niveles valle de GLM. Además, también hay que recalcar que, aunque el número de pacientes es bajo, la cohorte es homogénea, incluyendo pacientes con predominancia en la afectación axial en los que la actividad de la enfermedad y la mejoría clínica han sido evaluadas con el índice validado ASDAS que combina no solo la impresión subjetiva del paciente sino también los valores de PCR (Lukas y cols. 2009).

TCZ es un anticuerpo monoclonal humanizado generado por inserción de las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo de ratón contra IL-6R en una IgG1 $\kappa$  humana. Está indicado para el tratamiento de AR de moderada a severa, en combinación con MTX, en adultos que respondieron inadecuadamente o presentaron intolerancia a terapias previas con uno o más FAME o antagonistas del TNF $\alpha$ . Durante el tratamiento no es frecuente que se desarrollen anticuerpos anti-TCZ aunque aún no se sabe demasiado acerca de su inmunogenicidad y de la posible asociación con los niveles de TCZ y la respuesta clínica al tratamiento.

En nuestro estudio se reclutaron 34 pacientes con AR, en su mayoría mujeres (1:7,5), en tratamiento con 8 mg/kg de TCZ cada 4 semanas. La presencia de mujeres fue muy superior a la prevalencia general (1:3) (Alamanos y cols. 2006).

Se observó correlación de los niveles valle de TCZ con la respuesta (**figura 4.49**) y con la mejoría (**figura 4.50**) clínicas, definidas en base a los criterios EULAR, a la semana 26 y a la semana 52 del seguimiento. Los niveles de TCZ en pacientes respondedores/as (DAS28  $\leq$  3,2) fueron mayores que en los/as no respondedores/as (DAS28  $>$  3,2) (**figura 4.51**) de la misma manera que lo

fueron en los/as pacientes que experimentaron una buena mejoría clínica ( $\Delta$ DAS28 > 1,2) (**figura 4.51**). Estos resultados concuerdan con los de otro trabajo de investigación reciente en el que dicha correlación se observó únicamente en los/as pacientes que presentaban niveles de TCZ superiores a 10  $\mu$ g/ml en una población casi 4 veces mayor (Benucci y cols. 2016) que la de nuestro estudio, sin embargo, existe otro estudio con un número de pacientes similar al nuestro en el que los niveles de TCZ no se correlacionan con la respuesta clínica al tratamiento (Sigaux y cols. 2017).

Las manifestaciones más notables de la AR (destrucción articular, incapacidad y disminución de la calidad de vida) pueden mitigarse, en parte, con una estrategia terapéutica apropiada, para la que se necesita medir la actividad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento con herramientas objetivas y estandarizadas. Estas herramientas son índices compuestos basados en variables de laboratorio y clínicas. Entre ellas, la más utilizada es el DAS28, aunque la complejidad y la necesidad de utilizar programas informáticos para calcularlo han llevado al desarrollo de índices más simples como el SDAI y el CDAI. El SDAI se calcula con una simple suma lineal de parámetros como el recuento de articulaciones tumefactas e inflamadas de un total de 28 articulaciones, la impresión global de la actividad de la enfermedad por parte del paciente y del clínico y los valores de PCR o VSG (Smolen y cols. 2003). El CDAI es una simplificación del SDAI en el que se ha eliminado la contribución de los valores de PCR o VSG. Una manera de comparar estos índices es comparando sus propiedades metrológicas entre las que destacan la validez, la reproducibilidad, la concordancia y el poder discriminativo en términos de sensibilidad al cambio a lo largo del tiempo de evolución de la enfermedad y a través de los diferentes estadios de severidad (Gaujoux-Viala y cols. 2012).

En nuestro trabajo, aunque la evaluación de la respuesta y su correlación con los niveles de TCZ se realizó con el DAS28, también se recogieron los valores de los índices SDAI y CDAI. Tanto el SDAI como el CDAI mostraron una correlación directa con el DAS28 así como entre ellos mismos (**figura 4.53**). Estos resultados ya se habían observado en otros estudios llevados a cabo para estudiar la concordancia entre ellos revelando una clasificación similar de los pacientes de AR con alta, moderada y baja actividad de la enfermedad y remisión clínica (Aletaha y cols. 2005a; Aletaha y cols. 2005b; Khanna y cols. 2007), aunque las pequeñas discrepancias que pueden observarse entre estos índices son debidas a la definición menos conservadora de remisión por el DAS28 (Landewé y cols.



inversa de los niveles de TCZ con los de PCR y VSG era esperable ya que TCZ inhibe la producción de las proteínas de fase aguda por bloqueo directo de la acción de la IL-6 (Kaneko y cols. 2012).

Las adipocitoquinas liberadas del tejido adiposo podrían contribuir a la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias como AR. El hecho de que la obesidad aumente el riesgo de padecer AR incluso de contribuir a una mayor o menor actividad de la enfermedad dependiendo de su estadio, sugiere que existe una posible asociación entre el tejido graso y la AR. Se ha observado una asociación negativa entre el IMC y la respuesta a antagonistas del TNF $\alpha$ , sobre todo a IFX (Klaasen y cols. 2011), sugiriendo que la masa grasa afecta a la respuesta a este tipo de fármacos, aunque esta asociación no se ha encontrado en el tratamiento con TCZ (Gardette y cols. 2016). En la cohorte de pacientes analizada había un 44% con peso normal, un 32% con sobrepeso y un 24% con obesidad, pero no encontramos diferencias entre respondedores/as y no respondedores/as en función del IMC permaneciendo, por tanto, los niveles valle de TCZ invariables en las 3 categorías (resultados no mostrados) tal y como ya se había demostrado recientemente (Sigaux y cols. 2017). Estas diferencias en la asociación entre el IMC y la respuesta a IFX y TCZ podrían explicarse atendiendo a la naturaleza de los fármacos. IFX es un fármaco hidrófilo cuya farmacocinética puede verse alterada por la disminución del volumen de distribución por el exceso de tejido adiposo en pacientes obesos (Klaasen y cols. 2011). Sin embargo, TCZ es un fármaco lipófilo que incluso podría inyectarse subcutáneamente lo que sugiere que la farmacocinética no se ve afectada por el tejido adiposo (Gardette y cols. 2016). Otras características basales como los valores de PCR, VSG, DAS28, SDAI, CDAI y la positividad para el FR y para ACPA no pudieron utilizarse como biomarcadores predictivos de la respuesta a TCZ (Wang y cols. 2016). Sin embargo, los niveles de TCZ correlacionaron con el DAS28, de manera que conforme aumentaban los niveles de TCZ disminuía la actividad de la enfermedad, por lo que la monitorización de TCZ podría ser útil en el establecimiento de la posología adecuada enfocada a conseguir estrategias terapéuticas personalizadas.

La PsO es un desorden inflamatorio que afecta a la piel en la que existe una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias. Los tratamientos más utilizados se basan en la administración de antagonistas del TNF $\alpha$  y de las IL-12 e IL-23, los cuales pueden inducir reacciones inmunogénicas en forma de anticuerpos antifármaco que neutralicen la acción terapéutica del fármaco. UTK es un anticuerpo monoclonal humano contra las IL-12 e IL-23 utilizado para el

tratamiento de la PsO en placa de moderada a grave en pacientes adultos que no responden, tienen contraindicado o no toleran otros tratamientos sistémicos incluyendo la Cs, MTX o la terapia PUVA.

En comparación con los numerosos estudios que existen en la actualidad sobre los antagonistas del TNF $\alpha$ , existen pocos acerca de la inmunogenicidad de UTK, probablemente debido a su más reciente desarrollo para el tratamiento de la PsO y a la baja disponibilidad de kits comerciales para la determinación de los niveles de UTK y de anticuerpos anti-UTK.

La frecuencia de aparición de la PsO es la misma en hombres y mujeres, tal y como se observa prácticamente en la cohorte de pacientes de nuestro estudio (Parisi y cols. 2013).

La pauta de administración recomendada de UTK en pacientes con PsO en placa es de 45 mg cada 12 semanas en pacientes con un tratamiento de mantenimiento. A los/as pacientes que inician tratamiento se les administra una dosis de inducción al de un mes tras haber recibido la primera dosis para posteriormente adaptarse al régimen recomendado de 12 semanas. Debido a la diferente respuesta clínica interpaciente, los/as dermatólogos/as alteran la frecuencia de administración recomendada en la búsqueda de un beneficio individual y de un abaratamiento de los costos ocasionados por este tipo de tratamientos. Así en nuestro estudio cuando los/as pacientes presentaron una respuesta clínica insuficiente fueron sometidos/as a una intensificación del tratamiento aumentando la frecuencia de administración (8-10 semanas) y cuando presentaron una buena respuesta clínica mantenida en el tiempo fueron sometidos/as a un espaciado (13-19 semanas). No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de UTK, pero sí en los del PASI, en función de la pauta de administración. Los niveles de UTK se distribuyeron de forma homogénea entre los/as pacientes con tratamiento intensificado, espaciado y con la frecuencia recomendada, lo cual podría ser explicado por la farmacocinética de UTK. Es posible que a las 8-10 semanas tras la administración de la dosis de UTK los niveles ya hayan alcanzado la concentración mínima manteniéndose constante hasta la siguiente dosis. Por el contrario los valores de PASI en los/as pacientes con tratamiento intensificado fueron mayores que los encontrados en los/as pacientes con la frecuencia recomendada por lo que el aumento de la frecuencia de administración no fue un condicionante de una buena respuesta, es decir, la intensificación del tratamiento no fue suficiente para alcanzar la respuesta clínica. Los/as pacientes con el tratamiento espaciado no presentaron diferencias en los valores del PASI con respecto a los/as de frecuencia recomendada, por lo tanto, no



La hipótesis obtenida del modelo predictivo se correlaciona con lo observado en la cohorte de pacientes de nuestro estudio en la que el 89% de los/as pacientes del estudio alcanzó el PASI75 a las 52 semanas de los/as cuales el 61% consiguió también el PASI90. Entre los/as pacientes que iniciaron el tratamiento con UTK en el momento de su inclusión en el estudio, el 80% alcanzó el PASI75 a las 52 semanas de los/as cuales el 42% consiguió también el PASI90. Entre los/as pacientes que fueron incluidos/as en el estudio con un tratamiento de mantenimiento con UTK el 95% respondió adecuadamente al tratamiento con UTK en términos del PASI75 de los/as cuales el 45% consiguió alcanzar la respuesta clínica en base al PASI90.

### **5.5. Correlación de los niveles de anticuerpos antifármaco con la respuesta clínica**

La principal causa de ausencia de respuesta al tratamiento con fármacos biológicos es debida a la presencia de niveles bajos por la formación de anticuerpos antifármaco (Arends *y cols.* 2010).

En el caso concreto del tratamiento con GLM la frecuencia de aparición de anticuerpos antifármaco en pacientes con AR varía entre 2,1% - 15,2% (Chen *y cols.* 2015b; Kay *y cols.* 2008; Keystone *y cols.* 2009; Kneepkens *y cols.* 2014). Por el contrario, en EA la frecuencia de aparición disminuye hasta encontrarse en el rango de 2,3 - 8% (Braun *y cols.* 2012; Chen *y cols.* 2015b; Kneepkens *y cols.* 2014). En la cohorte estudiada solo 1 paciente desarrolló anticuerpos anti-GLM a las 48 semanas del tratamiento (1,7%), inferior a lo observado en ensayos clínicos (Braun *y cols.* 2012) pero coincidente con la incidencia observada en otro estudio, aunque en ese caso el único paciente que desarrolló anticuerpos lo hizo antes de las 24 semanas (Chen *y cols.* 2015b).

En cuanto a la cohorte de pacientes tratados/as con TCZ analizada, ninguno presentó anticuerpos anti-TCZ, lo que concuerda con la baja frecuencia de aparición encontrada en otros estudios, donde la incidencia a los 6 meses del seguimiento fue inferior al 1% (Benucci *y cols.* 2016; Sigaux *y cols.* 2017) y con una aparición de anticuerpos antifármaco transitorios, de manera que los 3 pacientes que desarrollaron bajos títulos de anticuerpos antifármaco presentaron ausencia de los mismos 3 meses después (Sigaux *y cols.* 2017). Nuestros resultados también concuerdan con ensayos clínicos en los que la frecuencia de aparición se encontraba entre el 0,7 - 2,2% independientemente de

la vía de administración y de la concomitancia con MTX (Burmester y cols. 2016; Dougados y cols. 2013). En nuestro estudio la ausencia de anticuerpos anti-TCZ fue independiente de la concomitancia con MTX, lo que podría explicarse por el perfil de eficacia similar que presenta la monoterapia con TCZ comparada con su administración combinada con MTX. Tampoco los niveles valle de TCZ se vieron influidos por la administración conjunta de TCZ y MTX, a diferencia de lo observado con antagonistas del TNF $\alpha$  (Chen y cols. 2015b). La proporción de pacientes con anticuerpos anti-TCZ es muy baja en comparación con los/as pacientes en tratamiento con IFX o con ADL (Arends y cols. 2010; Chen y cols. 2015c; Vincent y cols. 2013).

En la cohorte de pacientes tratados/as con UTK estudiada, se encontró una baja proporción de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-UTK (5,4%) similar a la observada en otros estudios (6,4% - 7%) (Chiu y cols. 2015; Menting y cols. 2015a) y en ensayos clínicos (4,0 – 5,2%) (Kimball y cols. 2013; Papp y cols. 2008). Muchos de estos estudios evaluaron la posible asociación de la presencia de anticuerpos anti-UTK con los efectos adversos, sobre todo con las reacciones infusionales, pero pocos estudiaron su impacto sobre la eficacia del tratamiento. Estudios previos han sugerido que la positividad para anticuerpos antifármaco no influye en la respuesta clínica (Menting y cols. 2015a; Tsai y cols. 2011), sin embargo, nosotros sí hemos encontrado dicha relación, al observar que los/as pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-UTK tenían una peor respuesta clínica con niveles indetectables de fármaco. Uno de los pacientes con anticuerpos anti-UTK durante 2 muestras consecutivas y con una tendencia marcada al aumento de los niveles recibió a la semana 26 CsA, llevando los anticuerpos anti-UTK a niveles indetectables (Borel y cols. 1977).

El rango de frecuencia de aparición de anticuerpos antifármaco es amplio porque varios factores pueden influir en la inmunogenicidad y porque la respuesta clínica es multifactorial (van Schouwenburg y cols. 2013), por lo que la comparación directa de la incidencia de anticuerpos antifármaco es complicada. Además, las características de los/as pacientes incluidos/as en los ensayos clínicos no reflejan con exactitud las características de la población en la práctica clínica habitual, sobretodo en relación a las comorbilidades, interrupción del tratamiento, tratamientos concomitantes, cambio entre biológicos y heterogeneidad en las características clínicas basales, que quedan excluidos de los ensayos clínicos. La discrepancia entre la posible relación entre la inmunogenicidad y la respuesta clínica podría ser debida a las diferencias metodológicas en la detección de los anticuerpos, ya que se ha demostrado la importancia que tiene la elección de la metodología y de la frecuencia de

la toma de las muestras en función de la pauta de administración para la obtención del éxito en la determinación de la inmunogenicidad de biológicos (Hart y cols. 2011a; van Schouwenburg y cols. 2010).

La baja incidencia de anticuerpos antifármaco encontrada en las cohortes de pacientes tratados/as con GLM, TCZ y UTK de nuestro estudio podría explicarse por la baja inmunogenicidad de los fármacos o porque la metodología empleada para su detección no sea la apropiada, aunque con respecto a esta última premisa, se ha demostrado que el formato ELISA puente, aunque no revele información del isotipo de los anticuerpos ni de la localización de los epítomos que reconocen, es un método válido para el cribado y confirmación de resultados positivos para anticuerpos (Stubenrauch y cols. 2010). Es cierto que se pueden producir interferencias en la detección de anticuerpos antifármaco en presencia del fármaco formándose inmunocomplejos no detectables, sobre todo en el caso de TCZ cuya dosis administrada (8 mg/kg/4 semanas) es superior a la de otros fármacos biológicos (IFX 3 mg/kg/8 semanas; ADL 40 mg/2 semanas, ETN 50 mg/semana, GLM 50 mg/4 semanas, UTK 45 mg/ 12 semanas). Sin embargo, no parece ser el caso de la detección de anticuerpos anti-TCZ con el inmunoensayo desarrollado ya que existe un perfecto grado de acuerdo con el RIA del Servicio de análisis de Biológicos de Sanquin (Países Bajos), metodología menos sensible a este tipo de interferencias (Hart y cols. 2011a). La baja prevalencia de anticuerpos anti-TCZ más bien podría ser consecuencia del bloqueo de la IL-6 inducido por TCZ sobre los linfocitos Th foliculares y/o linfocitos B en sus diferentes estadios de diferenciación y maduración. Este bloqueo de la acción de la IL-6 conllevaría a la supresión de la producción de IL-21 necesaria para la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas y la consiguiente producción de anticuerpos (Eto y cols. 2011; Yao y cols. 2014). Aunque el RIA es más sensible y específico que el ELISA presenta como inconveniente del uso de radiactividad lo que conlleva a la necesidad de disponer de una infraestructura adecuada, reglada y muy específica, personal altamente cualificado con experiencia en el manejo de radioisótopos y fundamentalmente la dificultad de implementar esta técnica en la práctica clínica habitual a través de la comercialización de kits de diagnóstico *in vitro*. Sin embargo, esta técnica tampoco es infalible en la detección de anticuerpos antifármaco y puede reportar falsos positivos. En nuestro estudio se analizaron por RIA muestras basales procedentes de pacientes antes de iniciar el tratamiento con UTK que fueron reportadas como positivas, por lo que estas incongruencias podrían deberse a inespecificidades de la técnica.

La imposibilidad de establecer el punto de corte terapéutico de las concentraciones de anticuerpos antifármaco clínicamente relevante, debido a la baja incidencia detectada en las cohortes de nuestro estudio, conllevaría una pérdida de precisión y exactitud en el pronóstico de la respuesta a través solo de la monitorización de la biodisponibilidad de los fármacos (Steenholdt y cols. 2011), por lo que hubiera sido interesante haber contado con una población más amplia.

Nuestros estudios exploran la utilidad clínica de la detección de los niveles de fármaco y de los anticuerpos antifármaco en la práctica clínica habitual. Debido a que la aparición de anticuerpos antifármaco está relacionada con la respuesta clínica y con los niveles circulantes de fármaco, los anticuerpos antifármaco podrían ejercer como potenciales marcadores de ausencia de respuesta o de pérdida de la misma. De la misma manera los niveles de fármaco también servirían como parámetro predictivo de respuesta en los/as pacientes que no han desarrollado anticuerpos antifármaco.

La producción de anticuerpos antifármaco está asociada con una pérdida de eficacia al tratamiento como se ha observado en diversos estudios aunque con cierto carácter contradictorio. La principal causa de la ambigüedad de la importancia clínica de los anticuerpos antifármaco y de la relevancia de los niveles de fármaco, podría radicar en la metodología empleada para su detección. Los resultados falsos positivos y falsos negativos contribuyen a las discrepancias encontradas mayoritariamente cuando se usan enzimoimmunoanálisis, aunque ya hemos visto que también pueden suceder en otras técnicas más sensibles como el RIA. Los falsos positivos pueden aparecer por uniones inespecíficas de anticuerpos heterófilos de baja afinidad, FR y factores del complemento que se unen a la fracción Fc de las inmunoglobulinas incluyendo a los fármacos y a los anticuerpos antifármaco, aunque este hecho también puede dar lugar a falsos negativos. Los falsos negativos generalmente son causados por el efecto matriz en ensayos en fase sólida provocando un enmascaramiento del epítopo o por la incapacidad de detectar inmunoglobulinas funcionalmente monovalentes (anticuerpos biespecíficos), como es el caso de nuestros inmunoensayos ELISA de inmunogenicidad frente a la detección de anticuerpos antifármaco de isotipo IgG4. El hecho de no poder detectar IgG4 no es un problema debido a que este isotipo suele aparecer en los tratamientos crónicos y de generarse en estadios más iniciales, es más probable que lo hagan junto con otros isotipos sí detectables por ELISA. Otra limitación de nuestros inmunoensayos es la interferencia en la detección de anticuerpos antifármaco en presencia del fármaco, pudiendo conllevar a resultados falsos negativos. Es posible que los anticuerpos antifármaco estén presentes pero al estar formando

complejos con el fármaco no son detectables. Aunque este hecho no presenta demasiada relevancia clínica, ya que si se detecta fármaco, aunque el/la paciente tenga anticuerpos, éstos no influyen en la actividad de la enfermedad aunque es una condición que revela el principio de una posible pérdida de respuesta, por lo que es importante la monitorización de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de fármacos biológicos sobre todo en los casos en los que la respuesta clínica no sea adecuada. Nuestros estudios también contarían con limitaciones debido al bajo número de muestras positivas para anticuerpos antifármaco y de manera general por el tamaño reducido de la poblaciones estudiadas, por lo que existe la necesidad de estudios adicionales de carácter multicéntrico, con un tamaño muestral más elevado y un seguimiento más a largo plazo para poder afianzar nuestras observaciones. Se ha demostrado que los/as pacientes con una respuesta inmunogénica en forma de generación de anticuerpos antifármaco contra un antagonista del TNF $\alpha$  tiene más probabilidades de desarrollar anticuerpos antifármaco contra otro biológico con la misma diana terapéutica (Bartelds *et al.* 2010) pero no contra otro con distinta diana (Chiu *et al.* 2015). Los/as pacientes con fallo a inhibidores del TNF $\alpha$  no debido a fenómenos inmunogénicos podrían beneficiarse de un cambio a otro biológico con otros mecanismos de acción indicando que la determinación de la inmunogenicidad de un fármaco proporciona información de la probabilidad de éxito del cambio a otro biológico. Por consiguiente, la determinación de la biodisponibilidad e inmunogenicidad de GLM, TCZ y UTK en pacientes con EspA, AR y PsO respectivamente, podría constituir una estrategia complementaria para la toma de decisiones terapéuticas por parte del clínico contribuyendo a una elección y optimización racional del tratamiento individualizado.

Actualmente existen diversos estudios donde se han publicado rangos terapéuticos para determinados fármacos y patologías concretas como IFX en EII, en AR y en EA, y ADL en AR. Sin embargo, solo nuestro estudio ha revelado los correspondientes rangos terapéuticos para GLM, TCZ y UTK. Hemos conseguido demostrar que es posible el desarrollo de inmunoensayos basados en la tecnología ELISA para la monitorización de terapias biológicas con unas prestaciones técnicas adecuadas y equivalentes a otras metodologías disponibles en el mercado y que los resultados derivados de dicha monitorización (no solo de los ampliamente estudiados antagonistas del TNF $\alpha$  sino también de otros fármacos biológicos con distintas dianas terapéuticas aparecidos más recientemente con el fin de solucionar la pérdida de eficacia de los primeros), podrían aportar información complementaria a los clínicos para pronosticar la respuesta clínica y de esta manera

ajustar la posología de los tratamientos para avanzar en el control de la eficacia y seguridad de los mismos y reducir el gasto económico derivado.



# **CONCLUSIONES**

---



## 6. CONCLUSIONES

1. Los AcM antifármaco específicos en formato  $F(ab')_2$  obtenidos por tecnología de expresión en fagos son útiles para la construcción de una arquitectura de inmunoensayo ELISA de captura o ELISA sándwich funcionalmente viable para la detección y cuantificación de fármacos biológicos.
2. Los AcP antifármaco específicos obtenidos por inmunización activa de animales son válidos para ser empleados como estándares de referencia en los inmunoensayos de inmunogenicidad ELISA puente para la detección y cuantificación de anticuerpos antifármaco humanos.
3. Las prestaciones técnicas de los inmunoensayos desarrollados, validadas en base a las recomendaciones de organizaciones autorizadas de índole internacional, son adecuadas para la posterior transformación de dichos inmunoensayos en dispositivos clínicos para el diagnóstico *in vitro*. Asimismo, el rendimiento de los inmunoensayos permanece invariable con el salto de escala desde las condiciones de laboratorio a la escala industrial, lo que garantiza su idoneidad para ser incluidos en el mercado competitivo.
4. La correlación y el grado de acuerdo entre los inmunoensayos desarrollados y otras técnicas disponibles basadas en tecnología ELISA y RIA, confirman que son herramientas válidas, con sensibilidades y especificidades en la medida similares, y por lo tanto, por primera vez se establece la posibilidad de interpretar y comparar los resultados obtenidos con diferentes técnicas.
5. En la población de pacientes con EspA, con AR o con PsO en tratamiento con GLM, TCZ y UTK respectivamente, los niveles valle de fármaco se asocian de forma inversa con la actividad de la enfermedad. Se establecen rangos terapéuticos para los tres fármacos, y más concretamente, los puntos de corte terapéuticos, es decir, las concentraciones de fármaco clínicamente relevantes para identificar a los/as pacientes susceptibles de beneficiarse de los tratamientos con GLM, TCZ y UTK.

6. En la población de pacientes con EspA o con PsO en tratamiento con GLM y UTK respectivamente, la aparición de anticuerpos antifármaco se asocia con la ausencia de respuesta clínica y con niveles indetectables de fármaco, por lo que la monitorización de la inmunogenicidad de fármacos biológicos es indispensable y complementaria a la monitorización de la biodisponibilidad de los mismos para la predicción de la respuesta clínica al tratamiento.
  
7. La monitorización por tecnología ELISA de la biodisponibilidad y de la inmunogenicidad de fármacos biológicos con distintos mecanismos de acción constituye una estrategia fundamental para la toma de decisiones terapéuticas y para el establecimiento de terapias personalizadas, con el objetivo final de pronosticar la mejor respuesta clínica, ayudar a ajustar la posología, aumentar la adherencia al tratamiento y reducir el gasto económico derivado.

# **ANEXOS**

---



## 7. ANEXOS

### 7.1. ANEXO 1

#### **MODELO DE HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE IMPLIQUEN LA UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS**

(Versión 6 de marzo de 2013)

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Estudio de correlación entre niveles séricos de ustekinumab, anticuerpos anti-idiotipo y la respuesta clínica en pacientes con psoriasis moderada-grave tratados con ustekinumab

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Dr. Jesús María Careaga Alzaga

**Hospital:** Hospital Universitario de Basurto      **ENTIDAD FINANCIADORA:** Empresa Progenika

#### **DESCRIPCIÓN GENERAL:**

Considerando la enfermedad o proceso que usted padece, le solicitamos su consentimiento para participar en un estudio del que le informamos a continuación. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este proyecto. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar cualquier aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

#### **PROPÓSITO DEL ESTUDIO:**

El objetivo principal de este estudio es una mejor comprensión de la efectividad de los tratamientos de la psoriasis. Mediante el estudio se obtendrá información para que en el futuro los pacientes de psoriasis puedan recibir el mejor tratamiento con ustekinumab (Stelara), con menores efectos adversos, mayor seguridad, y a la dosis más efectiva.

#### **EXPLICACIÓN DEL ESTUDIO:**

Se realizarán 5 extracciones de sangre en 12 meses, siendo cada una de ellas 72 horas previas a la inyección de ustekinumab. No hay contraprestación económica de ningún tipo. Se reembolsarán los

gastos ocasionados por el transporte, en el caso de que los participantes se desplacen desde otra localidad.

**MUESTRAS A RECOGER:** Como parte de este proyecto aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de Basurto se le va a extraer una muestra de sangre para utilizarla con fines de investigación, con objeto de aumentar los conocimientos sobre la patología objeto de estudio, y desarrollar nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

**SANGRE:** La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en la vena en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días. Las muestras obtenidas serán enviadas a la empresa Progenika para su estudio.

**BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA:** Es probable que no reciba ningún beneficio personal por su participación en este estudio. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento de su enfermedad o condición objeto de estudio.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con el equipo médico que le atiende no se verá afectada.

**TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y CONFIDENCIALIDAD.** Se solicita su consentimiento para la utilización de sus datos y de su muestra para el desarrollo de este proyecto. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como los datos de salud, como la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Solo el Dr. Jesús María Careaga Alzaga podrá relacionar estos datos con Vd, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento, garantizando el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que vd. cede para investigación.

La información será procesada durante el análisis de los resultados obtenidos y aparecerá en los informes finales. En ningún caso será posible identificarle, garantizándole la confidencialidad de la información obtenida, en cumplimiento de la legislación vigente.

**REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.** Puede revocar en cualquier momento su participación sin necesidad de dar explicaciones. En este caso, no se recogerán nuevos datos después del abandono del estudio. Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos ante el Dr. Jesús María Careaga Alzaga que le informa, cuyo lugar de trabajo es Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Basurto. Avda Montevideo, 18. 48013 Bilbao. Teléfono 944006000.

### **DESTINO DE LA MUESTRA TRAS SU UTILIZACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones:

A. La **destrucción** de la muestra sobrante.

B. Su **utilización en futuros proyectos** relacionados con esta línea de investigación. A tal fin, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al **Biobanco Vasco para la Investigación** de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitaria (BIOEF) con objeto de que pueda ser conservada y destinada a futuras investigaciones relacionadas con la enfermedad o proceso objeto de estudio. En este caso, firmará el consentimiento específico incluido en este documento, que será custodiado por el coordinador del BIOBANCO de su Hospital. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

### **ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA EN EL BIOBANCO.**

Con la firma del consentimiento anexo, Vd. autoriza al Biobanco Vasco para la Investigación, al almacenamiento y utilización de sus datos clínicos relevantes, y su muestra, para la realización de proyectos de investigación en el área de enfermedades dermatológicas y del tejido celular subcutáneo.

El clínico responsable de la investigación entregará al Biobanco los datos clínicos y la muestra, conforme a su voluntad, para su almacenamiento en las instalaciones del centro hospitalario adscritas al Biobanco, así como el documento de consentimiento informado por usted firmado. En el hospital de Basurto se registrarán los datos que pudieran relacionarle con las muestras a conservar, empleando un procedimiento de anonimización o disociación, para garantizar la protección de su identidad. Solo

el Responsable clínico de esta donación y el coordinador del Biobanco de su Hospital podrán relacionar estos datos con Vd.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad. Sus muestras no podrán ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, se pretende que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual ni en el donante ni en sus familiares.

Los resultados de futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre su identidad. La donación de su muestra no supone ningún gasto extra.

**La utilización de la muestra biológica para una finalidad distinta** a la expresada habrá de ser expresamente autorizada por Vd. en un nuevo documento de consentimiento.

#### **ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LA INFORMACIÓN.**

Usted tiene derecho a conocer los datos genéticos clínicamente relevantes que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, siempre que así lo desee y lo solicite. La información que se obtenga podría ser relevante también para sus familiares. Si fuera este el caso, es decisión personal suya informar a dichos familiares -algo que nosotros le aconsejamos- con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro. En todo caso, la muestra estará disponible si usted la requiere por motivos de salud

#### **REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.**

En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento otorgado al Biobanco para su utilización, pudiendo solicitar su destrucción o la anonimización. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Para mayor información sobre sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos, si así lo desea, ante el Dr. Jesús María Careaga Alzaga que le informa, cuyo lugar

de trabajo es Servicio de Dermatología del Hospital Universitario Basurto. Avda Montevideo, 18. 48013 Bilbao. Teléfono 944006000.

### **CONSENTIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Investigador/Responsable clínico:** Dr. Jesús María Careaga Alzaga

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Estudio de correlación entre niveles séricos de ustekinumab, anticuerpos anti-idiotipo y la respuesta clínica en pacientes con psoriasis moderada-grave tratados con ustekinumab

Yo.....con

DNI..... declaro

que he leído la Hoja de Información al paciente, de la que se me ha entregado una copia. Se me han explicado las características del estudio, así como los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar, los derechos que puedo ejercitar, y las previsiones sobre el tratamiento de datos y muestras. He recibido suficiente información sobre el estudio.

Sé que se mantendrá en secreto mi identidad y que se identificarán mis muestras con un sistema de codificación. Soy libre de revocar mi consentimiento en cualquier momento y por cualquier motivo, sin tener que dar explicación y sin que repercuta negativamente sobre cualquier tratamiento médico presente o futuro.

Yo doy mi consentimiento para que se utilicen mis muestras y los datos asociados como parte de **este proyecto de investigación**. Consiento en participar voluntariamente.

Por la presente afirmo haber sido advertido sobre la posibilidad de recibir información relativa a mi salud derivada de los análisis genéticos (cuando se realicen) que se realicen sobre mi muestra biológica.

Yo solicito información

Yo no quiero recibir información

una vez finalizada la investigación sobre los resultados del estudio.





### ANEXO ACLARATORIO

SE GARANTIZA QUE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO, EL TRATAMIENTO, ALMACENAMIENTO Y UTILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS ALMACENADAS EN EL BIOBANCO CUMPLIRÁN CON LA **NORMATIVA APLICABLE**:

Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. En observancia a esta ley los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

### ¿QUÉ ES UN BIOBANCO?

Un **biobanco** es un centro de conservación, en condiciones adecuadas, de muestras, tejidos, ADN y otros derivados, que representan un valioso instrumento con destino a la investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes.

El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, uno de los cuales está ubicado en el Hospital de Basurto, en donde se almacenará y conservará su muestra.

Los proyectos de investigación realizados con las muestras almacenadas en el Biobanco serán aprobados por un Comité de Ética de la Investigación, y, si procede, autorizado por la autoridad sanitaria pertinente, previo vto informe favorable de los comités ético y científico externos del biobanco.

Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los Datos, conforme a la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. El Hospital de Basurto garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

## 7.2. ANEXO 2

### Tabla *t* de Student

La siguiente tabla recoge la distribución del parámetro *t* de Student. Se muestran los percentiles P90, P95 y P99 para dos colas para varios grados de libertad. Estos valores se aplican igualmente para resultados estadísticos positivos y negativos. Por ejemplo, el valor para el P95 para dos colas para 10 grados de libertad es 2,228, por lo que los valores del estadístico *t* entre + 2,23 (o mayor) y – 2,23 (o menor) son estadísticamente significativos al nivel de  $\alpha = 0,05$ .

DF	P90	P95	P99
6	1.943	2.447	3.707
7	1.895	2.365	3.500
8	1.860	2.306	3.355
9	1.833	2.262	3.250
10	1.812	2.228	3.169
11	1.794	2.201	3.106
12	1.782	2.179	3.054
13	1.771	2.160	3.012
14	1.761	2.145	2.977
15	1.753	2.132	2.947
16	1.746	2.120	2.921
17	1.740	2.110	2.898
18	1.734	2.101	2.878
19	1.729	2.093	2.861
20	1.725	2.086	2.845
21	1.721	2.080	2.831
22	1.717	2.074	2.819
23	1.714	2.069	2.807
24	1.711	2.064	2.797
25	1.708	2.060	2.787
26	1.706	2.056	2.779
27	1.703	2.052	2.771
28	1.701	2.048	2.763
29	1.699	2.045	2.756
30	1.697	2.042	2.750



# **BIBLIOGRAFÍA**

---



## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aalberse RC, Vandergaag R, Vanleeuwen J. 1983. Serologic aspects of Igg4 antibodies .1. prolonged immunization results in an Igg4-restricted response. *Journal of Immunology* 130(2):722-6.
- Aarden L, Ruuls SR, Wolbink G. 2008. Immunogenicity of anti-tumor necrosis factor antibodies - toward improved methods of anti-antibody measurement. *Curr Opin Immunol* 20(4):431-5.
- Abels DJ and Kattanbyron J. 1985. Psoriasis treatment at the dead-sea - a natural selective ultraviolet phototherapy. *J Am Acad Dermatol* 12(4):639-43.
- Adedokun OJ, Chan D, Padgett L, Xu Y, Hyams J, Turner D, Xu Z, Davis H, Strauss R. 2016. Pharmacokinetics and exposure-response relationships of golimumab in paediatric patients with moderate-to-severe ulcerative colitis: Results from a multicentre open-label study. *Journal of Crohns & Colitis* 10:S62-3.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278(3):1910-4.
- Aho K, Heliovaara M, Maatela J, Tuomi T, Palosuo T. 1991. Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid-arthritis. *J Rheumatol* 18(9):1282-4.
- Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. 1986. Occurrence of rheumatoid-arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 13(5):899-902.
- Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. 2006. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 american college of rheumatology criteria: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36(3):182-8.
- Albattal BM. 2016. Tocilizumab efficacy and safety in rheumatoid arthritis patients after inadequate response to disease-modifying anti-rheumatic drugs or anti-tumor necrosis factor. *Annals of Saudi Medicine* 36(3):190-6.
- Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, Smolen JS. 2005b. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: Validation of a clinical activity score. *Arthritis Research & Therapy* 7(4):R796-806.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO,III, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, et al. 2010. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria an american college of Rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62(9):2569-81.
- Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VPK, Stamm T, Smolen JS. 2005a. Remission and active disease in rheumatoid arthritis - defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum* 52(9):2625-36.

- Allen M, Ishida-Yamamoto A, McGrath J, Davison S, Iizuka H, Simon M, Guerrin M, Hayday A, Vaughan R, Serre G, et al. 2001. Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. *Laboratory Investigation* 81(7):969-76.
- Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC, Barker JNWN. 1999. A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 353(9164):1589-90.
- Altmuller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wjst M. 2001. Genomewide scans of complex human diseases: True linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 69(5):936-50.
- Arends S, Lebbink HR, Spooenberg A, Bungener LB, Roozendaal C, van der Veer E, Houtman PM, Griep EN, Limburg PC, Kallenberg CGM, et al. 2010. The formation of autoantibodies and antibodies to TNF-alpha blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 28(5):661-8.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The american-rheumatism-association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid-arthritis. *Arthritis Rheum* 31(3):315-24.
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, Elomaa O, Moser M, de Cid R, Ripatti S, Vorechovsky I, et al. 2002. Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 11(5):589-97.
- Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D'Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P. 2003. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in crohn's disease. *N Engl J Med* 348(7):601-8.
- Baker MP, Helen M. Reynolds, Brooke Lumericis, Christine J. Bryson. 2010. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. 1:4:314-22.
- Balasa B and Sarvetnick N. 2000. Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? lessons from (for) myasthenia gravis. *Immunol Today* 21(1):19-23.
- Barbosa MDFS, Vielmetter J, Chu S, Smith DD, Jacinto J. 2006. Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clinical Immunology* 118(1):42-50.
- Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BAC, Tak PP, Wolbink GJ. 2010. Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: A cohort study. *Ann Rheum Dis* 69(5):817-21.
- Behrouz B, Amirmozafari N, Khoramabadi N, Bahroudi M, Legae P, Mahdavi M. 2016. Cloning, expression, and purification of pseudomonas aeruginosa flagellin, and characterization of the elicited anti-flagellin antibody. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 18(6):e28271.

- Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. 2006. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum* 54(12):3782-9.
- Bendtzen K. 2012. Anti-TNF-alpha biotherapies: Perspectives for evidence-based personalized medicine. *Immunotherapy* 4(11):1167-79.
- Bendtzen K. 2013. Personalized medicine: Theranostics (therapeutics diagnostics) essential for rational use of tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Discovery Medicine* 15(83):201-11.
- Bendtzen K. 2015. Immunogenicity of anti-TNF-alpha biotherapies: II. clinical relevance of methods used for anti-drug antibody detection. *Frontiers in Immunology* 6:109.
- Benson JM, Peritt D, Scallon BJ, Heavner GA, Shealy DJ, Giles-Komar JM, Mascelli MA. 2011. Discovery and mechanism of ustekinumab A human monoclonal antibody targeting interleukin-12 and interleukin-23 for treatment of immune-mediated disorders. *Mabs* 3(6):535-45.
- Benucci M, Meacci F, Grossi V, Infantino M, Manfredi M, Bellio E, Bellio V, Li Gobbi F, Bazzichi L, Moscato P, et al. 2016. Correlations between immunogenicity, drug levels, and disease activity in an italian cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab. *Biologics : Targets & Therapy* 10:53-8.
- Bertototto A. 2009. Implications of neutralising antibodies on therapeutic efficacy. *J Neurol Sci* 277:S29-32.
- Bewley A and Page B. 2011. Maximizing patient adherence for optimal outcomes in psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25:9-14.
- Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M. 2006. The epitope recognized by rituximab. *Blood* 108(6):1975-8.
- Biondi Oriente C, Scarpa R, Pucino A, Oriente P. 1989. Psoriasis and psoriatic arthritis. dermatological and rheumatological co-operative clinical report. *Acta Dermatovenereologica.Supplementum* 146:69-71.
- Bissonnette R, Langley RG, Papp K, Matheson R, Toth D, Hultquist M, Geba GP, White B. 2009. Humanized anti-CD2 monoclonal antibody treatment of plaque psoriasis: Efficacy and pharmacodynamic results of two randomized, double-blind, placebo-controlled studies of intravenous and subcutaneous sipilizumab. *Arch Dermatol Res* 301(6):429-42.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618):729-33.
- Bland JM and Altman DG. 2010. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud* 47(8):931-6.

- Bloem K, van Leeuwen A, Verbeek G, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, van der Kleij D, Rispens T. 2015. Systematic comparison of drug-tolerant assays for anti-drug antibodies in a cohort of adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods* 418:29-38.
- Boehncke WH. 1996. Psoriasis and bacterial superantigens - formal or causal correlation? *Trends Microbiol* 4(12):485-9.
- Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, Gershwin ME. 2012. Twin studies in autoimmune disease: Genetics, gender and environment. *J Autoimmun* 38(2-3):J156-69.
- Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stahelin H. 1977. Effects of new anti-lymphocytic peptide cyclosporin-a in animals. *Immunology* 32(6):1017-25.
- Brandrup F, Holm N, Grunnet N, Henningsen K, Hansen HE. 1982. Psoriasis in monozygotic twins - variations in expression in individuals with identical genetic constitution. *Acta Derm Venereol* 62(3):229-36.
- Braun J, Deodhar A, Inman RD, van der Heijde D, Mack M, Xu S, Hsu B. 2012. Golimumab administered subcutaneously every 4 weeks in ankylosing spondylitis: 104-week results of the GO-RAISE study. *Ann Rheum Dis* 71(5):661-7.
- Braun J, Pham T, Sieper J, Davis J, van der Linden S, Dougados M, van der Heijde D, ASAS Working Grp. 2003. International ASAS consensus statement for the use of anti-tumour necrosis factor agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 62(9):817-24.
- Brito-Luna MJ, Villanueva-Quintero DG, Sandoval-Talamantes AK, Fafutis-Morris M, Graciano-Machuca O, Sanchez-Hernandez PE, Alvarado-Navarro A. 2016. Correlation of IL-12, IL-22, and IL-23 in patients with psoriasis and metabolic syndrome. preliminary report. *Cytokine* 85:130-6.
- Brown AJ and Slatopolsky E. 2008. Vitamin D analogs: Therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Aspects Med* 29(6):433-52.
- Burbelo PD, Lebovitz EE, Notkins AL. 2015. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Translational Research* 165(2):325-35.
- Burmester GR, Rubbert-Roth A, Cantagrel A, Hall S, Leszczynski P, Feldman D, Rangaraj MJ, Roane G, Ludivico C, Bao M, et al. 2016. Efficacy and safety of subcutaneous tocilizumab versus intravenous tocilizumab in combination with traditional DMARDs in patients with RA at week 97 (SUMMACTA). *Ann Rheum Dis* 75(1):68-74.
- Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. 2000. Estrogen up-regulates bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6):2703-8.

- Calabozo B, Duffort O, Carpizo JA, Barber D, Polo F. 2001. Monoclonal antibodies against the major allergen of plantago lanceolata pollen, pla 1 1: Affinity chromatography purification of the allergen and development of an ELISA method for pla 1 1 measurement. *Allergy* 56(5):429-35.
- Calabrese LH, Rose-John S. 2014. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* (10) 720-727.
- Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, Matsunami N, Ardlie KG, Civello D, Catanese JJ, et al. 2007. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* 80(2):273-90.
- Carrier Y, Ma H, Ramon HE, Napierata L, Small C, O'Toole M, Young DA, Fouser LA, Nickerson-Nutter C, Collins M, et al. 2011. Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: Implications in psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 131(12):2428-37.
- Castele NV, Burman DJ, Sturkenboom MGG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, van der Kleij D, Gils A, Dijkstra G. 2012. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: A comparison of three different assays. *Aliment Pharmacol Ther* 36(8):765-71.
- Chen D, Chen Y, Hung W, Chen H, Hsieh C, Chen Y, Huang W, Hsieh T. 2015b. Immunogenicity, drug trough levels and therapeutic response in patients with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis after 24-week golimumab treatment. *Ann Rheum Dis* 74(12):2261-4.
- Chen D, Chen Y, Tsai W, Tseng J, Chen Y, Hsieh C, Hung W, Lan J. 2015. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74(3):e16.
- Chiu H, Chu TW, Cheng Y, Tsai T. 2015. The association between clinical response to ustekinumab and immunogenicity to ustekinumab and prior adalimumab. *Plos One* 10(11):e0142930.
- Choi SJ, Lee KH, Park HS, Kim SK, Koh CM, Park JY. 2005. Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes. *Yonsei Med J* 46(6):818-26.
- Chung I, Ketharnathan S, Thiruvengadam M, Rajakumar G. 2016. Rheumatoid arthritis: The stride from research to clinical practice. *International Journal of Molecular Sciences* 17(6).
- CLSI publication EP05-A3. 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition (ISBN 1-56238-574-7).
- CLSI publication EP7-A2. 2005. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Second Edition (ISBN 1-56238-584-4).
- CLSI publication EP17-A2. 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition (ISBN 1-56238-796-0).

- CLSI publication EP06-A. 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (ISBN 1-56238-498-8).
- CLSI publication EP09-A3. 2013. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Third Edition (ISBN 1-56238-674-3).
- CLSI publication I/LA21-A2. 2008. Clinical Evaluation of Immunoassays; Approved Guideline - Second Edition (ISBN 1-56238-888-6).
- Coates LC, Conaghan PG, Emery P, Green MJ, Ibrahim G, MacIver H, Helliwell PS. 2012. Sensitivity and specificity of the classification of psoriatic arthritis criteria in early psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 64(10):3150-5.
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. 2010. Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Madica* 5(4):286-91.
- Cortes A, Pulit SL, Leo PJ, Pointon JJ, Robinson PC, Weisman MH, Ward M, Gensler LS, Zhou X, Garchon H, et al. 2015. Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nature Communications* 6:7146.
- Costa JdO, Pires de Lemos LL, de Avila Machado MA, Almeida AM, Kakehasi AM, Araujo VdE, Cherchiglia ML, Gurgel Andrade EI, Acurcio FdA. 2015. Infliximab, methotrexate and their combination for the treatment of rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Revista Brasileira De Reumatologia* 55(2):146-58.
- Coven TR, Burack LH, Gilleaudeau P, Keogh M, Ozawa M, Krueger JG. 1997. Narrowband UV-B produces superior clinical and histopathological resolution of moderate-to-severe psoriasis in patients compared with broadband UV-B. *Arch Dermatol* 133(12):1514-22.
- da Silva AJ, Brickelmaier M, Majeau GR, Li ZF, Su LH, Hsu YM, Hochman PS. 2002. Alefacept, an immunomodulatory recombinant FA-3/IgG1 fusion protein, induces CD16 signaling and CD2/CD16-dependent apoptosis of CD2(+) cells. *Journal of Immunology* 168(9):4462-71.
- Davidson A and Diamond B. 2001. Advances in immunology - autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345(5):340-50.
- de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PLJM, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, Stuart PE, Nair R, Helms C, et al. 2009. Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet* 41(2):211-5.
- de La Mata Llord J, Gonzalez Crespo R, Maese Manzano J. 2007. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra: A systematic review. *Reumatologia Clinica* 3(4):153-8.
- De Socio GVL, Simonetti S, Stagni G. 2006. Clinical improvement of psoriasis in an AIDS patient effectively treated with combination antiretroviral therapy. *Scand J Infect Dis* 38(1):74-5.

- Dediol I, Buljan M, Buljan D, Bulat V, Zivkovic MV, Situm M. 2009. Association of psoriasis and alcoholism: Psychodermatological issue. *Psychiatria Danubina* 21(1):9-13.
- Dighiero G and Rose NR. 1999. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol Today* 20(9):423-8.
- Dougados M, Kissel K, Sheeran T, Tak PP, Conaghan PG, Martin Mola E, Schett G, Amital H, Navarro-Sarabia F, Hou A, et al. 2013. Adding tocilizumab or switching to tocilizumab monotherapy in methotrexate inadequate responders: 24-week symptomatic and structural results of a 2-year randomised controlled strategy trial in rheumatoid arthritis (ACT-RAY). *Ann Rheum Dis* 72(1):43-50.
- Ebringer A and Rashid T. 2014. Rheumatoid arthritis is caused by a proteus urinary tract infection. *Apmis* 122(5):363-8.
- Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, Jones FGC. 1990. Clearance of severe psoriasis after allogenic bone-marrow transplantation. *Br Med J* 300(6729):908-.
- El-Kady IM and El-Masry SA. 2008. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines profile in rheumatoid arthritis patients. *The Egyptian Journal of Immunology / Egyptian Association of Immunologists* 15(1):109-14.
- Ellis CN, Fradin MS, Messana JM, Brown MD, Siegel MT, Hartley AH, Rocher LL, Wheeler S, Hamilton TA, Parish TG, et al. 1991. Cyclosporine for plaque-type psoriasis - results of a multidose, double-blind trial. *N Engl J Med* 324(5):277-84.
- Emery P, Fleischmann RM, Moreland LW, Hsia EC, Strusberg I, Durez P, Nash P, Amante EJB, Churchill M, Park W, et al. 2009. Golimumab, a human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, injected subcutaneously every four weeks in methotrexate-naïve patients with active rheumatoid arthritis twenty-four-week results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of golimumab before methotrexate as first-line therapy for early-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60(8):2272-83.
- Emery P, Keystone E, Tony HP, Cantagrel A, van Vollenhoven R, Sanchez A, Alecock E, Lee J, Kremer J. 2008. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: Results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis* 67(11):1516-23.
- Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, Yusuf I, Crotty S. 2011. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (t<sub>fh</sub>) differentiation. *Plos One* 6(3):e17739.
- Eyre RW and Krueger GG. 1982. Response to injury of skin involved and uninvolved with psoriasis, and its relation to disease-activity - koebner and reverse koebner reactions. *Br J Dermatol* 106(2):153-9.

- Fagerli KM, Lie E, van der Heijde D, Heiberg MS, Kaufmann C, Rodevand E, Mikkelsen K, Kalstad S, Kvien TK. 2012. Selecting patients with ankylosing spondylitis for TNF inhibitor therapy: Comparison of ASDAS and BASDAI eligibility criteria. *Rheumatology* 51(8):1479-83.
- Federman DG, Froelich CW, Kirsner RS. 1999. Topical psoriasis therapy. *Am Fam Physician* 59(4):957-62.
- Feng B, Sun L, Soltani-Arabshahi R, Bowcock AM, Nair RP, Stuart P, Elder JT, Schrodi SJ, Begovich AB, Abecasis GR, et al. 2009. Multiple loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *Plos Genetics* 5(8):e1000606.
- Ficha Técnica de GLM, EMA 2009
- Ficha Técnica de TCZ, EMA 2009
- Ficha Técnica de UTK, EMA 2013
- Ficha                      Técnica                      de                      UTK,                      FDA                      2016
- Findlay JWA and Dillard RF. 2007. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *Aaps Journal* 9(2):E260-7.
- Flendrie M, Creemers MCW, Welsing PMJ, den Broeder AA, van Riel PLCM. 2003. Survival during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62:30-3.
- Fujihara T, Fujita H, Tsubota K, Saito K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. 1999. Preferential localization of CD8(+) alpha(E)beta(+)(7) T cells around acinar epithelial cells with apoptosis in patients with sjogren's syndrome. *Journal of Immunology* 163(4):2226-35.
- Furst DE, Kavanaugh A, Florentinus S, Kupper H, Karunaratne M, Birbara CA. 2015. Final 10-year effectiveness and safety results from study DE020: Adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to standard therapy. *Rheumatology* 54(12):2188-97.
- Furuhashi T, Saito C, Torii K, Nishida E, Yamazaki S, Morita A. 2013. Photo(chemo)therapy reduces circulating Th17 cells and restores circulating regulatory T cells in psoriasis. *Plos One* 8(1):e54895.
- Gabriel SE and Michaud K. 2009. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 11(3):229.
- Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. 2003. Survival in rheumatoid arthritis - A population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 48(1):54-8.
- Galvin JE, Hemric ME, Ward K, Cunningham MW. 2000. Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J Clin Invest* 106(2):217-24.

- Garces S, Demengeot J, Benito-Garcia E. 2013. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: A systematic review of the literature with a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 72(12):1947-55.
- Gardette A, Ottaviani S, Sellam J, Berenbaum F, Liote F, Meyer A, Sibilia J, Fautrel B, Palazzo E, Dieude P. 2016. Body mass index and response to tocilizumab in rheumatoid arthritis: A real life study. *Clin Rheumatol* 35(4):857-61.
- Gaujoux-Viala C, Mouterde G, Baillet A, Claudepierre P, Fautrel B, Le Loet X, Maillefert J. 2012. Evaluating disease activity in rheumatoid arthritis: Which composite index is best? A systematic literature analysis of studies comparing the psychometric properties of the DAS, DAS28, SDAI and CDAI. *Joint Bone Spine* 79(2):149-55.
- Ghasemi-Rad M, Attaya H, Lesha E, Vegh A, Maleki-Miandoab T, Nosair E, Sepehrvand N, Davarian A, Rajebi H, Pakniat A, et al. 2015. Ankylosing spondylitis: A state of the art factual backbone. *World Journal of Radiology* 7(9):236-52.
- Goie The HS, Steven MM, van der Linden SM, Cats A. 1985. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: A comparison of the rome, new york and modified new york criteria in patients with a positive clinical history screening test for ankylosing spondylitis. *Br J Rheumatol* 24(3):242-9.
- González-Fernández MÁ, Moreno-Ramos F, Varela-Hugo A, Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Herranz Pinto P, Herrero Ambrosio A. 2015. Anti-TNF dose and anti-drug antibody levels in rheumatic and psoriasis patients: Economic repercussion. 17:95-104.
- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435(7042):590-7.
- Gordon KB, Duffin KC, Bissonnette R, Prinz JC, Wasfi Y, Li S, Shen Y, Szapary P, Randazzo B, Reich K. 2015. A phase 2 trial of guselkumab versus adalimumab for plaque psoriasis. *N Engl J Med* 373(2):136-44.
- Gottlieb AB, Kang S, Linden KG, Lebwohl M, Menter A, Abdulghani AA, Goldfarb M, Chieffo N, Totoritis MC. 2004. Evaluation of safety and clinical activity of multiple doses of the anti-CD80 monoclonal antibody, galiximab, in patients with moderate to severe plaque psoriasis. *Clinical Immunology* 111(1):28-37.
- Gottlieb AB, Khandke L, Krane JF, Staianocoico L, Ashinoff R, Krueger JG. 1992. Anthralin decreases keratinocyte tgf-alpha expression and egf-receptor binding invitro. *J Invest Dermatol* 98(5):680-5.
- Grabar P. 1983. Autoantibodies and the physiological-role of immunoglobulins. *Immunol Today* 4(12):337-40.
- Green MS, Prystowsky JH, Cohen SR, Cohen JI, Lebwohl MG. 1996. Infectious complications of erythrodermic psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 34(5):911-4.

- Griffiths TW, Griffiths CEM, Voorhees JJ. 1995. Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol Clin* 13(4):739.
- Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelliperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. 1989. Interleukin-6 is expressed in high-levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(16):6367-71.
- Gu X, Nylander E, Coates PJ, Nylander K. 2015. Oxidation reduction is a key process for successful treatment of psoriasis by narrow-band UVB phototherapy. *Acta Derm Venereol* 95(2):140-6.
- Gudjonsson JE, Thorarinsson AM, Sigurgeirsson B, Kristinsson KG, Valdimarsson H. 2003. Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: A prospective study. *Br J Dermatol* 149(3):530-4.
- Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. 1999. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol* 117(3):580-6.
- Gupta R, Debbaneh M, Butler D, Huynh M, Levin E, Leon A, Koo J, Liao W. 2013. The goeckerman regimen for the treatment of moderate to severe psoriasis. *Jove-Journal of Visualized Experiments* (77):UNSP e50509.
- Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, Kawabata T, Kelley M, Mire-Sluis AR, Richards SM, Rup B, Shores E, Swanson SJ, et al. 2007. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. *J Immunol Methods* 321(1-2):1-18.
- Hart FD and Golding JR. 1960. Rheumatoid neuropathy. *Br Med J* 1(MAY28):1594-600.
- Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink G, Killestein J, de Groot ER, Aarden LA, Rispens T. 2011. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J Immunol Methods* 372(1-2):196-203.
- Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M. 1991. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid-arthritis - regulation by tumor-necrosis-factor-alpha. *Eur J Immunol* 21(10):2575-9.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265(3):621-36.
- Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, Chamian F, Gordon D, Heffernan M, Daw JAW, Robarge J, Ott J, et al. 2003. A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* 35(4):349-56.
- Hoekman DR, Lowenberg M, Mathot RA, D'Haens GR. 2015. Non-trough IFX concentrations reliably predict trough levels and accelerate dose-adjustment in crohn's disease. *Gastroenterology* 148(4):S107-.

- Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, Debruyjn J, Strober S. 1989. Isolation of Cd4- Cd8- mycobacteria-reactive lymphocyte-T clones from rheumatoid-arthritis synovial-fluid. *Nature* 339(6221):226-9.
- Hughes J and Rustin M. 1997. Corticosteroids. *Clin Dermatol* 15(5):715-21.
- Hunter HJA, Griffiths CEM, Kleyn CE. 2013. Does psychosocial stress play a role in the exacerbation of psoriasis? *Br J Dermatol* 169(5):965-74.
- Inman RD, Davis JC,Jr., van der Heijde D, Dickman L, Sieper J, Kim SI, Mack M, Han J, Visvanathan S, Xu Z, et al. 2008. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum* 58(11):3402-12.
- Iwasaki A and Medzhitov R. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327(5963):291-5.
- Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson JE, Aphale A, Sigmarsdottir AA, Gunnarsson SI, Steinsson JT, Elder JT, Valdimarsson H. 2008. Obesity in psoriasis: Leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* 159(2):342-50.
- Jordan CT, Cao L, Roberson EDO, Pierson KC, Yang C, Joyce CE, Ryan C, Duan S, Helms CA, Liu Y, et al. 2012. PSORS2 is due to mutations in CARD14. *Am J Hum Genet* 90(5):784-95.
- Kanda N and Watanabe S. 2002. Substance P enhances the production of interferon-induced protein of 10 kDa by human keratinocytes in synergy with interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 119(6):1290-7.
- Kaneko A, Kida D, Saito K, Tsukamoto M, Sato T. 2012. Clinical results for tocilizumab over one year in the clinical setting as assessed by CDAI (clinical disease activity index): CRP at week 12 and MMP-3 at week 24 are predictive factors for CDAI. *Rheumatol Int* 32(11):3631-7.
- Kang S, Yi S, Griffiths CEM, Fancher L, Hamilton TA, Choi JH. 1998. Calcipotriene-induced improvement in psoriasis is associated with reduced interleukin-8 and increased interleukin-10 levels within lesions. *Br J Dermatol* 138(1):77-83.
- Karlson EW, Ding B, Keenan BT, Liao K, Costenbader KH, Klareskog L, Alfredsson L, Chibnik LB. 2013. Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research* 65(7):1147-56.
- Karrow NA, You Q, McNicoll C, Hay J. 2010. Activation of the ovine hypothalamic-pituitary-adrenal axis and febrile response by interleukin-6: A comparative study with bacterial lipopolysaccharide endotoxin. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* 74(1):30-3.

- Kato K, Umeda U, Suzuki F, Hayashi D, Kosaka A. 1979. Use of antibody fab fragments to remove interference by rheumatoid factors with the enzyme-linked sandwich immunoassay. *FEBS Lett* 102(2):253-6.
- Kavanaugh A, McInnes I, Mease P, Krueger GG, Gladman D, Gomez-Reino J, Papp K, Zrubek J, Mudivarthi S, Mack M, et al. 2009. Golimumab, a new human tumor necrosis factor alpha antibody, administered every four weeks as a subcutaneous injection in psoriatic arthritis twenty-four-week efficacy and safety results of a randomized, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 60(4):976-86.
- Kay J, Matteson EL, Dasgupta B, Nash P, Durez P, Hall S, Hsia EC, Han J, Wagner C, Xu Z, et al. 2008. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis despite treatment with methotrexate. *Arthritis Rheum* 58(4):964-75.
- Keystone EC, Genovese MC, Klareskog L, Hsia EC, Hall ST, Miranda PC, Pazdur J, Bae S-, Palmer W, Zrubek J, et al. 2009. Golimumab, a human antibody to tumour necrosis factor alpha given by monthly subcutaneous injections, in active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy: The GO-FORWARD study. *Ann Rheum Dis* 68(6):789-96.
- Khanna D, Oh M, Furst DE, Ranganath V, Gold RH, Sharp JT, Park GS, Keystone EC, Paulus HE, W Consortium Practicing. 2007. Evaluation of the preliminary definitions of minimal disease activity and remission in an early seropositive rheumatoid arthritis cohort. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 57(3):440-7.
- Kimball AB, Papp KA, Wasfi Y, Chan D, Bissonnette R, Sofen H, Yeilding N, Li S, Szapary P, Gordon KB, et al. 2013. Long-term efficacy of ustekinumab in patients with moderate-to-severe psoriasis treated for up to 5 years in the PHOENIX 1 study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 27(12):1535-45.
- Kimura A and Kishimoto T. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40(7):1830-5.
- Kirkham BW, Wasko MC, Hsia EC, Fleischmann RM, Genovese MC, Matteson EL, Liu H, Rahman MU. 2014. Effects of golimumab, an anti-tumour necrosis factor-alpha human monoclonal antibody, on lipids and markers of inflammation. *Ann Rheum Dis* 73(1):161-9.
- Kishimoto T. 2006. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Research & Therapy* 8:S2.
- Klaasen R, Wijbrandts CA, Gerlag DM, Tak PP. 2011. Body mass index and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 63(2):359-64.
- Kneepkens EL, Krieckaert CLM, van der Kleij D, Nurmohamed MT, van der Horst-Bruinsma IE, Rispen T, Wolbink GJ. 2015. Lower etanercept levels are associated with high disease activity in ankylosing spondylitis patients at 24 weeks of follow-up. *Ann Rheum Dis* 74(10):1825-9.

- Kneepkens EL, Plasencia C, Krieckaert CLM, Pascual-Salcedo D, van der Kleij D, Nurmohamed MT, Teresa Lopez-Casla M, Wieringa R, Rispens T, Wolbink G. 2014. Golimumab trough levels, antidrug antibodies and clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated in daily clinical practice. *Ann Rheum Dis* 73(12):2217-U225.
- Kneepkens EL, van den Oever I, Plasencia CH, Pascual-Salcedo D, de Vries A, Hart M, Nurmohamed MT, Balsa A, Rispens T, Wolbink G. 2017. Serum tocilizumab trough concentration can be used to monitor systemic IL-6 receptor blockade in patients with rheumatoid arthritis: a prospective observational cohort study. *Scand J Rheumatol* 46(2):87-94.
- Koga M, Yuki N, Takahashi M, Saito K, Hirata K. 1998. Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent campylobacter jejuni infection in guillain-barre and fisher's syndromes. *J Neuroimmunol* 81(1-2):138-43.
- Kohem CL, Brezinschek RI, Wisbey H, Tortorella C, Lipsky PE, OppenheimerMarks N. 1996. Enrichment of differentiated CD45RB(dim),CD27- memory T cells in the peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39(5):844-54.
- Korhonen R and Moilanen E. 2009. Abatacept, a novel CD80/86-CD28 T cell co-stimulation modulator, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104(4):276-84.
- Korswagen LA, Bartelds GM, Krieckaert CLM, Turkstra F, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Wijbrandts CA, Tak PP, Lems WF, Dijkmans BAC, et al. 2011. Venous and arterial thromboembolic events in adalimumab-treated patients with antiadalimumab antibodies. *Arthritis Rheum* 63(4):877-83.
- Kosmac M, Avcin T, Toplak N, Simonini G, Cimaz R, Serbec VC. 2011. Exploring the binding sites of anti-infliximab antibodies in pediatric patients with rheumatic diseases treated with infliximab. *Pediatr Res* 69(3):243-8.
- Koutruba N, Emer J, Lebwohl M. 2010. Review of ustekinumab, an interleukin-12 and interleukin-23 inhibitor used for the treatment of plaque psoriasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 6:123-41.
- Kreuwel HTC, Morgan DJ, Krahl T, Ko A, Sarvetnick N, Sherman LA. 1999. Comparing the relative role of perforin/granzyme versus Fas/Fas ligand cytotoxic pathways in CD8(+) T cell-mediated insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Immunology* 163(8):4335-41.
- Krieckaert C, Nair SC, Nurmohamed MT, van Dongen CJ, Lems WF, Lafeber FP, Bijlsma JW, Wolbink G, Welsing PM. 2012. Evaluating the cost-effectiveness of personalized treatment with adalimumab using serum drug level and anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis* 71(Suppl3):104.

- Krieckaert CLM, Nair SC, Nurmohamed MT, van Dongen CJJ, Lems WF, Lafeber FPIG, Bijlsma JWJ, Koffijberg H, Wolbink G, Welsing PMJ. 2015. Personalised treatment using serum drug levels of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis: An evaluation of costs and effects. *Ann Rheum Dis* 74(2):361-8.
- Kroll MH and Elin RJ. 1994. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 40(11):1996-2005.
- Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Heftler NS, Austin LM, Gottlieb AB. 1995. Successful ultraviolet-B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T-cells. *J Exp Med* 182(6):2057-68.
- Kupper TS. 2003. Immunologic targets in psoriasis. *N Engl J Med* 349(21):1987-90.
- Laine J, Jokiranta TS, Eklund KK, Vakevainen M, Puolakka K. 2016. Cost-effectiveness of routine measuring of serum drug concentrations and anti-drug antibodies in treatment of rheumatoid arthritis patients with TNF-alpha blockers. *Biologics : Targets & Therapy* 10:67-73.
- Lallemand C, Kavrochorianou N, Steenholdt C, Bendtzen K, Ainsworth MA, Meritet J, Blanchard B, Lebon P, Taylor P, Charles P, et al. 2011. Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF alpha antagonists. *J Immunol Methods* 373(1-2):229-39.
- Landewé R and van der Heijde D. 2005. Radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 23(5):S63-8.
- Landewé R, van der Heijde D, van der Linden S, Boers M. 2006. Twenty-eight-joint counts invalidate the DAS28 remission definition owing to the omission of the lower extremity joints: A comparison with the original DAS remission. *Ann Rheum Dis* 65(5):637-41.
- Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, Reich K, Griffiths CEM, Papp K, Puig L, Nakagawa H, Spelman L, Sigurgeirsson B, et al. 2014. Secukinumab in plaque psoriasis - results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* 371(4):326-38.
- Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary PO, Wasfi Y, Chan D, Hsu MC, You Y, Poulin Y, Korman N, et al. 2015. Long-term efficacy and safety of ustekinumab, with and without dosing adjustment, in patients with moderate-to-severe psoriasis: Results from the PHOENIX 2 study through 5 years of follow-up. *Br J Dermatol* 172(5):1371-83.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201(2):233-40.
- Larsen MH, Hagen KB, Krogstad A, Aas E, Wahl AK. 2014. Limited evidence of the effects of patient education and self-management interventions in psoriasis patients: A systematic review. *Patient Educ Couns* 94(2):158-69.

- Larsson A, Karlssonparra A, Sjoquist J. 1991. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 37(3):411-4.
- Lawrence N, Oger J, Aziz T, Palace J, Vincent A. 2003. A sensitive radioimmunoprecipitation assay for assessing the clinical relevance of antibodies to IFN beta. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 74(9):1236-9.
- Lebwohl M, Tying SK, Hamilton TK, Toth D, Glazer S, Tawfik NH, Walicke P, Dummer W, Wang X, Garovoy MR, et al. 2003. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med* 349(21):2004-13.
- Lebwohl M. 2003. Psoriasis. *Lancet* 361(9364):1197-204.
- Leonardi C, Matheson R, Zachariae C, Cameron G, Li L, Edson-Heredia E, Braun D, Banerjee S. 2012. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. *N Engl J Med* 366(13):1190-9.
- Li J, Schantz A, Schwegler M, Shankar G. 2011. Detection of low-affinity anti-drug antibodies and improved drug tolerance in immunogenicity testing by octet (R) biolayer interferometry. *J Pharm Biomed Anal* 54(2):286-94.
- Liu J, Yeh H, Liu S, Chen K. 2014. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World Journal of Orthopedics* 5(4):537-43.
- Llinares-Tello F, Gomez de Salazar JR, Senabre Gallego JM, Santos Soler G, Santos Ramirez C, Salas Heredia E, Molina Garcia J. 2012. Analytical and clinical evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of infliximab and adalimumab. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 50(10):1845-7.
- Lo B, Swafford ADE, Shafer-Weaver KA, Jerome LF, Rakhlin L, Mathern DR, Callahan CA, Jiang P, Davison LJ, Stevens HE, et al. 2011. Antibodies against insulin measured by electrochemiluminescence predicts insulinitis severity and disease onset in non-obese diabetic mice and can distinguish human type 1 diabetes status. *Journal of Translational Medicine* 9:203.
- Lukas C, Landewé R, Sieper J, Dougados M, Davis J, Braun J, van der Linden S, van der Heijde D, Assessment SpondyloArthritis Int S. 2009. Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 68(1):18-24.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 43(1):30-7.
- Machado P, Landewé R, Lie E, Kvien TK, Braun J, Baker D, van der Heijde D, Assessment SpondyloArthritis Int Soc. 2011. Ankylosing spondylitis disease activity score (ASDAS): Defining cut-off values for disease activity states and improvement scores. *Ann Rheum Dis* 70(1):47-53.

- Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K. 1997. HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol* 109(2):183-6.
- Manolagas SC, Provedini DM, Tsoukas CD. 1985. Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin-D3 and the immune-system. *Mol Cell Endocrinol* 43(2-3):113-22.
- Martin A, Gutierrez E, Muglia J, McDonald CJ, Guzzo C, Gottlieb A, Pappert A, Garland WT, Bagel J, Bacha P. 2001. A multicenter dose-escalation trial with denileukin difitox (ONTAK, DAB(389) IL-2) in patients with severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 45(6):871-81.
- Martin S, Ruiz del Agua A, Torres N, Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ruiz-Argueello B, Martinez A, Navarro R, Nagore D. 2015. Comparison study of two commercially available methods for the determination of golimumab and anti-golimumab antibody levels in patients with rheumatic diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53(11):E297-9.
- McGill A, Frank A, Emmett N, Leech SN, Turnbull DM, Birch-Machin MA, Reynolds NJ. 2005. The antipsoriatic drug anthralin accumulates in keratinocyte mitochondria, dissipates mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis through a pathway dependent on respiratory competent mitochondria. *Faseb Journal* 19(3):1012-1014.
- Melski JW, Tanenbaum L, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Bleich HL. 1989. Oral methoxsalen photochemotherapy for the treatment of psoriasis: A cooperative clinical trial. 1977. *J Invest Dermatol* 92(4 Suppl):154S-6S.
- Menting SP, Coussens E, Pouw MF, van den Reek JMPA, Temmerman L, Boonen H, de Jong EGJ, Spuls PI, Lambert J. 2015b. Developing a therapeutic range of adalimumab serum concentrations in management of psoriasis A step toward personalized treatment. *Jama Dermatology* 151(6):616-22.
- Menting SP, Dekker PM, Limpens J, Hooft L, Spuls PI. 2016. Methotrexate dosing regimen for plaque-type psoriasis: A systematic review of the use of test-dose, start-dose, dosing scheme, dose adjustments, maximum dose and folic acid supplementation. *Acta Derm Venereol* 96(1):23-8.
- Menting SP, Van den Reek JMPA, Baerveldt EM, De Jong EMGJ, Prens EP, Lecluse LLA, Wolbink GJ, Van der Kleij D, Spuls PI, Rispens T. 2015a. The correlation of clinical efficacy, serum trough levels and antidrug antibodies in ustekinumab-treated patients with psoriasis in a clinical-practice setting. *Br J Dermatol* 173(3):855-7.
- Mimori T. 2005. Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. *Internal Medicine* 44(11):1122-6.
- Modi NB. 1994. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant proteins and peptides. *J Controlled Release* 29(3):269-81.

- Moore AY and Richardson BS. 2010. Long-term use of adalimumab in the treatment of moderate to severe plaque psoriasis: A review of the literature. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 3:49-58.
- Moreland LW. 2004. Drugs that block tumour necrosis factor: Experience in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics* 22(2):39-53.
- Naldi L and Mercuri SR. 2009. Smoking and psoriasis: From epidemiology to pathomechanisms. *J Invest Dermatol* 129(12):2741-3.
- Namazi MR. 2004. Paradoxical exacerbation of psoriasis in AIDS: Proposed explanations including the potential roles of substance P and gram-negative bacteria. *Autoimmunity* 37(1):67-71.
- Narbutt J, Olejniczak I, Sobolewska-Sztychny D, Sysa-Jedrzejowska A, Slowik-Kwiatkowska I, Hawro T, Lesiak A. 2013. Narrow band ultraviolet B irradiations cause alteration in interleukin-31 serum level in psoriatic patients. *Arch Dermatol Res* 305(3):191-5.
- Nataraj AJ, Wolf P, Cerroni L, Ananthaswamy HN. 1997. p53 mutation in squamous cell carcinomas from psoriasis patients treated with psoralen plus UVA (PUVA). *J Invest Dermatol* 109(2):238-43.
- Nawroth PP, Bank I, Handley D, Cassimeris J, Chess L, Stern D. 1986. Tumor necrosis Factor/cachectin interacts with endothelial-cell receptors to induce release of interleukin-1. *J Exp Med* 163(6):1363-75.
- Nell VPK, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. 2004. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 43(7):906-14.
- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113(9):1271-6.
- Nikkari S, Roivainen A, Hannonen P, Mottonen T, Luukkainen R, Ylijama T, Toivanen P. 1995. Persistence of parvovirus B19 in synovial-fluid and bone-marrow. *Ann Rheum Dis* 54(7):597-600.
- Oezemir M, Engin B, Baysal I, Mevlitoglu I. 2008. A randomized comparison of acitretin-narrow-band TL-01 phototherapy and acitretin-psoralen plus ultraviolet A for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 88(6):589-93.
- Ollier WER and Macgregor A. 1995. Genetic epidemiology of rheumatoid disease. *Br Med Bull* 51(2):267-85.
- Osborne RH, Elsworth GR, Whitfield K. 2007. The health education impact questionnaire (heiQ): An outcomes and evaluation measure for patient education and self-management interventions for people with chronic conditions. *Patient Educ Couns* 66(2):192-201.

- Osmancevic A, Nilsen LT, Landin-Wilhelmsen K, Soyland E, Torjesen PA, Hagve TA, Nenseter MS, Kroghstad AL. 2009. Effect of climate therapy at gran canaria on vitamin D production, blood glucose and lipids in patients with psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 23(10):1133-40.
- Owen CM, Chalmers RJ, O'Sullivan T, Griffiths CE. 2000. Antistreptococcal interventions for guttate and chronic plaque psoriasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* (2):CD001976-.
- Papp K, Barber K, Bissonnette R, Bourcier M, Lynde CW, Poulin Y, Shelton J, Toole J, Vieira A, Poulin-Costello M. 2015b. A randomized, blinded assessor study to evaluate the efficacy and safety of etanercept 50 mg once weekly plus as needed topical agent vs. etanercept 50 mg twice weekly in patients with moderate to severe plaque psoriasis (REFINE). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 29(2):361-6.
- Papp K, Thaci D, Reich K, Riedl E, Langley RG, Krueger JG, Gottlieb AB, Nakagawa H, Bowman EP, Mehta A, et al. 2015a. Tildrakizumab (MK-3222), an anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody, improves psoriasis in a phase IIb randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 173(4):930-9.
- Papp KA, Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary P, Yeilding N, Guzzo C, Hsu M, Wang Y, Li S, et al. 2008. Efficacy and safety of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with psoriasis: 52-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial (PHOENIX 2). *Lancet* 371(9625):1675-84.
- Papp KA, Leonardi C, Menter A, Ortonne J, Krueger JG, Kricorian G, Aras G, Li J, Russell CB, Thompson EH, et al. 2012. Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis. *N Engl J Med* 366(13):1181-9.
- Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM, Identification Management. 2013. Global epidemiology of psoriasis: A systematic review of incidence and prevalence. *J Invest Dermatol* 133(2):377-85.
- Parker AR, Lock E, Iftikhar A, Barber R, Stubbs PD, Harding S, Wallis GLF. 2016. Purification and characterisation of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgG immunoglobulins. *Clinical Biochemistry* 50 (2017) 80–83.
- Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Jurado T, González del Valle L, Sabina P, Diego C, Villalba A, Bonilla G, Martínez-Feito A, Martín Mola E, et al. 2015. Dose-tapering of TNF inhibitors in daily rheumatology practice enables the maintenance of clinical efficacy while improving cost-effectiveness. *J Pharmacovigilance* 3: 172. doi:10.4172/2329-6887.1000172.
- Pascual-Salcedo D, Plasencia C, Ramiro S, Nuno L, Bonilla G, Nagore D, Ruiz del Agua A, Martínez A, Aarden L, Martín-Mola E, et al. 2011. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 50(8):1445-52.

- Patton A, Mullenix MC, Swanson SJ, Koren E. 2005. An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *J Immunol Methods* 304(1-2):189-95.
- Pillai S and Bikle DD. 1991. Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes - differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin-D3. *J Cell Physiol* 146(1):94-100.
- Pincelli C, Sevigani C, Manfredini R, Grande A, Fantini F, Braccilaudiero L, Aloe L, Ferrari S, Cossarizza A, Giannetti A. 1994. Expression and function of nerve growth-factor and nerve growth-factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103(1):13-8.
- Piskin G, Sylva-Steenland RMR, Bos JD, Teunissen MBM. 2006. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: Enhanced expression in psoriatic skin. *Journal of Immunology* 176(3):1908-15.
- Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Gema Bonilla M, Nuno L, Ruiz A, Martin-Mola E, Balsa A. 2011. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with infliximab in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 63(10):S1036-7.
- Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Nuno L, Bonilla G, Villalba A, Peiteado D, Diez J, Nagore D, Ruiz del Agua A, Moral R, et al. 2012. Influence of immunogenicity on the efficacy of longterm treatment of spondyloarthritis with infliximab. *Ann Rheum Dis* 71(12):1955-60.
- Pollard KM and Kono DH. 2013. Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity. *Bmc Medicine* 11:100.
- Pouw MF, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van der Kleij D, Aarden L, Rispens T, Wolbink G. 2015. Key findings towards optimising adalimumab treatment: The concentration-effect curve. *Ann Rheum Dis* 74(3):513-8.
- Prescott R, Nakai H, Saenko EL, Scharrer I, Nilsson IM, Humphries JE, Hurst D, Bray G, Scandella D. 1997. The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII autoantibodies. *Blood* 89(10):3663-71.
- Racz E, Prens EP, Kurek D, Kant M, de Ridder D, Mourits S, Baerveldt EM, Ozgur Z, van IJcken WFJ, Laman JD, et al. 2011. Effective treatment of psoriasis with narrow-band UVB phototherapy is linked to suppression of the IFN and Th17 pathways. *J Invest Dermatol* 131(7):1547-58.
- Rahman P and Elder JT. 2012. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: A report from the GRAPPA 2010 annual meeting. *J Rheumatol* 39(2):431-3.
- Ramos PS, Shedlock AM, Langefeld CD. 2015. Genetics of autoimmune diseases: Insights from population genetics. *J Hum Genet* 60(11):657-64.

- Rappersberger K, Komar M, Ebelin ME, Scott G, Burtin P, Greig G, Kehren J, Chibout SD, Cordier A, Holter W, et al. 2002. Pimecrolimus identifies a common genomic anti-inflammatory profile, is clinically highly effective in psoriasis and is well tolerated. *J Invest Dermatol* 119(4):876-87.
- Rather LJ. 1971. Disturbance of function (functio-laesa) - legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by galen to 4 cardinal signs of celsus. *Bull N Y Acad Med* 47(3):303-22.
- Raychaudhuri SP, Jiang W, Raychaudhuri SK. 2008. Revisiting the koebner phenomenon - role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. *Am J Pathol* 172(4):961-71.
- Raza K, Buckley CE, Salmon M, Buckley CD. 2006. Treating very early rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research in Clinical Rheumatology* 20(5):849-63.
- Reddy M, Davis C, Wong J, Marsters P, Pendley C, Prabhakar U. 2007. Modulation of CLA, IL-12R, CD40L, and IL-2R alpha expression and inhibition of IL-12- and IL-23-induced cytokine secretion by CNTO 1275. *Cell Immunol* 247(1):1-11.
- Reeves WG, Gelsthorpe K, Vanderminne P, Torensma R, Tattersall RB. 1984. Hla phenotype and insulin antibody-production. *Clin Exp Immunol* 57(2):443-8.
- Rispens T, van Leeuwen A, Vennegoor A, Killestein J, Aalberse RC, Wolbink GJ, Aarden LA. 2011. Measurement of serum levels of natalizumab, an immunoglobulin G4 therapeutic monoclonal antibody. *Anal Biochem* 411(2):271-6.
- Ritchlin C, Rahman P, Kavanaugh A, McInnes IB, Puig L, Li S, Wang Y, Shen Y, Doyle MK, Mendelsohn AM, et al. 2014. Efficacy and safety of the anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, ustekinumab, in patients with active psoriatic arthritis despite conventional non-biological and biological anti-tumour necrosis factor therapy: 6-month and 1-year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled, randomised PSUMMIT 2 trial. *Ann Rheum Dis* 73(6):990-9.
- Robinson RT. 2015. IL12R beta 1: The cytokine receptor that we used to know. *Cytokine* 71(2):348-59.
- Rojas JR, Taylor RP, Cunningham MR, Rutkoski TJ, Vennarini J, Jang HS, Graham MA, Geboes K, Rousselle SD, Wagner CL. 2005. Formation, distribution, and elimination of infliximab and anti-infliximab immune complexes in cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 313(2):578-85.
- Rosas J, Llinares-Tello F, de la Torre I, Santos-Ramirez C, Senabre-Gallego JM, Valor L, Barber-Valles X, Hernandez-Florez D, Santos-Soler G, Salas-Heredia E, et al. 2014a. Clinical relevance of monitoring serum levels of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in daily practice. *Clin Exp Rheumatol* 32(6):942-8.
- Rossini M, Viapiana O, Orsolini G, Fracassi E, Idolazzi L, Gatti D, Adami S, Govoni M. 2015. Why golimumab in the treatment of psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis? *Reumatismo* 66(4):285-303.

- Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. 1989. Susceptibility to rheumatoid-arthritis maps to a T-cell epitope shared by the hla-Dw4 dr beta-1 chain and the epstein-barr virus glycoprotein Gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(13):5104-8.
- Rubin RL, Bell SA, Burlingame RW. 1992. Autoantibodies associated with lupus induced by diverse drugs target a similar epitope in the (H2a-H2b)-dna complex. *J Clin Invest* 90(1):165-73.
- Rubio-Terres C, Ordovas Baines JP, Pla Poblador R, Martinez Nieto C, Sanchez Garre MJ, Rosado Souviron MA, Sierra Munoz A, Sanchez Mateo M, Grupo de Investigadores del Estudio PRAXIS. 2007. Use and cost of biological disease-modifying anti-rheumatic drugs in Spain (PRAXIS study). *Farmacia Hospitalaria : Organo Oficial De Expresion Cientifica De La Sociedad Espanola De Farmacia Hospitalaria* 31(2):78-92.
- Russo I, Del Mese P, Viretto M, Doronzo G, Mattiello L, Trovati M, Aniozzi G. 2008. Sodium azide, a bacteriostatic preservative contained in commercially available laboratory reagents, influences the responses of human platelets via the eGMP/PKG/VASP pathway. *Clin Biochem* 41(4-5):343-9.
- Ryan C, Leonardi CL, Krueger JG, Kimball AB, Strober BE, Gordon KB, Langley RG, de Lemos JA, Daoud Y, Blankenship D, et al. 2011. Association between biologic therapies for chronic plaque psoriasis and cardiovascular events A meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama-Journal of the American Medical Association* 306(8):864-71.
- Rysnik O, McHugh K, van Duivenvoorde L, van Tok M, Guggino G, Taurog J, Kollnberger S, Ciccia F, Baeten D, Bowness P. 2016. Non-conventional forms of HLA-B27 are expressed in spondyloarthritis joints and gut tissue. *J Autoimmun* 70:12-21.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, Scherl E, Fleisher MR, Katz S, Johanns J, Blank M, Rutgeerts P, Ustekinumab Crohns Dis Study Grp. 2008. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 135(4):1130-41.
- Saraceno R, Saggini A, Pietroleonardo L, Chimenti S. 2009. Infliximab in the treatment of plaque type psoriasis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 2:27-37.
- Saroux A, Gossec L, Goupille P, Bregman B, Boccard E, Dupont D, Beresniak A. 2010. Cost-effectiveness modelling of biological treatment sequences in moderate to severe rheumatoid arthritis in France. *Rheumatology* 49(4):733-40.
- Sayah A and English JC. 2005. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. *J Am Acad Dermatol* 53(2):191-209.
- Schellekens H. 2002. Immunogenicity of therapeutic proteins: Clinical implications and future prospects. *Clin Ther* 24(11):1720-40.

- Schempp CM, Dittmar HC, Hummler D, Simon-Haarhaus B, Schulte-Monting J, Schopf E, Simon JC. 2000. Magnesium ions inhibit the antigen-presenting function of human epidermal langerhans cells in vivo and in vitro, involvement of ATPase, HLA-DR, B7 molecules, and cytokines. *J Invest Dermatol* 115(4):680-6.
- Scott FI and Lichtenstein GR. 2016. Advances in therapeutic drug monitoring of biologic therapies in inflammatory bowel disease: 2015 in review. *Current Treatment Options in Gastroenterology* 14(1):91-102.
- Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH, Ustekinumab MS Investigators. 2008. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 P40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurology* 7(9):796-804.
- Senabre-Gallego JM, Santos-Ramirez C, Santos-Soler G, Salas-Heredia E, Sanchez-Barrioluengo M, Barber X, Rosas J, AIRE-MB Grp. 2013. Long-term safety and efficacy of etanercept in the treatment of ankylosing spondylitis. *Patient Preference and Adherence* 7:961-72.
- Sharp JT, Lidsky MD, Collins LC, Moreland J. 1971. Methods of scoring progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis - correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum* 14(6):706-20.
- Shealy D, Cai A, Staquet K, Baker A, Lacy ER, Johns L, Vafa O, Gunn G,III, Tam S, Sague S, et al. 2010. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor alpha. *Mabs* 2(4):428-39.
- Sigaux J, Hamze M, Daien C, Morel J, Krzysiek R, Pallardy M, Maillere B, Mariette X, Miceli-Richard C. 2017. Immunogenicity of tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*.84(1):39-45.
- Silman AJ, Macgregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WER. 1993. Twin concordance rates for rheumatoid-arthritis - results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32(10):903-7.
- Smith G. 1985. Filamentous fusion phage - novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705):1315-7.
- Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, Kvien TK, Navarro-Compan MV, Oliver S, Schoels M, et al. 2016. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis* 75(1):3-15.
- Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, van Riel PL, Tugwell P. 2003. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology* 42(2):244-57.

- Smolen JS, Kay J, Doyle M, Landewé R, Matteson EL, Gaylis N, Wollenhaupt J, Murphy FT, Xu S, Zhou Y, et al. 2015. Golimumab in patients with active rheumatoid arthritis after treatment with tumor necrosis factor a inhibitors: Findings with up to five years of treatment in the multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 GO-AFTER study. *Arthritis Research & Therapy* 17:14.
- Snowden JA and Heaton DC. 1997. Development of psoriasis after syngeneic bone marrow transplant from psoriatic donor: Further evidence for adoptive autoimmunity. *Br J Dermatol* 137(1):130-2.
- Sokolove J, Bromberg R, Deane KD, Lahey LJ, Derber LA, Chandra PE, Edison JD, Gilliland WR, Tibshirani RJ, Norris JM, et al. 2012. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *Plos One* 7(5):e35296.
- Song YW and Kang EH. 2010. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *Qjm-an International Journal of Medicine* 103(3):139-46.
- Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OO, Ainsworth MA. 2014a. Clinical implications of measuring drug and anti-drug antibodies by different assays when optimizing infliximab treatment failure in crohn's disease: Post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 109(7):1055-64.
- Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OO, Ainsworth MA. 2011. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 46(3):310-8.
- Steenholdt C, Brynskov J, Thomsen OO, Munck LK, Fallingborg J, Christensen LA, Pedersen G, Kjeldsen J, Jacobsen BA, Oxholm AS, et al. 2014b. Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with crohn's disease who lose response to anti-TNF treatment: A randomised, controlled trial. *Gut* 63(6):919-27.
- Stern RS, Nichols KT, Vakeva LH. 1997. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). *N Engl J Med* 336(15):1041-5.
- Stubenrauch K, Wessels U, Birnboeck H, Ramirez F, Jahreis A, Schleypen J. 2010. Subset analysis of patients experiencing clinical events of a potentially immunogenic nature in the pivotal clinical trials of tocilizumab for rheumatoid arthritis: Evaluation of an antidrug antibody ELISA using clinical adverse event-driven immunogenicity testing. *Clin Ther* 32(9):1597-609.
- Suda T. 2015. Up-to-date information on rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Clinical Medicine Insights.Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine* 9(Suppl 1):155-62.
- Tacey R, Greway A, Smiell J, Power D, Kromminga A, Daha M, Casadevall N, Kelley M. 2003. The detection of anti-erythropoietin antibodies in human serum and plasma - part I. validation of the protocol for a radioimmunoprecipitation assay. *J Immunol Methods* 283(1-2):317-29.

- Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, et al. 1993. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24):11924-8.
- Tanaka T and Kishimoto T. 2012. Targeting interleukin-6: All the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *International Journal of Biological Sciences* 8(9):1227-36.
- Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. 2012. Interleukin-23: As a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology* 135(2):112-24.
- Tatarewicz S, Miller JM, Swanson SJ, Moxness MS. 2010. Rheumatoid factor interference in immunogenicity assays for human monoclonal antibody therapeutics. *J Immunol Methods* 357(1-2):10-6.
- Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, CASPAR Study Group. 2006. Classification criteria for psoriatic arthritis - development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum* 54(8):2665-73.
- Tetta C, Camussi G, Modena V, Divittorio C, Baglioni C. 1990. Tumor-necrosis-factor in serum and synovial-fluid of patients with active and severe rheumatoid-arthritis. *Ann Rheum Dis* 49(9):665-7.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117(2):244-79.
- Tsai T, Ho J, Song M, Szapary P, Guzzo C, Shen Y, Li S, Kim K, Kim T, Choi J, et al. 2011. Efficacy and safety of ustekinumab for the treatment of moderate-to-severe psoriasis: A phase III, randomized, placebo-controlled trial in taiwanese and korean patients (PEARL). *J Dermatol Sci* 63(3):154-63.
- Tsankov N, Angelova I, Kazandjieva J. 2000. Drug-induced psoriasis. recognition and management. *American Journal of Clinical Dermatology* 1(3):159-65.
- Urmann M, Graalfs H, Joehnck M, Jacob LR, Frech C. 2010. Cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies characterization of a novel stationary phase designed for production-scale purification. *Mabs* 2(4):395-404.
- Vaidya HC, Wolf BA, Garrett N, Catalona WJ, Clayman RV, Nahm MH. 1988. Extremely high values of prostate-specific antigen in patients with adenocarcinoma of the prostate - demonstration of the hook effect. *Clin Chem* 34(10):2175-7.
- van der Helm-van Mil, Annette H.M. and Huizinga TWJ. 2012. The 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis: Do they affect the classification or diagnosis of rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 71(10):1596-8.

- van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, van Walsum MS, de Groot ER, Wolbink G, Dijkmans BAC, Aarden LA. 2007. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66(2):253-6.
- Van Parijs L and Abbas AK. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: Turning lymphocytes off. *Science* 280(5361):243-8.
- van Schouwenburg PA, Bartelds GM, Hart MH, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. 2010. A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals "hidden" immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods* 362(1-2):82-8.
- van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EEL, Kruihof S, de Groot E, Hart M, van Ham SM, Rispens T, Aarden L, et al. 2013. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann Rheum Dis* 72(1):104-9.
- Vande Castele N, Ferrante M, Van Assche G, Ballet V, Compernelle G, Van Steen K, Simoens S, Rutgeerts P, Gils A, Vermeire S. 2015. Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 148(7):1320-9.
- van Roon JAG, Vanroy JLAM, Duits A, Lafeber FPJG, Bijlsma JW. 1995. Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T-helper-1 activation is inhibited by interleukin-4. *Ann Rheum Dis* 54(10):836-40.
- van Roon JAG, vanRoy JLAM, GmeligMeyling FHJ, Lafeber FPJG, Bijlsma JWJ. 1996. Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. *Arthritis Rheum* 39(5):829-35.
- Vastesaeger N, Cruyssen BV, Mulero J, Gratacos Masmitja J, Zarco P, Almodovar R, Font P, Juanola X, Collantes-Estevez E, REGISPONSER Working Group. 2014. ASDAS high disease activity versus BASDAI elevation in patients with ankylosing spondylitis as selection criterion for anti-TNF therapy. *Reumatologia Clinica* 10(4):204-9.
- Veale D, Rogers S, Fitzgerald O. 1994. Classification of clinical subsets in psoriatic-arthritis. *Br J Rheumatol* 33(2):133-8.
- Vignesh APP and Srinivasan R. 2015. Ocular manifestations of rheumatoid arthritis and their correlation with anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Clinical Ophthalmology* 9:393-7.
- Vincent C, de Keyser F, Masson-Bessiere C, Sebbag M, Veys EM, Serre G. 1999. Anti-perinuclear factor compared with the so called "antikeratin" antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann Rheum Dis* 58(1):42-8.
- Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. 2013. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: A real issue, a clinical perspective. *Ann Rheum Dis* 72(2):165-78.

- Voskuyl AE. 2006. The heart and cardiovascular manifestations in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 45:4-7.
- Wagner C, Visvanathan S, Braun J, van der Heijde D, Deodhar A, Hsu B, Mack M, Elashoff M, Inman RD. 2012. Serum markers associated with clinical improvement in patients with ankylosing spondylitis treated with golimumab. *Ann Rheum Dis* 71(5):674-80.
- Wagner CL, Visvanathan S, Elashoff M, McInnes IB, Mease PJ, Krueger GG, Murphy FT, Papp K, Gomez-Reino JJ, Mack M, et al. 2013. Markers of inflammation and bone remodelling associated with improvement in clinical response measures in psoriatic arthritis patients treated with golimumab. *Ann Rheum Dis* 72(1):83-8.
- Wahl AK, Langeland E, Larsen MH, Robinson HS, Osborne RH, Krogstad A. 2015. Positive changes in self-management and disease severity following climate therapy in people with psoriasis. *Acta Derm Venereol* 95(3):317-21.
- Wang J, Devenport J, Low JM, Yu D, Hitraya E. 2016. Relationship between baseline and early changes in C-reactive protein and interleukin-6 levels and clinical response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care & Research* 68(6):882-5.
- Wang S, Ohrmund L, Hauenstein S, Salbato J, Reddy R, Monk P, Lockton S, Ling N, Singh S. 2012. Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *J Immunol Methods* 382(1-2):177-88.
- Watson W, Nall ML, Cann HM, Farber EM. 1972. Genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 105(2):197-207.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen K, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. 2010. Peptidylarginine deiminase from porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62(9):2662-72.
- Wei JC, Sung-Ching HW, Hsu Y, Wen Y, Wang W, Wong R, Lu H, van Gaalen FA, Chang W. 2015. Interaction between HLA-B60 and HLA-B27 as a better predictor of ankylosing spondylitis in a taiwanese population. *Plos One* 10(10):e0137189.
- Weinblatt ME, Fleischmann R, van Vollenhoven RF, Emery P, Huizinga TWJ, Cutolo M, van der Heijde D, Duncan B, Davies O, Luijckens K, et al. 2015. Twenty-eight-week results from the REALISTIC phase IIIb randomized trial: Efficacy, safety and predictability of response to certolizumab pegol in a diverse rheumatoid arthritis population. *Arthritis Research & Therapy* 17:325.
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, Teoh LA, Fischkoff SA, Chartash EK. 2003. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate - the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 48(1):35-45.

- Weinstein GD, Krueger GG, Lowe NJ, Duvic M, Friedman DJ, Jegasothy BV, Jorizzo JL, Shmunis E, Tschien EH, LewKaya DA, et al. 1997. Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: Vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. *J Am Acad Dermatol* 37(1):85-92.
- Weischer M, Blum A, Eberhard F, Rocken M, Berneburg M. 2004. No evidence for increased skin cancer risk in psoriasis patients treated with broadband or narrowband UVB phototherapy: A first retrospective study. *Acta Derm Venereol* 84(5):370-4.
- Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B. 2006. Development of antiinfiximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(3):711-5.
- Wolbink GJ, Voskuyl AE, Lems WF, de Groot E, Nurmohamed MT, Tak PP, Dijkmans BAC, Aarden L. 2005. Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(5):704-7.
- Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. 1989. Hla-Dr4 subtype frequencies in rheumatoid-arthritis indicate that Drb1 is the major susceptibility locus within the hla class-ii region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24):10049-53.
- Wright PB, McEntegart A, McCarey D, McInnes IB, Siebert S, Milling SWF. 2016. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. *Rheumatology* 55(1):120-32.
- Xu B, Ma J, Ma X, Jia H, Feng R, Xu L. 2015. Association between rs7517847 and rs2201841 polymorphisms in IL-23 receptor gene and risk of ankylosing spondylitis: A meta-analysis. *Peerj* 3:UNSP e910.
- Xu Z, Vu T, Lee H, Hu C, Ling J, Yan H, Baker D, Beutler A, Pendley C, Wagner C, et al. 2009. Population pharmacokinetics of golimumab, an anti-tumor necrosis factor-alpha human monoclonal antibody, in patients with psoriatic arthritis. *J Clin Pharmacol* 49(9):1056-70.
- Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. 2014. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* 141(2):125-39.
- Yawalkar N, Karlen S, Hunger R, Brand CU, Braathen LR. 1998. Expression of interleukin-12 is increased in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 111(6):1053-7.
- Zachariae H. 2003. Prevalence of joint disease in patients with psoriasis - implications for therapy. *American Journal of Clinical Dermatology* 4(7):441-7.

- Zochling J. 2011. Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis ankylosing spondylitis disease activity score (ASDAS), ankylosing spondylitis quality of life scale (ASQOL), bath ankylosing spondylitis disease activity index (BASDAI), bath ankylosing spondylitis functional index (BASFI), bath ankylosing spondylitis global score (BAS-G), bath ankylosing spondylitis metrology index (BASMI), dougados functional index (DFI), and health assessment questionnaire for the spondylarthropathies (HAQ-S). *Arthritis Care & Research* 63:S47-58.
- Zuo X, Sun L, Yin X, Gao J, Sheng Y, Xu J, Zhang J, He C, Qiu Y, Wen G, et al. 2015. Whole-exome SNP array identifies 15 new susceptibility loci for psoriasis. *Nature Communications* 6:6793.

## Letter to the Editor

Sergio Martín, Ainhoa Ruiz del Agua, Nerea Torres, Dora Pascual-Salcedo, Chamaida Plasencia, Begoña Ruiz-Argüello, Antonio Martínez, Rosaura Navarro and Daniel Nagore\*

# Comparison study of two commercially available methods for the determination of golimumab and anti-golimumab antibody levels in patients with rheumatic diseases

DOI 10.1515/cclm-2015-0266

Received March 17, 2015; accepted April 14, 2015

**Keywords:** anti-TNF drugs; biological drug monitoring; immunogenicity; method comparison; rheumatoid arthritis.

To the Editor,

The options for treatment of rheumatoid arthritis (RA) and inflammatory bowel disease with tumour necrosis factor (TNF) inhibitors are constantly growing. Golimumab (GLM) is a fully human monoclonal antibody to TNF- $\alpha$  approved to treat RA, psoriatic arthritis (PsA), ankylosing spondylitis (AS) and ulcerative colitis (UC). TNF inhibitors are highly efficient treatments; however, some monoclonal antibodies elicit a significant and unwanted immune response in the patient leading to loss of clinical response

**\*Corresponding author: Daniel Nagore**, Department of Research and Development, Progenika SA, Parque Tecnológico de Bizkaia 504, 48100, Derio, Spain, Phone: +34 944 064525,

Fax: +34 944 064526, E-mail: daniel.nagore@progenika.grifols.com

**Sergio Martín:** Department of Physiology, Medicine and Dentistry School, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Spain; and Department of Research and Development, Progenika SA, Derio, Spain

**Ainhoa Ruiz del Agua, Nerea Torres, Begoña Ruiz-Argüello and Antonio Martínez:** Department of Research and Development, Progenika SA, Derio, Spain

**Dora Pascual-Salcedo:** Immunology Unit, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

**Chamaida Plasencia:** Department of Rheumatology, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

**Rosaura Navarro:** Department of Physiology, Medicine and Dentistry School, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Spain

and adverse effects [1]. Adoption of measurements of trough drug levels (DL) and anti-drug antibodies (ADA) as a mean to complement clinical assessment and optimise treatment regimens is a hot topic. Therapeutic drug optimal ranges are being reported for several diseases and clinical outcomes [2, 3]; secondary loss of response has been demonstrated to be strongly associated to the production of ADA and reduced DL [1, 4], and several therapeutic algorithms to guide patient management have been published [3, 5]. Furthermore, studies prove that measuring DL and ADA is cost-effective in guiding personalised treatments [6, 7]. As a consequence monitoring of DL and ADA in clinical practice is advisable in order to complement clinical assessment and optimise patient treatment. However, a common objection that limits implementation of measurements in medical practice is the claim that the magnitude of results vary systematically between different assays and technologies, and assay standardisation is lacking. The aim of this study was to evaluate the correlation and agreement between different assays and commercially available technologies to monitor GLM therapy in patients with rheumatic diseases.

Here we present a method comparison study with the objective of evaluating two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for GLM quantification, and two methods based on ELISA and radioimmunoassay (RIA) for detection of antibodies to GLM (ATG) in rheumatic patients. An observational study to analyse GLM pharmacokinetics and incidence of ATG in rheumatic patients was approved by the Ethical Committee of La Paz University Hospital and local authorities. Trough levels of GLM and ATG were analysed in a retrospective cohort of 48 patients (102 serum samples) initiating or under maintenance therapy with GLM for up to 3 years (25 AS, 9 PsA, 4 undifferentiated spondyloarthritis, 3 RA, 2 spondyloarthritis, 1 juvenile idiopathic arthritis and 4 unknown). Samples were

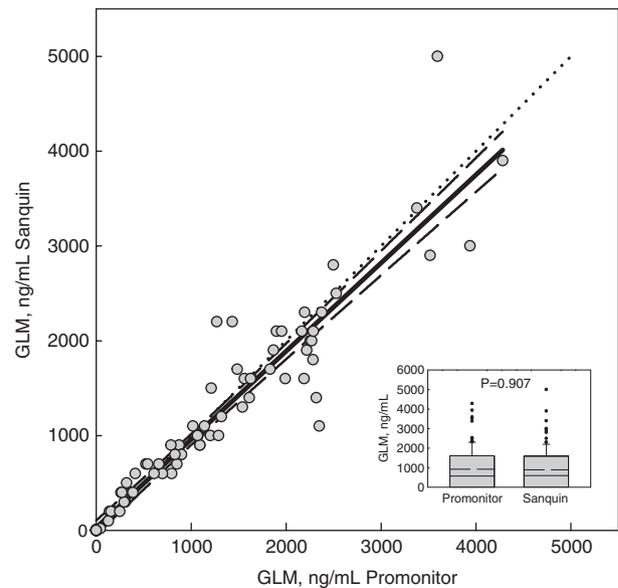
assayed using Promonitor-GLM and Promonitor-Anti-GLM ELISA kits (Progenika, Derio, Spain), and in parallel with ELISA and RIA assays offered by Sanquin Blood Supply (Amsterdam, The Netherlands) to measure GLM levels and ATG, respectively.

The Promonitor assay to measure GLM is based on a previously described capture ELISA [8]. Briefly, plates are precoated with an anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody bound to human TNF $\alpha$ . Free GLM present in the samples is captured to pre-immobilised TNF $\alpha$  and finally, bound GLM is detected via a specific horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-GLM human monoclonal antibody. Binding ATG were measured using a two-site (bridging) ELISA as described previously [8]. Briefly, GLM precoated plates are first incubated with ATG present in samples. Captured Anti-GLM immunoglobulins are detected via HRP-conjugated GLM. Both assays were performed at room temperature without shaking and the whole protocol took approximately 2 h 30 min. The lower limit of quantification of the GLM and ATG assays is 36 ng/mL and 40 AU/mL, respectively.

GLM analysis by Sanquin Diagnostic Service was carried out with a different ELISA assay described previously [9]. Similarly, free GLM is captured onto the plate via its ability to bind TNF $\alpha$ . However, captured GLM is detected by incubation with a biotinylated rabbit immunoglobulin directed to the GLM idiotype, requiring a third incubation step with streptavidin-HRP. Binding antibodies were measured using a solid phase RIA as described previously [9]. Positivity of both GLM and ATG assays was set at 5 ng/mL and 12 AU/mL, respectively.

Spearman's and Mann-Whitney tests were used to study correlation and difference between the two DL tests; the difference (bias) in values obtained with both GLM assays was also assessed with Bland-Altman analysis. Percentage of positive and negative agreement was used to study the association between the ADA methods.

Both types of ELISA for GLM determination showed a positive correlation meaning that they tend to increase together, and there was a statistically significant relationship between the results (Spearman's  $r=0.98$ ,  $p<0.0001$ ) (Figure 1). Measurement range of both assays is broad enough to report any clinically relevant concentration of GLM. There was no significant difference between the two assays (median 575 vs. 600 ng/mL, interquartile range 0–1614 vs. 0–1600 ng/mL;  $p=0.907$  for Promonitor-GLM and Sanquin, respectively) (Figure 1). Only one sample was reported by Promonitor-GLM as negative while Sanquin's ELISA reported a positive result (10 ng/mL). Bland-Altman analysis shows a perfect agreement between both assays. The linear regression does not statistically differ from zero indicating no systematic bias of any of the



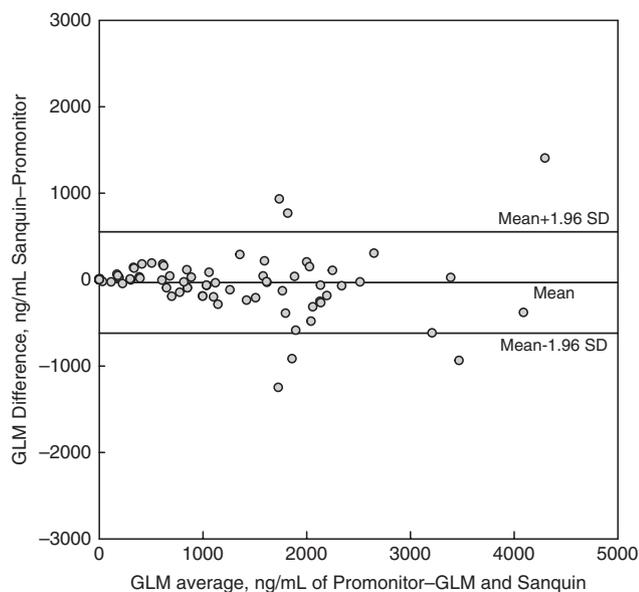
**Figure 1:** Correlation between Promonitor and Sanquin ELISA assay for determination of GLM levels. Solid, dashed and dotted lines represent the linear regression, 95% CI and equality, respectively. Inset: box plot of both tests; dashed and solid lines represent the median and mean, respectively.

methods (bias  $-33.4$  ng/mL; 95% CI  $-92.3$ – $25.3$ ;  $p>0.05$ ) (Figure 2) over the measurement range.

Both tests gave identical results for ATG analysis (positive and negative percentage agreement of 100%). Antibodies were detected in three samples (3 patients, 6%) regardless of the test used. ELISA sensitivity proved to be equal to RIA for the detection of ATG in this cohort. Incidence of antibodies against GLM treatment is confirmed to be low as described previously [9].

The main differences between methods for measuring GLM levels are the reagents employed and steps to perform the assay. While Promonitor kit uses a HRP-conjugated anti-GLM human monoclonal antibody specifically designed to bind GLM idiotype, Sanquin's detection reagent is a biotinylated rabbit polyclonal immunoglobulin directed to the GLM idiotype, and therefore requires a third incubation step with streptavidin to develop the reaction. Regardless of technical differences, results demonstrate that both methods can be safely used in a clinical setting for patient monitoring without significant bias in the drug quantification.

Biological drug quantification is of pivotal importance in order to accurately establish therapeutic drug optimal ranges associated to good clinical response. Several technologies like ELISA, RIA, homogeneous mobility shift assay (HMSA) and reporter gene assay (RGA) are increasingly being used to accomplish this. However, there are few



**Figure 2:** Comparison of GLM methods by Bland-Altman analysis. The difference between the two measurements (Y-axis in ng/mL) is plotted against the average of each pair of measurements (X-axis in ng/mL). Mean and mean plus 1.96 standard deviations are represented.

assay comparison studies, and frequently systematic differences on exact drug concentrations are reported with different types of assays and even between assays that share the same format and technology. The fact that different manufacturers report different drug concentrations and false positives is probably due to a lack of optimisation of the assay and/or non-specific reagents [10]. However, here we demonstrate that it is possible to obtain identical results with different assays and technologies, and this is strongly related to the quality of assay design and development. Each pair of methods in this study uses different reagents, formats and detection chemistries. Despite different analytical performances, no significant differences in GLM and ATG levels were observed, suggesting that future development of optimal ranges values is viable and not influenced by the type of assay, and therefore both methods should result in similar correlations with clinical outcomes and comparable therapeutic actions.

**Acknowledgments:** SM is supported by a Zabalduz predoctoral grant from UPV/EHU. The authors thank Simon Santa Cruz for critical review of the manuscript, and all the technicians from the R&D department for technical support.

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

**Financial support:** None declared.

**Employment or leadership:** AR, NT, BR, AM and DN are employed by Progenika Biopharma, S.A.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organisation(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

- Garces S, Demengeot J, Benito-Garcia E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1947–55.
- Chen DY, Chen YM, Tsai WC, Tseng JC, Chen YH, Hsieh CW, et al. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2015;74:e16.
- Rosas J, Llinares-Tello F, de la Torre I, Santos-Ramirez C, Senabre-Gallego JM, Valor L, et al. Clinical relevance of monitoring serum levels of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in daily practice. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:942–8.
- Plasencia C, Pascual-Salcedo D, Nuño L, Bonilla G, Villalba A, Peiteado D, et al. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment of spondyloarthritis with infliximab. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1955–60.
- Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OO, Ainsworth MA. Clinical implications of measuring drug and anti-drug antibodies by different assays when optimizing infliximab treatment failure in Crohn's disease: post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1055–64.
- Krieckaert CL, Nair SC, Nurmohamed MT, van Dongen CJ, Lems WF, Lafeber FP, et al. Personalised treatment using serum drug levels of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis: an evaluation of costs and effects. *Ann Rheum Dis* 2013;74:361–8.
- Steenholdt C, Brynskov J, Thomsen OO, Munck LK, Fallingborg J, Christensen LA, et al. Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with Crohn's disease who lose response to anti-TNF treatment: a randomised, controlled trial. *Gut* 2014;63:919–27.
- Ruiz-Arguello B, del Agua AR, Torres N, Monasterio A, Martinez A, Nagore D. Comparison study of two commercially available methods for the determination of infliximab, adalimumab, etanercept and anti-drug antibody levels. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:e287–9.
- Kneepkens EL, Plasencia C, Krieckaert CL, Pascual-Salcedo D, van der Kleij D, Nurmohamed MT, et al. Golimumab trough levels, antidrug antibodies and clinical response in patients with rheumatoid arthritis treated in daily clinical practice. *Ann Rheum Dis* 2014;73:2217–9.
- Vande CN, Buurman DJ, Sturkenboom MG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, et al. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36:765–71.