

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 295**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006 E 13158951 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **02.10.2024 EP 2645106**

54 Título: **Métodos para evaluar una respuesta inmune a un agente terapéutico**

30 Prioridad:

04.04.2005 US 668404 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
13.02.2025

73 Titular/es:

**BIOPEN MA INC. (100.00%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SUBRAMANYAM, MEENA;
AMARAVADI, LAKSHMI;
WAKSHULL, ERIC;
LYNN, FRANCES;
PANZARA, MICHAEL;
BARBOUR, ROBIN MCDAID y
TAYLOR, JULIE ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 640 295 T5

DESCRIPCIÓN

Métodos para evaluar una respuesta inmune a un agente terapéutico

5 Solicitudes relacionadasCampo de la invención.

10 La invención se refiere a la evaluación de pacientes, para una respuesta inmune a un agente terapéutico, particularmente a la proteína terapéutica, natalizumab.

Antecedentes de la invención

15 Actualmente están disponibles terapias biológicas para el tratamiento de enfermedades y trastornos tales como rechazo de trasplantes, leucemia, cáncer de mama, artritis, esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn; y están en desarrollo numerosas terapias basadas en proteínas adicionales. Los productos terapéuticos biológicos disponibles incluyen AMEVIVE® (alefacept), ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan), ORTHOCLONE® (muromonab-CD3), ENBREL® (etanercept), REOPRO® (abciximab), RITUXAN® (rituximab), SIMULECT® (basiliximab), REMICADE® (infliximab), SYNAGIS® (palivizumab), HERCEPTIN®(trastuzumab),
20 ZENAPAX® (daclizumab), CAMPATH® (alemtuzumab), MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina), HUMIRA® (adalimumab), AVONEX® (Interferón beta-la), y TYSABRI® (natalizumab). Natalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4). Natalizumab se une a la subunidad $\alpha 4$ de las integrinas $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 4\beta 7$. Natalizumab es útil para tratar determinadas enfermedades y afecciones inflamatorias, incluyendo la esclerosis múltiple, la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide.

25 Debido a que las respuestas inmunes a agentes terapéuticos biológicos pueden tener consecuencias clínicas, el desarrollo del ensayo de la inmunogenicidad y la validación es de gran importancia en el campo de los agentes terapéuticos biológicos.

30 Compendio de la invención

La invención se refiere a las realizaciones según se define en las reivindicaciones.

35 En particular, la invención se refiere a un método para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en un sujeto, comprendiendo el método determinar si al menos dos muestras biológicas tomadas en diferentes puntos temporales de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab contienen al menos un nivel umbral clínicamente significativo de 500 ng/mL en una muestra de suero de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab, en donde dichos puntos temporales están separados por al menos 42 días, y en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble es indicativa de una disminución de la eficacia o
40 falta de eficacia del natalizumab.

La divulgación proporciona métodos y composiciones para la identificación, el seguimiento y/o la evaluación de una respuesta a natalizumab. El hecho de que un paciente desarrolle anticuerpos contra el natalizumab puede o no correlacionarse con una respuesta clínica a natalizumab. La invención se basa, en parte, en el
45 descubrimiento de un nivel inesperado de respuesta de anticuerpos que puede utilizarse como umbral para detectar una respuesta clínicamente significativa a natalizumab. En algunas realizaciones, el nivel de umbral es mayor de lo que habría sido predicho utilizando un análisis estadístico de los pacientes que no han recibido natalizumab. El umbral clínicamente significativo es generalmente más alto que el nivel detectable más bajo de la respuesta inmune en un paciente. Por ejemplo, el nivel de umbral clínicamente significativo es
50 generalmente de al menos 2 desviaciones estándar por encima de un nivel de control negativo, por ejemplo, por encima de un nivel medio de pretratamiento de una población de pacientes sin tratar. En algunas realizaciones, los niveles de umbral más altos utilizados en los métodos de la invención resultan en un menor número de falsos positivos que se identificaría si el nivel de umbral se basara en un punto de corte del 5 % (por ejemplo, 1,645 desviaciones estándares por encima de la media) para respuestas inmunes observadas en
55 pacientes que no habían recibido natalizumab. Según la invención, la presencia de una respuesta inmune detectable en una muestra de paciente no es clínicamente significativa a menos que la respuesta inmune alcance al menos un nivel umbral predeterminado. La invención proporciona, entre otras cosas, métodos de identificación de un nivel umbral clínicamente significativo de respuesta de anticuerpos al natalizumab, y métodos de identificación de pacientes que tienen una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa al
60 natalizumab. La invención, en parte, también proporciona un nivel umbral con el que identificar anticuerpos clínicamente significativos en un sujeto.

Una respuesta inmune a natalizumab puede no ser clínicamente significativa (por ejemplo, puede no mostrar una asociación significativa con la eficacia clínica reducida) a menos que la magnitud de la respuesta inmune
65 alcance un nivel de umbral que puede ser predeterminado (por ejemplo, basado en respuestas inmunes obtenidas para diferentes grupos de pacientes). Sorprendentemente, los métodos descritos en el presente no

se basan en la comparación de muestras obtenidas de cada uno de los pacientes antes y después del tratamiento, ni se basan en la identificación de la mera presencia de una respuesta inmune detectable a natalizumab. En contraposición, los métodos de la divulgación se refieren a la detección de al menos un nivel de umbral de una respuesta inmune a natalizumab, donde el nivel de umbral puede ser más alto que el nivel detectable más bajo de la respuesta inmune, y en donde los resultados positivos del ensayo son clínicamente significativos, en parte, porque el ensayo evita falsos positivos que no tienen ninguna significación clínica asociada.

En la actualidad, no hay generalmente técnica aplicable ni patrón para la detección de una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica. Diferentes proteínas terapéuticas pueden inducir diferentes tipos de anticuerpos, y la presencia de tales anticuerpos puede o no afectar a la seguridad, farmacocinética y/o eficacia de una proteína terapéutica. Los métodos actuales de seguimiento de la respuesta de un paciente a un anticuerpo terapéutico implican típicamente la comparación de los niveles de anticuerpos en el suero antes y después del tratamiento para cada uno de los pacientes la identificación de la presencia de cualquier respuesta inmune detectable, y a la evaluación del paciente para determinar si la respuesta inmune detectable se correlaciona con cualquier cuestión de seguridad, farmacocinética y/o de eficacia. En contraposición, los métodos de la divulgación son útiles para identificar a los pacientes con respuestas inmunes clínicamente significativas al proporcionar ensayos de cribado para la detección de niveles de umbral de respuesta clínicamente significativos.

Según la invención, una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab es una respuesta de anticuerpos que puede afectar a uno o más parámetros clínicos en un paciente, y/o a la farmacocinética y/o a la farmacocinética y/o eficacia del natalizumab. Generalmente, una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa indica una disminución de la eficacia o la falta de eficacia del natalizumab, o una reacción adversa a natalizumab. Por ejemplo, para la esclerosis múltiple, una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica incluye uno o más de: (a) la falta de eficacia o al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más de disminución en la eficacia del natalizumab para reducir el número, la gravedad o la tasa de recidiva en el paciente; (b) la falta de eficacia o al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más de disminución en la eficacia del natalizumab para ralentizar la progresión de la discapacidad en la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS) o la Escala Funcional Compuesta de Esclerosis Múltiple (MSFC); (c) la falta de eficacia o al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más de disminución en la eficacia para reducir el número o volumen de lesiones hiperintensas de T2 nuevas o de reciente ampliación o para atenuar el aumento en el volumen de la lesión hiperintensa de T2 en MRI del cerebro, (d) la falta de eficacia o al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más de disminución en la eficacia para reducir el número o el volumen de las lesiones potenciadas con gadolinio en la MRI del cerebro; (e) la falta de eficacia o al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más de disminución en la eficacia para mejorar la función visual; (f) la presencia de un evento adverso serio (por ejemplo, reacción de hipersensibilidad, por ejemplo, anafilaxis). Con la excepción de (f), dichas respuestas se evalúan dentro de un periodo determinado de tiempo después de la administración del natalizumab, por ejemplo, dentro de 3 meses, 6 meses, 9 meses, o al menos un año.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos de identificar un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos a natalizumab. El método incluye (a) evaluar el nivel de anticuerpos anti-natalizumab en una población de control de pacientes que padecen un trastorno (por ejemplo, determinar el nivel medio o mediano de anticuerpos anti-natalizumab en una población de al menos 2,3, 5, 10, 20, 30, 50, 100 o más pacientes que tienen un trastorno y que no han sido tratados con natalizumab durante al menos 3 meses, 6 meses o más); y (b) seleccionar un nivel umbral de al menos 2 (por ejemplo, 2,5, 3, 4, 5, o 6) desviaciones estándar por encima del nivel de anticuerpos anti-natalizumab en la población de control. La presencia de al menos el nivel de umbral de anticuerpos anti-natalizumab en un paciente al que se ha administrado el natalizumab (el paciente tratado) se correlaciona con una respuesta clínicamente significativa en el paciente tratado. Preferiblemente, el mismo reactivo de detección (por ejemplo, anticuerpo anti-natalizumab marcado) se utiliza para evaluar al paciente tratado que el que se utiliza para identificar el nivel de anticuerpos anti-natalizumab en la población de control. En una realización, el trastorno es esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el trastorno es una inflamación del sistema nervioso central (por ejemplo, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC, encefalitis o mielitis transversa, además de o en lugar de la esclerosis múltiple), un rechazo de injerto de tejidos o de órganos o una enfermedad de injerto contra huésped, una lesión aguda del SNC (por ejemplo, ictus o lesión de la médula espinal); enfermedad renal crónica; alergia (por ejemplo, asma alérgica); diabetes de tipo 1; trastornos inflamatorios del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa); miastenia grave; fibromialgia; una enfermedad artrítica (por ejemplo, artritis reumatoide o artritis psoriásica); un trastorno de la piel inflamatorio/inmune (por ejemplo, psoriasis, vitiligo, dermatitis o liquen plano); lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; un cáncer hematológico (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia o linfoma); un cáncer sólido tal como un sarcoma o un carcinoma (por ejemplo, de pulmón, mama, próstata, o cerebro); o un trastorno fibrótico (por ejemplo, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis crescética, nefropatía diabética o fibrosis intersticial renal). En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad que implica la modulación de una subunidad $\alpha 4\beta 1$ y/o $\alpha 4\beta 7$.

La divulgación proporciona métodos para identificar un paciente que tiene una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico. El método incluye identificar, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene un trastorno y al que se ha administrado la proteína terapéutica, la presencia de un nivel de umbral de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a la proteína terapéutica, en donde el nivel de umbral es de al menos 2 (por ejemplo, 2, 5, 3, 4, 5 o 6) desviaciones estándares por encima del nivel de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína terapéutica en una población de control (por ejemplo, una población de pacientes que tienen el trastorno, pero a los que no se les ha administrado la proteína terapéutica en los últimos 3 meses, 6 meses o más). La proteína terapéutica es natalizumab. En una realización, el trastorno es esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el trastorno es artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, el trastorno es enfermedad de Crohn. En una realización, el método incluye, además, modificar el régimen de tratamiento de un paciente al que se identifica que tiene una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos y composiciones para identificar en una muestra biológica obtenida de un sujeto la presencia de un nivel clínicamente significativo de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a natalizumab que se administró al sujeto. Aspectos de la divulgación incluyen el uso de ensayos ELISA para la detección de niveles de anticuerpos inducidos que son indicativos de una respuesta inmune clínicamente significativa en un sujeto para la administración de natalizumab. En una realización, la divulgación proporciona métodos y kits para identificar niveles clínicamente significativos de anticuerpos anti-natalizumab que son indicativos de una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto que ha recibido al menos una dosis de natalizumab.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para evaluar y/o modificar un régimen terapéutico basado en una respuesta inmune de un sujeto a natalizumab.

Según un aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en un sujeto. Los métodos incluyen determinar si al menos dos muestras biológicas tomadas en diferentes puntos temporales de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab contienen un nivel umbral clínicamente significativo de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab, en donde dichos puntos temporales están separados por al menos 42 días, y en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble es indicativa de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab. En algunas realizaciones, al menos el nivel umbral de anticuerpo soluble que se une a natalizumab está presente en dos muestras biológicas tomadas del sujeto en dos puntos temporales consecutivos. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab se determina mediante: la determinación de un nivel de actividad de unión soluble a natalizumab en una primera alícuota de la muestra biológica; y la determinación de si la actividad de unión soluble es específica para natalizumab. En ciertas realizaciones, la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda alícuota de la muestra biológica. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un natalizumab marcado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab no marcado (por ejemplo, los niveles medidos en presencia de natalizumab no marcado pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competidora de natalizumab no marcado). En ciertas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un natalizumab inmovilizado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab soluble (por ejemplo, los niveles medidos en presencia de natalizumab no soluble pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competidora de natalizumab soluble). En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a un natalizumab marcado medido en presencia de una primera cantidad de VLA-4 no marcado se compara con un segundo nivel de actividad de unión a un natalizumab marcado medido en presencia de una segunda cantidad de natalizumab no marcado. En algunas realizaciones, el primer y segundo niveles de actividad de unión se determinan en una primera y segunda alícuotas de la muestra biológica. En ciertas realizaciones, la cantidad de anticuerpo soluble frente a natalizumab se determina mediante un ensayo ELISA de puente. En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un primer inmunoensayo para una primera alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda alícuota de la muestra biológica, en donde el segundo inmunoensayo se adiciona con una mayor cantidad de natalizumab soluble no marcado que el primer inmunoensayo, y en donde la presencia en la muestra biológica de al menos un nivel umbral de anticuerpos solubles contra natalizumab se indica si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de actividad de unión es menor que un porcentaje predeterminado del primer nivel de actividad de unión. En ciertas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de actividad de unión medido para una cantidad de referencia de anticuerpo soluble frente a natalizumab. En algunas realizaciones, la cantidad de referencia es de aproximadamente 500 ng/mL (por ejemplo, en una muestra de suero) de un anticuerpo soluble frente a natalizumab. Por ejemplo, la cantidad de referencia puede ser aproximadamente 500 ng/mL, aproximadamente 525 ng/mL, aproximadamente 550 ng/mL, aproximadamente 575 ng/mL o aproximadamente 600 ng/mL. Se debe apreciar que el nivel de referencia de la actividad de unión que corresponde a la cantidad de referencia

puede medirse en una muestra diluida (por ejemplo, una muestra que corresponde a una dilución de 10 veces y contiene, por ejemplo, aproximadamente 50 ng/mL, de un anticuerpo soluble que a natalizumab). Un nivel de referencia de la actividad de unión en un ensayo puede proporcionarse mediante cualquier cantidad predeterminada de anticuerpo soluble frente a natalizumab correspondiente a una dilución adecuada de la cantidad de referencia. El anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo soluble frente a natalizumab es un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab con alta afinidad. En algunas realizaciones, el anticuerpo de referencia bloquea la interacción entre natalizumab y VLA-4. En determinadas realizaciones, el primer y el segundo inmunoensayos están puenteados los ensayos ELISA. En algunas realizaciones, los ensayos primero y segundo comprenden un natalizumab inmovilizado no marcado y un natalizumab soluble marcado, en donde el natalizumab soluble marcado está marcado con una enzima, un marcador fluorescente, un marcador de biotina (por ejemplo, el natalizumab puede estar biotinilado) o un marcador radiactivo. En algunas realizaciones, el primer y el segundo inmunoensayos se llevan a cabo en volúmenes de reacción en paralelo en un único sustrato de reacción. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de suero. En determinadas realizaciones, el sujeto es un paciente humano. En algunas realizaciones, el paciente tiene esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el paciente tiene artritis reumatoide. En determinadas realizaciones, el paciente tiene la enfermedad de Crohn. Los puntos temporales de al menos dos o más muestras biológicas obtenidas el sujeto están separados por al menos 42 días, por ejemplo, 45 días, 60 días, 90 días, o más. En determinadas realizaciones, el método también incluye seleccionar un régimen terapéutico para el sujeto si se detecta un nivel umbral clínicamente significativo de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab en al menos dos muestras biológicas obtenidas del sujeto. En algunas realizaciones, la selección de un régimen terapéutico incluye la evaluación de una terapia actual del sujeto, la determinación de una nueva terapia para el sujeto, la modificación de una terapia actual del sujeto o la detención de una terapia actual del sujeto. En algunas realizaciones, una terapia actual incluye la administración de natalizumab al sujeto.

Según otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de selección de un régimen terapéutico para un sujeto. Los métodos incluyen el ensayo de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab para detectar la presencia de una respuesta inmune positiva a natalizumab en un primer y segundo momentos, seleccionando un régimen terapéutico para el sujeto basado en los resultados del ensayo en el primer y segundo momentos, en donde la presencia de una respuesta inmune positiva en un momento dado se indica por la presencia de al menos una cantidad umbral clínicamente significativa de actividad de unión en una muestra biológica obtenida del sujeto en ese momento. El primer y el segundo punto de tiempo están separados por al menos 42 días. En algunas realizaciones, se continúa la terapia con natalizumab si se detecta una respuesta inmune negativa en el segundo momento. En algunas realizaciones, se selecciona una terapia distinta de la terapia con natalizumab si se detecta una respuesta inmune positiva tanto en el primer como en el segundo momento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene esclerosis múltiple. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene la enfermedad de Crohn. En algunas realizaciones, el sujeto tiene artritis reumatoide.

Según otro aspecto más de la divulgación, se proporcionan métodos de selección de un régimen terapéutico para un sujeto. Los métodos incluyen detectar la presencia de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en al menos dos muestras biológicas obtenidas de un sujeto, en donde al sujeto se le ha administrado natalizumab y las al menos dos muestras biológicas se obtienen del sujeto en momentos separados por al menos 42 días, y seleccionar un régimen terapéutico basado en la detección de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en el sujeto en los momentos en que las al menos dos muestras biológicas se obtienen del sujeto. En algunas realizaciones, el intervalo clínicamente significativo que separa los momentos en que se obtienen las muestras del sujeto es de al menos 45 días, 60 días, 90 días o más. En ciertas realizaciones, la selección de un régimen terapéutico incluye la evaluación de una terapia actual del sujeto, la determinación de una nueva terapia para el sujeto, la modificación de una terapia actual del sujeto o la detención de una terapia actual del sujeto. En algunas realizaciones, una terapia actual incluye administrar natalizumab al sujeto. En algunas realizaciones, detectar la presencia de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab comprende, determinar si una muestra biológica obtenida de un sujeto al que se ha administrado natalizumab contiene un nivel umbral de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab, en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble es indicativa de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab. En ciertas realizaciones, al menos el nivel umbral de anticuerpo soluble que se une a natalizumab está presente en dos muestras biológicas tomadas del sujeto en dos puntos temporales consecutivos. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab se determina: determinando un nivel de actividad de unión soluble a natalizumab en una primera alícuota de la muestra biológica y determinando si la actividad de unión soluble es específica para natalizumab. En algunas realizaciones, la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda alícuota de la misma muestra biológica. En ciertas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un natalizumab marcado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab no marcado (por ejemplo, los niveles medidos en presencia de natalizumab no marcado pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competidora de natalizumab no marcado). En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando los

niveles de actividad de unión a un natalizumab inmovilizado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab soluble (por ejemplo, los niveles medidos en presencia de natalizumab no soluble pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competidora de natalizumab soluble). En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a un natalizumab marcado medido en presencia de una primera cantidad de VLA-4 no marcado se compara con un segundo nivel de actividad de unión a un natalizumab marcado medido en presencia de una segunda cantidad de natalizumab no marcado. En ciertas realizaciones, el primer y segundo niveles de actividad de unión se determinan en una primera y segunda alícuotas de la misma muestra biológica. En algunas realizaciones, la cantidad de anticuerpo soluble frente a natalizumab se determina mediante un ensayo ELISA puente. En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un primer inmunoensayo para una primera alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda alícuota de la muestra biológica, en donde el segundo inmunoensayo se adiciona con una mayor cantidad de natalizumab soluble no marcado que el primer inmunoensayo, y en donde la presencia en la muestra biológica de al menos un nivel umbral de anticuerpos solubles contra natalizumab se indica si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de actividad de unión es menor que un porcentaje predeterminado del primer nivel de actividad de unión. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de actividad de unión medido para una cantidad de referencia de anticuerpo soluble frente a natalizumab. En determinadas realizaciones, la cantidad de referencia es de aproximadamente 500 ng. En determinadas realizaciones, el primer y el segundo inmunoensayos están puenteando los ensayos ELISA. En algunas realizaciones, los ensayos primero y segundo comprenden un natalizumab inmovilizado no marcado y un natalizumab soluble marcado, en donde el natalizumab soluble marcado está marcado con una enzima, un marcador fluorescente, un marcador de biotina (por ejemplo, el natalizumab puede estar biotinilado) o un marcador radiactivo. En algunas realizaciones, el primer y segundo inmunoensayos se llevan a cabo en volúmenes de reacción en paralelo en un único sustrato de reacción (por ejemplo, en pocillos separados de una placa de múltiples pocillos). En ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de suero. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano. En algunas realizaciones, el paciente tiene esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el paciente tiene artritis reumatoide. En determinadas realizaciones, el paciente tiene la enfermedad de Crohn.

Se proporcionan métodos para identificar un nivel umbral clínicamente significativo de respuesta de anticuerpos a natalizumab para un paciente que padece un trastorno. Los métodos incluyen (a) evaluar el nivel de anticuerpos anti-natalizumab en una población de control de pacientes que tienen el trastorno y que no han sido tratados con natalizumab y (b) seleccionar un nivel al menos 2 desviaciones estándar por encima del nivel de anticuerpos anti-natalizumab en la población de control como un nivel umbral clínicamente significativo de respuesta de anticuerpos para los pacientes que tienen el trastorno y son tratados con natalizumab.

Según todavía otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para identificar un paciente que tiene una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica. Los métodos incluyen someter a ensayo, en una muestra biológica obtenida de un paciente que tiene un trastorno y al que se ha administrado la proteína terapéutica, para determinar la presencia de un nivel de umbral de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína terapéutica, en donde el nivel de umbral es al menos 2 desviaciones estándares por encima del nivel de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína terapéutica en una población control no tratada de los pacientes que tienen la trastorno. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo. En consecuencia, la invención proporciona métodos para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en un sujeto, determinando si una muestra biológica de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab contiene un nivel umbral de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab, en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble es indicativa de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab.

Cada una de las limitaciones de la divulgación puede incluir diversas realizaciones de la divulgación. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la divulgación que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada uno de los aspectos de la divulgación.

55 Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 ilustra la interferencia de natalizumab libre en un inmunoensayo.
- La Figura 2 ilustra la interferencia de natalizumab libre en un ensayo de bloqueo.
- La Figura 3 muestra una probabilidad de una respuesta inmune clínicamente significativa en función del tiempo después de una administración inicial de natalizumab.
- La Figura 4 ilustra un efecto general de respuestas inmunes positivas sobre las tasas de recaída. P = Placebo, n = 315. AN = Anticuerpo Negativo, n = 569. TP = Transitoria Positiva, n = 19. PP = Persistente Positiva, n = 37.

- La Figura 5 ilustra un efecto de respuestas inmunes positivas sobre las tasas de recaída a lo largo de intervalos de tiempo particulares después de una administración inicial de natalizumab (A: 0-3 meses, B: 3-6 meses, C: 6-9 meses y D: 9-12 meses). P = Placebo, n = 315. AN = Anticuerpo Negativo, n = 569. TP = Transitoria Positiva, n = 19. PP = Persistente Positiva, n = 37.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere, en parte, a métodos, composiciones y kits para detectar y monitorizar una respuesta inmune a natalizumab que se administra a un sujeto. En un aspecto, la invención proporciona métodos para la identificación de pacientes con una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab. Según la invención, la presencia de una respuesta inmune detectable no es clínicamente significativa, a menos que la respuesta inmune alcance un nivel de umbral clínicamente significativo. Por ejemplo, en estudios clínicos de natalizumab, un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta inmune era sorprendentemente mayor de 1,645 desviaciones estándares (por ejemplo, en más de aproximadamente 2 desviaciones estándares) por encima de un nivel de control de la respuesta inmune observada para los sujetos que no han recibido el natalizumab.

Ciertos aspectos de la divulgación se refieren a métodos para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa contra natalizumab que se administra a un sujeto. Los aspectos de la divulgación son particularmente útiles para detectar y monitorizar una respuesta inmune en un sujeto que ha recibido al menos una dosis (por ejemplo, una dosis terapéutica) de natalizumab. Aspectos de la divulgación incluyen la identificación y/o monitorización de un sujeto con una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab, la evaluación de la respuesta inmune, y/o la determinación de un tratamiento clínico apropiado (por ejemplo, un régimen terapéutico particular) basado en la naturaleza y/o el alcance de la respuesta inmune. La información sobre la respuesta de un sujeto a la administración de natalizumab puede utilizarse para ajustar, diseñar y/u optimizar un régimen terapéutico para el sujeto. En consecuencia, la invención se refiere a la identificación de un sujeto que tiene una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab. Otro aspecto de la divulgación se refiere a la monitorización de la respuesta inmune de un sujeto a natalizumab. Otro aspecto de la divulgación se refiere a la determinación de estrategias terapéuticas apropiadas para tratar ciertas enfermedades (por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide, etc.) basándose en la respuesta inmune de un sujeto a natalizumab.

Los anticuerpos de unión a VLA-4 se pueden utilizar para tratar un cierto número de enfermedades y trastornos asociados con la inflamación. Dichos trastornos incluyen, por ejemplo, la inflamación del sistema nervioso central (por ejemplo, además de esclerosis múltiple, meningitis, neuromielitis óptica, neurosarcoidosis, vasculitis del SNC, encefalitis y mielitis transversa), rechazo de injerto de tejido u órgano o enfermedad de injerto contra huésped, lesión aguda del SNC, por ejemplo, ictus o lesión de la médula espinal; enfermedad renal crónica; alergia, por ejemplo, asma alérgica; diabetes tipo 1; trastornos inflamatorios del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; miastenia grave; fibromialgia; trastornos artríticos, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica; trastornos inflamatorios/inmunes de la piel, por ejemplo, psoriasis, vitíligo, dermatitis, liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; cánceres hematológicos, por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, linfoma; cánceres sólidos, por ejemplo, sarcomas o carcinomas, por ejemplo, de pulmón, mama, próstata, cerebro; y trastornos fibróticos, por ejemplo, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis crescética, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal. En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad efectuada por modulación de una subunidad $\alpha 4\beta 1$ y/o $\alpha 4\beta 7$.

Por consiguiente, los aspectos de la divulgación se refieren a evaluar la respuesta de un sujeto a natalizumab y determinar los tratamientos apropiados para la esclerosis múltiple y otras afecciones o enfermedades inflamatorias que pueden ser tratadas con natalizumab.

La invención se refiere, en parte, a identificar una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto, y determinar si la respuesta es clínicamente significativa.

Como se usa en el presente documento, "identificar" un sujeto con una respuesta inmune significa detectar o diagnosticar la presencia de una respuesta inmune en un sujeto. Por consiguiente, identificar un sujeto con una respuesta inmune clínicamente significativa significa detectar o diagnosticar la presencia de una respuesta inmune clínicamente significativa en un sujeto.

Como se usa en el presente documento, un "umbral clínicamente significativo" para una respuesta de anticuerpos a una proteína terapéutica está al menos 2 desviaciones estándares por encima de un nivel de referencia de control. En una realización, el nivel de umbral para una respuesta inmune clínicamente significativa a una proteína terapéutica puede estar entre 3 y 6 (por ejemplo, aproximadamente 4 o 5) desviaciones estándares por encima de un nivel de control. El nivel de control puede ser un nivel medio o mediano de actividad de unión que está presente en una población de pacientes (por ejemplo, una población

de sujetos con una enfermedad o afección tal como esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide) antes de la exposición a la proteína terapéutica. El umbral clínicamente significativo para los anticuerpos anti-natalizumab es 500 ng/mL de suero del paciente (por ejemplo, un umbral de 50 ng/mL en un ensayo de suero 10 veces diluido).

5

Como se usa en el presente documento, una respuesta inmune es una respuesta inmunogénica a una proteína terapéutica caracterizada por niveles aumentados en el objeto de uno o más anticuerpos que se unen a la proteína. Por lo tanto, una respuesta inmune se puede caracterizar por la inducción de niveles incrementados de anticuerpos solubles que reconocen (por ejemplo, reconocen específicamente) y se unen a natalizumab.

10

Una respuesta inmune típica es policlonal y puede incluir anticuerpos con diferentes afinidades (y, por lo tanto, diferentes grados de especificidad) para la proteína terapéutica. Por consiguiente, los métodos de la divulgación pueden implicar la detección de la presencia en un sujeto de uno o más anticuerpos inducidos que se unen a una proteína terapéutica (por ejemplo, natalizumab) que fue administrada al sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos inducidos pueden ser detectados como anticuerpos solubles que están presentes en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero).

15

Los aspectos de la divulgación se refieren a ensayos para detectar un nivel de umbral clínicamente significativo de la actividad de unión en una muestra biológica obtenida de un paciente. El nivel de umbral representa un nivel por debajo del cual cualquier actividad de unión detectable se considera que no es clínicamente significativa. Como se usa en el presente documento, la actividad de unión se refiere a la cantidad detectada de unión a una proteína terapéutica en una muestra biológica. Como se describe en el presente documento, la presencia de actividad de unión en una muestra biológica puede reflejar una respuesta policlonal para la administración de una proteína terapéutica. Por consiguiente, la cantidad de unión puede reflejar un agregado de unión por diferentes anticuerpos con diferentes afinidades para la proteína. En determinadas realizaciones, la actividad de unión se analiza adicionalmente para determinar con mayor confianza si el nivel de unión es debido a la presencia de anticuerpos específicos contra la proteína terapéutica o es debido a otros factores tales como factores reumatoides. La especificidad de una actividad de unión puede ser evaluada en ensayos de competición como se describe en el presente documento.

20

25

30

En un aspecto de la divulgación, un sujeto se identifica como un positivo (es decir, que tiene una respuesta inmune clínicamente significativa a una proteína terapéutica) sólo si una o más de las muestras obtenidas del sujeto son test-positivas en un ensayo de la divulgación. Un resultado positivo del ensayo se determina cuando una muestra obtenida de un sujeto contiene al menos un nivel de umbral clínicamente significativo de actividad de unión para la proteína terapéutica, por ejemplo, natalizumab. Sorprendentemente, la presencia de cualquier respuesta inmune detectable a un anticuerpo terapéutico no es clínicamente significativa. Según la divulgación, los métodos basados en el cribado de pacientes para detectar cualquier nivel de respuesta inmune a un anticuerpo terapéutico identifican muchos pacientes falsos positivos, resultando en una monitorización clínica adicional innecesaria y la ansiedad potencial para pacientes que no tienen una respuesta inmune clínicamente significativa. Por ejemplo, se detecta un número excesivo de falsos positivos cuando los pacientes se identifican como positivos en base a una respuesta inmune a un anticuerpo terapéutico que es mayor de 1,645 desviaciones estándares por encima de un nivel medio de actividad de unión presente en sujetos que no han recibido el anticuerpo terapéutico. Según la divulgación, la tasa de falsos positivos teórica del 5 % utilizando un corte de 1,645 desviación estándar es una subestimación del número de falsos positivos, ya que el 5 % representa la tasa de falsa detección de cualquier respuesta inmune y no la tasa de falsos positivos para una respuesta inmune clínicamente significativa. Sorprendentemente, elevando el nivel de corte (el nivel por debajo del cual una respuesta se considera que es negativa) a más de 1,645 desviaciones estándares por encima de un nivel de referencia control, se reduce el número de falsos positivos sin afectar a la identificación de sujetos con respuestas inmunes clínicamente significativas. Se debe apreciar que el umbral debe fijarse en un nivel que resulte en tasas de detección aceptables de pacientes con una respuesta inmune clínicamente significativa.

35

40

45

50

55

En un aspecto de la divulgación, una respuesta inmune de un sujeto puede clasificarse como negativa si las muestras obtenidas del sujeto no dan positivo en un ensayo de la invención, por ejemplo, no alcanzan el nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos. En contraposición, si un sujeto se identifica como positivo en base a un nivel positivo (un nivel en o por encima de un nivel de umbral clínicamente significativo) de la actividad de unión en un solo ensayo, el paciente puede ser "transitorio" o bien "persistente" positivo. Un transitorio positivo es un paciente que tiene una respuesta inmune positiva al anticuerpo terapéutico durante un período determinado de tiempo, después del cual el paciente se vuelve negativo. En contraposición, un persistente positivo es un paciente que es positivo para los niveles clínicamente significativos de la respuesta inmune durante más de un período de tiempo especificado. Se debe apreciar que transitorio y persistente son términos relativos. Por consiguiente, un paciente puede ser clasificado inicialmente como persistente si el paciente da positivo para una respuesta inmune en dos o más puntos temporales (por ejemplo, a los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más puntos temporales) separados por al menos 42 días. Sin embargo, posteriormente el paciente puede ser reclasificado como transitorio si el paciente da negativo para una

60

65

respuesta inmune en un ensayo posterior. La presencia de una respuesta inmune transitoria puede ser indicativa de una reducción transitoria de la eficacia terapéutica. La presencia de una respuesta inmune persistente puede ser indicativa de una eficacia terapéutica persistentemente reducida. Por consiguiente, la presencia de una respuesta inmune transitoria o persistente puede ser clínicamente relevante y puede afectar a la naturaleza de un régimen terapéutico en un sujeto que se identifica como transitoriamente positivo o persistentemente positivo. Una respuesta inmune persistente puede requerir una modificación del régimen terapéutico del sujeto.

Como se usa en el presente documento, la expresión "régimen terapéutico" significa un curso de tratamiento para un sujeto. Un régimen terapéutico puede incluir la administración de un agente o agentes farmacéuticos y/o la aplicación de una terapia. La selección de un régimen puede incluir la selección de la cantidad de dosis, el tiempo de la dosis, la frecuencia de la dosis, la duración del tratamiento, terapias de combinación con uno o más agentes farmacéuticos o terapias, y cualesquiera otros aspectos de la toma de decisiones de tratamiento que son utilizados por los expertos en la técnica médica y terapéutica. Un régimen terapéutico también puede incluir el uso de terapias tales como los procesos o dispositivos que se administran a o se utilizan en un sujeto para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Los ejemplos de procesos terapéuticos, aunque no pretende ser limitante, incluyen el uso de dispositivos médicos o cirugía. En consecuencia, determinar o alterar el régimen terapéutico de natalizumab puede implicar determinar o alterar la cantidad de dosis de natalizumab terapéutico que se administra a un sujeto, la frecuencia de administración, la vía de administración, la duración del tratamiento (por ejemplo, el número de dosis que se administran), si combinar o no el tratamiento con natalizumab con uno o más tratamientos adicionales, si interrumpir el tratamiento con natalizumab, si utilizar un anticuerpo de unión a VLA-4 diferente, y/o si utilizar una combinación de anticuerpos de unión a VLA-4, etc. En una realización, la invención puede implicar determinar si utilizar una alternativa terapéutica a natalizumab, por ejemplo, si utilizar interferón beta.

Aspectos de la divulgación se refieren a la detección y/o monitorización de una respuesta inmune a natalizumab en un ser humano (por ejemplo, un paciente humano). En consecuencia, tal como se utiliza en el presente documento, un sujeto puede ser un sujeto humano un sujeto puede ser un paciente humano que tiene una enfermedad o afección inflamatoria. Un sujeto puede ser un paciente que ha recibido al menos una dosis de natalizumab. Un sujeto puede ser un paciente que está siendo (o ha sido) tratado crónicamente con natalizumab. Un sujeto puede ser un paciente que está siendo (o ha sido) tratado repetidamente con natalizumab. Tal como se utiliza en el presente documento, un tratamiento crónico puede implicar la administración de natalizumab durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, para controlar o gestionar los síntomas de una enfermedad o afección inflamatoria durante el periodo de tiempo). En contraposición, un tratamiento repetido puede implicar la repetición de un curso de tratamiento (por ejemplo, un periodo de administración) con natalizumab cuando sea necesario (por ejemplo, para tratar síntomas de una enfermedad inflamatoria cuando empeoran o se "reagudizan"). En una realización, se considera que un paciente está siendo sometido a un tratamiento repetido cuando el sujeto se vuelve a tratar con natalizumab por primera vez. Se entenderá por los expertos en la técnica que un sujeto también puede someterse o ha sido sometido a tratamientos con terapias o procesos en combinación con o separados del tratamiento con natalizumab. Se debe apreciar que los aspectos de la divulgación no se limitan a sujetos humanos. Por consiguiente, un sujeto puede ser un primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato, roedor, u otro sujeto no humano.

Identificación y monitorización de una respuesta inmune

En un aspecto, la divulgación implica identificar y/o monitorizar una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto. En determinadas realizaciones, la identificación y/o monitorización se realiza sometiendo a ensayo una muestra biológica obtenida del sujeto, preferiblemente sangre, en cuanto a la presencia de anticuerpos inducidos que se unen a natalizumab administrado según se describe en el presente documento.

En un aspecto de la divulgación, se realiza un ensayo cualitativo en una muestra biológica obtenida de un sujeto, y se identifica la presencia de una respuesta inmune si la muestra biológica contiene anticuerpos contra el natalizumab en una cantidad mayor que una cantidad umbral. En una realización, una cantidad umbral es una cantidad por encima de la cual una respuesta inmune se identifica como clínicamente relevante, por ejemplo, el nivel umbral se determina según se describe en el presente documento. Una respuesta inmune clínicamente relevante puede tener implicaciones clínicas, por ejemplo, indica que el sujeto debe ser evaluado para determinar si la dosificación del natalizumab administrado debe ser modificado, para determinar si otros parámetros fisiológicos del paciente deben ser monitorizados, para determinar si se debe realizar un ensayo adicional para una respuesta inmune, o para determinar si se deben tomar las medidas alternativas o adicionales para tratar o controlar el sujeto, etc. Una respuesta inmune clínicamente relevante puede ser evaluada junto con uno o más de otros factores. Se debe apreciar que la identificación de una respuesta inmune clínicamente relevante no requiere, por sí misma, que se realice un cambio en la terapia o régimen de tratamiento del sujeto.

En otro aspecto de la divulgación, puede realizarse un ensayo cuantitativo en una muestra biológica para

cuantificar la cantidad de anticuerpos (por ejemplo, el título de anticuerpos) contra natalizumab que fue administrado a un sujeto. También se pueden analizar resultados cuantitativos para determinar si una respuesta inmune está por encima de un nivel de umbral clínicamente significativo.

- 5 Según la divulgación, una respuesta inmune contra natalizumab se puede evaluar en un sujeto a lo largo del tiempo mediante la realización de ensayos en muestras obtenidas del sujeto en diferentes puntos temporales. La estrategia de evaluación múltiple permite monitorizar la respuesta inmune de un sujeto a natalizumab y puede permitir que el régimen de natalizumab se adapte individualmente a las necesidades terapéuticas del sujeto. Por ejemplo, una muestra puede obtenerse a partir de un sujeto, someterse a ensayo en cuanto a una
 10 respuesta inmune a natalizumab que se ha administrado al sujeto, y en un segundo tiempo posterior, se puede obtener otra muestra del sujeto y se puede someter a ensayo de manera similar. La detección y confirmación de la presencia de una respuesta de anticuerpos en las muestras de un sujeto a lo largo del tiempo mediante determinaciones secuenciales a intervalos de tiempo predeterminados permite monitorizar una respuesta inmune al tratamiento con natalizumab. La detección y el seguimiento de una respuesta inmune a un natalizumab administrado también permite el ajuste del tratamiento general del sujeto, por ejemplo, ajustando (por ejemplo, modificando o suspendiendo) el tratamiento con natalizumab y/o ajustando terapias adicionales (por ejemplo, terapias que modulan la respuesta inmune del sujeto).

- 20 La selección o el ajuste de un régimen terapéutico puede basarse en una determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa al natalizumab en al menos dos muestras biológicas obtenidas a diferentes tiempos de un sujeto al que se ha administrado natalizumab. La determinación de la respuesta inmune clínicamente significativa de un sujeto a natalizumab puede indicar que sería beneficioso iniciar, continuar, ajustar o detener la administración de un agente farmacéutico y/o terapia específicos al sujeto. Por ejemplo, la determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en al menos dos muestras
 25 biológicas obtenidas de un sujeto puede ser la base para modificar la dosis de un agente farmacéutico que se administra al sujeto como parte de un régimen terapéutico actual. El tratamiento se puede cambiar para incluir agentes o terapias farmacéuticas adicionales o para disminuir o aumentar la dosis de un agente o terapia administrado actualmente. Por ejemplo, la identificación de una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto puede sugerir iniciar o continuar un tratamiento con un agente farmacéutico inmunosupresor, etc. En algunas realizaciones, puede seleccionarse un régimen terapéutico inicial basándose en la determinación de una respuesta inmune inicial a natalizumab en una única muestra biológica obtenida de un sujeto que ha sido tratado con natalizumab. Después de la selección y la administración de un régimen terapéutico seleccionado, se puede hacer una determinación posterior de una respuesta inmune a natalizumab en una o más muestras biológicas posteriores obtenidas del sujeto y puede proporcionar una base para ajustar el régimen terapéutico.

- 35 La determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa al natalizumab en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto en diferentes puntos temporales puede compararse para evaluar o medir la aparición, el progreso o la regresión de una respuesta inmune en el sujeto a la terapia con natalizumab. La aparición de una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto puede caracterizarse por el aumento de los niveles de al menos un anticuerpo que se une a natalizumab, y puede ir acompañada de la aparición de uno o más cambios fisiológicos o síntomas en el sujeto. La progresión de una respuesta inmune a natalizumab puede caracterizarse por un aumento adicional del nivel del al menos un anticuerpo que se une a natalizumab. Sin embargo, el progreso de una respuesta inmune puede implicar un aumento en el o los niveles de al menos un anticuerpo adicional, y/o una disminución en el nivel de al menos uno de los anticuerpos que aumentaron con el inicio de la respuesta inmune. Por ejemplo, una respuesta inmune inicial puede ser predominantemente una respuesta de IgM. A medida que progresa la respuesta inmune, los anticuerpos predominantes pueden cambiar de anticuerpos IgM a IgG. El progreso de una respuesta inmune también puede ir acompañado de un progreso (por ejemplo, un incremento, disminución o modificación) de uno o más de los cambios o síntomas fisiológicos
 40 iníciales o de la aparición de uno o más cambios fisiológicos o síntomas adicionales. La regresión de una respuesta inmune en un sujeto a natalizumab puede caracterizarse por una disminución en el o los niveles de uno o más anticuerpos que se unen a natalizumab. La regresión de una respuesta inmune también puede ir acompañada de una disminución de determinados cambios o síntomas fisiológicos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el inicio, la progresión y/o la regresión de una respuesta inmune a natalizumab pueden ser clínicamente asintomáticos, aparte de los cambios detectables en los niveles de anticuerpos.

- 55 El progreso y la regresión de una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab pueden generalmente ser indicados por el aumento o la disminución, respectivamente, del nivel de un anticuerpo que se une a natalizumab en muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si se determina que ningún anticuerpo, o un nivel subclínicamente significativo de un anticuerpo, que se une específicamente a natalizumab está presente en una primera muestra de un sujeto y se determina que un umbral clínicamente significativo de anticuerpos que se unen específicamente a natalizumab está presente en una segunda o subsiguiente muestra del sujeto, puede indicar el inicio de una respuesta inmune a natalizumab en el sujeto. La progresión de una respuesta inmune a natalizumab en un sujeto puede indicarse por la presencia de un nivel más alto de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab en una segunda o posterior muestra de un sujeto en comparación con el nivel presente en la muestra inicial o anterior del sujeto. La regresión de una respuesta inmune a natalizumab puede indicarse por la presencia de un nivel inferior de un anticuerpo que

se une específicamente a natalizumab en una segunda o posterior muestra de un sujeto en comparación con el nivel presente en la muestra inicial o anterior del sujeto.

5 En un aspecto de la divulgación, una respuesta inmune puede ser categorizada como positiva o negativa en función de si un nivel de anticuerpos contra natalizumab está por encima de un umbral clínicamente significativo predeterminado. En algunas realizaciones, un umbral clínicamente significativo es más de 1,645 (por ejemplo, más de 2, 3, 4, 5 o 6) desviaciones estándares por encima de un nivel medio de actividad de unión medida en sujetos pre-inmunes (es decir, sujetos que no han recibido dosis alguna de natalizumab). En algunas realizaciones, los sujetos son sujetos sanos, y en determinadas realizaciones los sujetos son pacientes enfermos (por ejemplo, pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide). El nivel de umbral es >0,5 microgramos/mL de suero. En algunas realizaciones, el nivel de umbral es igual a aproximadamente 0,5 microgramos/mL de suero.

15 En una realización, los sujetos a los que se han administrado natalizumab pueden ser categorizados como que caen en una al menos una de tres categorías. Una categoría, denominada en el presente documento como "negativa", incluye a los sujetos en los que las actividades de unión están a niveles de umbral clínicamente significativos o por debajo de ellos (p. ej., un sujeto en el que no se detectan anticuerpos contra natalizumab a una concentración de al menos unos 500 ng/mL en una muestra biológica (p. ej., suero) obtenida del sujeto). Una segunda categoría, denominada en el presente documento como "transitoria positiva" incluye sujetos en los que las actividades de unión se detectan por encima de un nivel umbral sólo un número limitado de veces, por ejemplo, en uno, dos, tres, cuatro, cinco puntos temporales (por ejemplo, no se detectan anticuerpos contra natalizumab en un punto temporal posterior separado por al menos 42 días del último punto temporal). Una tercera categoría, denominada en el presente documento como "positiva persistente" incluye sujetos en los que se detectan actividades de unión por encima de un nivel umbral un número predeterminado de veces, por ejemplo, en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más puntos temporales separados por un intervalo de tiempo umbral mínimo (por ejemplo, un sujeto en el que se detectan anticuerpos contra natalizumab a una concentración de al menos unos 500ng/mL en dos tres, cuatro, cinco, seis, siete o más muestras biológicas obtenidas del sujeto en puntos temporales separados por al menos 42 días). El intervalo de umbral puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90 o más días. Pacientes que son "positivos persistentes" pueden sufrir una pérdida de eficacia del tratamiento con natalizumab, mientras que los pacientes "positivos transitorios" recuperan toda la eficacia tras una disminución temporal de la misma.

35 Se debe apreciar que un sujeto negativo puede convertirse en un transitorio positivo. Y, o bien puede convertirse en un persistente positivo si se desarrolla una respuesta inmune positiva y persiste durante un número especificado de puntos temporales, por ejemplo, al menos dos puntos temporales.

40 En una realización, se puede cambiar una terapia en base a una determinación de un solo resultado positivo. En otra realización, se puede cambiar una terapia en base a una determinación de que un sujeto es un sujeto transitorio positivo. En aún otra realización, se puede cambiar una terapia en base a una determinación de que un sujeto es un sujeto persistente positivo.

45 Como se analizó anteriormente, se debe apreciar que los términos transitorio y persistente son términos relativos, y que un paciente que parece ser persistentemente positivo puede llegar a ser negativo en un momento posterior. Por consiguiente, los pacientes con respuestas positivas deben ser monitorizados regularmente para evaluar la persistencia de la respuesta positiva, la eficacia de la terapia y/o la presencia de otras manifestaciones clínicas de una respuesta inmune positiva.

50 Según la divulgación, el riesgo de una reducción en la eficacia terapéutica (por ejemplo, el riesgo de una recaída) aumenta con el periodo de tiempo que persiste una respuesta inmune positiva. Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación, el número de veces que un paciente da positivo es menos importante que el periodo de tiempo durante el cual el paciente sigue siendo positivo. En una realización, un paciente puede ser identificado como en riesgo de una reducción en la eficacia terapéutica (por ejemplo, en riesgo de una recaída) si se detecta un resultado positivo dentro de los 3 meses de la primera administración de natalizumab. En una realización, este riesgo aumenta si la respuesta inmune positiva persiste durante 3-6 meses, y aumenta adicionalmente si la respuesta inmune positiva persiste durante 6-9 meses, y aumenta aún más con persistencia durante 9-12 meses después de la primera administración de natalizumab. Se debe apreciar que la persistencia durante más de un año incluso aumenta aún más la probabilidad de una recaída. Por consiguiente, diferentes regímenes terapéuticos pueden ser apropiados para un paciente con una respuesta inmune persistentemente positiva. Sin embargo, se debe apreciar que, incluso en presencia de una respuesta inmune persistentemente positiva, una terapia de anticuerpo terapéutico no necesita interrumpirse, a menos que se vuelva ineficaz (por ejemplo, una pérdida de sustancialmente todos eficacia) o causa otras manifestaciones clínicas negativas.

65 En algunas realizaciones, el tratamiento con natalizumab puede ser interrumpido, si el tratamiento es ineficaz o está perdiendo su eficacia en un paciente que tiene un nivel por debajo del umbral de la respuesta inmune. Una falta de eficacia (o una reducción de la eficacia) en ausencia de una respuesta inmune clínicamente

significativa puede indicar que la ineficacia del tratamiento se debe a uno o varios factores distintos de la respuesta inmune del paciente a natalizumab. Un paciente no será un positivo transitorio si no se detecta ninguna respuesta positiva. Por consiguiente, se puede considerar un tratamiento alternativo.

- 5 Se debe apreciar que las actividades de unión o los niveles de anticuerpos se pueden comparar con las actividades o niveles pre-inmunes (es decir, medidas antes de la administración de la primera dosis de natalizumab). Sin embargo, no es necesaria una comparación con una cantidad pre-inmune tal como se comenta en el presente documento, debido a que se puede identificar una respuesta inmune positiva cuando están presentes en una muestra del paciente una cantidad umbral (o por encima del umbral) clínicamente significativa de actividad de unión o de niveles de anticuerpos.

Ensayos y métodos de detección

- 15 Según aspectos de la divulgación, se somete a ensayo una cantidad umbral de una respuesta de anticuerpos. Como se analiza en el presente documento, se puede realizar un ensayo cualitativo. Como alternativa, puede llevarse a cabo un ensayo cuantitativo, y en una realización los datos cuantitativos puede traducirse en una salida cualitativa (por ejemplo, si la cantidad de anticuerpo es mayor que una cantidad umbral).

- 20 Se puede utilizar cualquier método adecuado para detectar una cantidad de anticuerpo o actividad de unión para determinar si es al menos una cantidad o actividad umbral. Los ensayos de detección pueden incluir cualquiera de los métodos de inmunodetección conocidos para detectar, confirmar, unir, purificar, separar, cuantificar y/o detectar de otra manera en general anticuerpos que se unen específicamente a una proteína terapéutica especificada, por ejemplo, a natalizumab, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, las técnicas de inmunodetección pueden incluir, pero no se limitan a, ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) (que incluyen, pero no se limitan a, un ELISA sándwich estándar o un ELISA de puente), radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoradiométricos, fluoroinmunoensayos, ensayos quimioluminiscentes, ensayos bioluminiscentes, ensayos de radioinmunoprecipitación (RIPA) y Western blots. Además, las técnicas de inmunodetección pueden incluir métodos basados en sensores ópticos tales como resonancia de plasmón superficial (SPR) o filtro de resonancia en modo guiado (BIND). Aunque ciertos ejemplos proporcionados en el presente documento se refieren a ensayos que utilizan un natalizumab inmovilizado unido a una superficie (por ejemplo, un ELISA), una persona con conocimientos ordinarios en la materia reconocerá que la divulgación en algunos aspectos puede incluir ensayos sin unión superficial de natalizumab (por ejemplo, ensayos de citometría de flujo, etc.). Otras técnicas de inmunodetección pueden incluir ensayos inmunoradiométricos (IRMA), fluorimetría en tiempo retardado (TRF) o electroquimioluminiscencia (ECL). Un cierto número de métodos de inmunodetección útiles han sido descritos en la bibliografía científica tal como, por ejemplo, Doolittle M Hand Ben-Zeev 0, 1999; Gulbis B y Galand P, 1993; De Jager R et al., 1993; y Nakamura et al., 1987.

- 40 En un aspecto, se realiza un ensayo para detectar la presencia de una actividad de unión para natalizumab en una muestra biológica. En una realización, la especificidad de la actividad de unión puede evaluarse determinando si la actividad de unión observada es específica para natalizumab o si se debe a un factor de interferencia que puede estar presente en la muestra biológica, como un factor reumatoide u otro factor de unión.

- 45 Aspectos de la divulgación pueden incluir un ensayo que implica poner en contacto una muestra biológica con un resto de inmovilización para inmovilizar cualquier actividad de unión que está presente en la muestra biológica. Una actividad de unión inmovilizada puede ser detectada utilizando un resto de detección. Las moléculas de inmovilización y detección pueden ser, respectivamente, natalizumab inmovilizado no marcado y natalizumab marcado no inmovilizado, tal como se describe en el presente documento. En una realización, un resto de inmovilización puede estar unido a un sustrato o superficie sólido (por ejemplo, en un pocillo de una placa de múltiples pocillos, en la superficie de una placa de ELISA, etc.). En otra realización, un resto de inmovilización puede estar unido a una perla (por ejemplo, una perla magnética) a través de un enlace covalente o de otro tipo (por ejemplo, el resto de inmovilización puede estar conjugado a una molécula de biotina y puede estar unido a una perla revestida con estreptavidina a través de una interacción biotina-estreptavidina). En algunas realizaciones, la perla se puede fijar a una superficie o una matriz. Por ejemplo, una perla magnética se puede inmovilizar sobre una superficie magnética: De manera similar, una perla cargada puede inmovilizarse sobre una superficie cargada (por ejemplo, un electrodo).

- 60 Un resultado positivo se puede determinar si la cantidad detectada de la actividad de unión (por ejemplo, la cantidad de actividad de unión que es capturada por el resto de inmovilización) está por encima de un umbral predeterminado. La especificidad de la actividad de unión detectada puede ser evaluada mediante la inclusión de un resto de competencia en el ensayo. El resto de competencia puede ser natalizumab no inmovilizado no marcado, que puede ser incluido para competir con las etapas de inmovilización y/o detección del ensayo. Si la presencia del resto de competencia reduce la actividad de unión en al menos un porcentaje o corte predeterminado, se determina que la actividad de unión es específica y se confirma el resultado positivo. Si la presencia del resto de competencia no reduce la actividad de unión en al menos un porcentaje o corte

predeterminado, se determina que la actividad de unión es no específica y ahora se determina que el resultado positivo inicial es un resultado negativo para una respuesta inmune.

5 Según aspectos de la divulgación, se pueden utilizar cantidades predeterminadas de inmovilización, detección y/o restos de competencia. De manera similar, se puede establecer un nivel de umbral inicial de actividad de unión utilizando una muestra que contiene una cantidad predeterminada de un anticuerpo que se sabe que se une a natalizumab. Por ejemplo, puede establecerse un nivel umbral utilizando, por ejemplo, unos 500 ng de un anticuerpo de control por mL de ensayo. La cantidad de anticuerpo utilizada para determinar el nivel de umbral determinará la sensibilidad del ensayo. En general, la sensibilidad del ensayo puede ser considerada similar a la cantidad de anticuerpo que es utilizado para determinar el umbral inicial. Se debe apreciar que la cantidad de unión en el control puede servir como una referencia que se utiliza para determinar el umbral (por ejemplo, la cantidad umbral puede ser un múltiplo o una fracción de la señal obtenida en el control). Sin embargo, en una realización, la señal obtenida en el ensayo de control se utiliza como la cantidad umbral. También debe apreciarse que la sensibilidad del ensayo puede verse afectada por un cierto número de factores, incluyendo la afinidad y especificidad del anticuerpo de control.

20 En una realización, la especificidad de la actividad de unión puede ser evaluada enriqueciendo el ensayo con una cantidad de resto de competencia que es similar a la cantidad de anticuerpo de control que se utilizó para establecer el nivel de umbral de la unión. Por ejemplo, un ensayo puede estar enriquecido con entre aproximadamente 10 ng y 1.000 ng (por ejemplo, aproximadamente 50 ng o aproximadamente 500 ng) de natalizumab soluble no marcado por mL de ensayo. Sin embargo, se pueden utilizar otras cantidades de resto de competencia.

25 En consecuencia, en algunas realizaciones de la divulgación, un primer nivel de actividad de unión, en una muestra biológica, a natalizumab se determina en un primer inmunoensayo para una primera alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda alícuota de la muestra biológica, en donde al segundo inmunoensayo se le añade una mayor cantidad de natalizumab soluble no marcado que al primer inmunoensayo, y la presencia de al menos un nivel umbral de anticuerpos solubles contra el natalizumab se indica si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de actividad de unión es menor que un porcentaje predeterminado del primer nivel de actividad de unión.

35 Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar diferentes métodos para evaluar y/o monitorizar una respuesta inmune en un sujeto que ha sido tratado con un anticuerpo terapéutico tal como natalizumab. Por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, la evaluación y/o monitorización puede llevarse a cabo determinando si la cantidad de un anticuerpo se une específicamente a natalizumab utilizando un "corte" de nivel sencillo. Como se usa en el presente documento, el nivel de corte de unión es el nivel en o por encima del cual la detección aumentada se puntuará como significativa y/o positiva y una determinación confirmatoria de que la detección de un nivel de actividad de unión soluble en una muestra biológica refleja el nivel de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab en la muestra. En otras realizaciones, la identificación de una respuesta inmune a natalizumab puede llevarse a cabo cuantitativamente para determinar un título de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab en una muestra biológica de un sujeto.

45 En un aspecto de la divulgación, un ensayo de inmunodetección puede ser un ELISA. Como se entenderá por los expertos en la técnica, el término "ELISA" incluye un cierto número de protocolos para la inmunodetección. Por ejemplo, los métodos ELISA incluyen ELISA sándwich, ELISA puente, etc. En algunas realizaciones, el inmunoensayo ELISA es un ensayo manual. Sin embargo, en algunas realizaciones todo o parte del ELISA puede realizarse robóticamente.

50 En algunas realizaciones de la invención, un ensayo ELISA incluye el uso de natalizumab como un resto diana inmovilizado con el que se reviste una placa de ELISA. La placa de ELISA revestida puede entonces ponerse en contacto con una muestra biológica para la determinación del nivel de un anticuerpo objeto que se une específicamente a natalizumab. En algunas realizaciones, una primera alícuota de una muestra biológica se ensaya mediante un ensayo ELISA para determinar la presencia o ausencia de una cantidad umbral o de unión a natalizumab diana inmovilizado y una segunda alícuota de la misma muestra biológica también se ensaya mediante un ELISA para conformar si un nivel umbral (o por encima del umbral) de unión a natalizumab diana inmovilizado es o no indicativo de anticuerpo específico de natalizumab. En un aspecto de la divulgación, el nivel umbral de actividad de unión soluble en una alícuota es aproximadamente igual al nivel de actividad de unión presente en un control de muestra o de referencia que comprende al menos aproximadamente 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, o 1.000 ng por mL de un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab. En una realización, el nivel umbral se determina como aproximadamente igual al nivel de actividad de unión en una muestra de control o de referencia que contiene aproximadamente 500 ng/mL de un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab. El anticuerpo de referencia puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo murino anti-natalizumab (por ejemplo, 12C4 descrito en Sheremata et al., 1999, Neurology 52, páginas 1072-1074, incorporado en el presente documento por referencia). Como se describe en el presente documento, si el nivel de unión a natalizumab diana inmovilizado

que es al menos en el nivel umbral, y la actividad de unión soluble se determina que es la actividad de unión de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab, entonces identifica una respuesta inmune a natalizumab en el sujeto.

- 5 En general, los métodos ELISA útiles en los métodos de la invención pueden incluir la obtención de una muestra biológica de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab y el contacto de una alícuota de la muestra con un anticuerpo de inmovilización. En algunas realizaciones, el anticuerpo de competencia puede ser natalizumab. El anticuerpo de inmovilización captura moléculas o compuestos en la muestra que se unen al anticuerpo, y la muestra se pone en contacto con un segundo resto de detección que es capaz de unirse selectivamente a o detectar la molécula o compuesto que se captura (por ejemplo, un segundo anticuerpo marcado). Los ejemplos de restos capaces de unirse selectivamente o detectar el complejo incluyen, pero no se limitan a anticuerpos u otros ligandos que pueden ser marcados utilizando una diversidad de marcadores (por ejemplo, disposición de unión de ligandos de biotina/avidina tal como se conoce en la técnica). Un experto en la técnica también puede utilizar un tercer anticuerpo marcado. En realizaciones preferidas, el segundo resto es una forma marcada del anticuerpo de inmovilización.

En algunas realizaciones, un ensayo ELISA incluye el uso de natalizumab como un resto diana inmovilizada con el que se reviste una placa de ELISA. La placa de ELISA revestida puede entonces ponerse en contacto con una muestra biológica para la determinación del nivel de un anticuerpo objeto que se une específicamente a natalizumab. En algunas realizaciones de la invención, una primera alícuota de una muestra biológica se ensaya usando un ensayo ELISA para determinar la presencia o ausencia de una cantidad umbral de actividad de unión para el natalizumab diana inmovilizado, y una segunda alícuota de la misma muestra biológica se ensaya usando un ELISA para confirmar si un nivel umbral (o por encima del umbral) de unión a natalizumab diana inmovilizado es o no indicativo de anticuerpo específico de natalizumab. En un aspecto de la divulgación, el nivel umbral de actividad de unión soluble en una alícuota es aproximadamente igual al nivel de actividad de unión presente en una muestra de control o de referencia que comprende al menos aproximadamente 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, o 1.000 ng por mL de un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab. En una realización, el nivel umbral se determina como aproximadamente igual al nivel de actividad de unión en una muestra de control o referencia que contiene aproximadamente 500 ng/mL de un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab. El anticuerpo de referencia puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo murino anti-natalizumab (por ejemplo, 12C4 descrito en Sheremata et al., 1999, *Neurology* 52, página 1072).

Un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab puede ser un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab (por ejemplo, un anticuerpo que se une a natalizumab con alta afinidad, por ejemplo, con afinidad nanomolar). En algunas realizaciones, un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab puede bloquear la unión de natalizumab a VLA-4 (por ejemplo, puede inhibir la unión de natalizumab a VLA-4 en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, o más). El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo monoclonal murino. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo anti-idiotípico específico para natalizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo de referencia es el anticuerpo 12C4 (disponible de en Maine Biotechnology Services, Inc., Portland ME; véase, por ejemplo, Sheremata et al., 1999, *Neurology* 52, página 1072). El 12C4 es un anticuerpo bloqueante que bloquea la unión del natalizumab al VLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo de referencia compete con 12C4 en cuanto a la unión con natalizumab. La competencia de unión del anticuerpo se puede demostrar utilizando métodos estándares de evaluación de la capacidad de un anticuerpo de inhibir competitivamente la capacidad del anticuerpo 12C4 de bloquear la unión de natalizumab a VLA-4. En algunas realizaciones, la presencia de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab se determina utilizando un ELISA de puente. En un ELISA de puente, los anticuerpos que se unen específicamente a natalizumab (por ejemplo, de una muestra biológica) actúan como puente entre el natalizumab recubierto en una placa ELISA y el natalizumab marcado detectablemente en solución (por ejemplo, no inmovilizado). Por lo tanto, una señal de ELISA después del procesamiento estándar indica que el marcador detectable se ha enlazado a la fase sólida y que está presente en la muestra biológica una actividad de unión soluble.

La puesta en contacto de una alícuota de la muestra biológica con el anticuerpo inmovilizado bajo condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) es generalmente una cuestión de añadir la alícuota de la muestra biológica al anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, natalizumab inmovilizado en una placa de ELISA) e incubar la mezcla durante un período de tiempo suficiente para que el anticuerpo inmovilizado forme un complejo inmune con (es decir, se una a) una molécula o compuesto con actividad de unión soluble que está presente en la alícuota de la muestra biológica. La molécula o compuesto con actividad de unión soluble puede ser un anticuerpo inducido que se une específicamente a natalizumab, o puede ser un anticuerpo o receptor endógeno no inducido que se une a natalizumab (por ejemplo, un factor reumatoide [RF] o un anticuerpo anti-Fab). Después de este tiempo, la mezcla de muestra y anticuerpo (por ejemplo, la placa de ELISA, transferencia de puntos o transferencia Western) generalmente se lavará para separar de la mezcla de ensayo las especies y/o materiales de anticuerpos no unidos.

Si se detecta un nivel umbral de actividad de unión, una etapa adicional puede implicar confirmar si la actividad de unión es indicativa o no de un anticuerpo inducido que se une específicamente a natalizumab. Para esta etapa de confirmación, se puede preparar y ensayar una segunda alícuota de la muestra biológica como se describe para la primera alícuota, excepto que una cantidad predeterminada de natalizumab de competición no inmovilizado y no marcado también se añade al ensayo (por ejemplo, el ensayo ELISA). Por ejemplo, la cantidad predeterminada de anticuerpo de competencia puede ser una cantidad no marcada que reduce una señal específica en un 50 % o más en un ensayo de control. Si la presencia del natalizumab no marcado reduce la señal en una cantidad porcentual superior a la esperada, la actividad de unión al umbral (o por encima del umbral) se considera un indicador positivo de la presencia de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab. Por el contrario, si la presencia del natalizumab no marcado reduce la señal en menos de una cantidad porcentual esperada, entonces la actividad de unión al umbral (o por encima del umbral) se juzga como negativa para un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab. Se debe apreciar que una señal no específica puede deberse a factores en suero distintos de un anticuerpo que se une a natalizumab. Como se usa en el presente documento, los términos "enriquecer" o "enriquecido" se refieren a la adición de un natalizumab de competencia soluble no marcado (o marcado de forma diferente) a una muestra o ensayo.

Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de reducción" es el porcentaje del nivel de unión determinado en la primera alícuota. Por lo tanto, por ejemplo, si hay una indicación de aproximadamente 500 ng/mL equivalente de una molécula o compuesto con actividad de unión en la primera alícuota y la inclusión del natalizumab no marcado en la segunda alícuota reduce la cantidad de señal en más de un 40-90 % (por ejemplo, en aproximadamente un 50 % o más, en aproximadamente un 55 % o más, en aproximadamente un 60 % o más, en aproximadamente un 65 % o más, en aproximadamente un 70 % o más, en aproximadamente un 75 % o más, en aproximadamente un 80 % o más, en aproximadamente un 85 % o más, en aproximadamente un 90 % o más), entonces la actividad de unión en la muestra biológica se considera indicativa de la presencia de un anticuerpo inducido que se une específicamente a natalizumab. Pero si la inclusión del natalizumab no marcado en la segunda alícuota reduce la cantidad de señal en menos de un 20-40 %, entonces la actividad de unión en la muestra biológica no se considera indicativa de la presencia de un anticuerpo inducido que se une específicamente a natalizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo de competencia puede ser natalizumab no marcado soluble. En algunas realizaciones, el natalizumab soluble no marcado se puede utilizar a una concentración final de aproximadamente 100 µg/mL. En algunas realizaciones, se puede utilizar cualquier concentración de natalizumab libre no marcado si produce una disminución predeterminada (por ejemplo, alrededor del 40 %, alrededor del 50 % o más) en la señal obtenida para una muestra de control que contenga una cantidad de control de anticuerpo de referencia. Por ejemplo, una muestra de control puede contener aproximadamente 500 ng/mL, aproximadamente 3 µg/mL o cualquier otra cantidad adecuada de anticuerpo de referencia (por ejemplo, 12C4). Como se indica en el presente documento, la presencia en una muestra biológica de un paciente de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab indica que el sujeto tiene una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab.

En un ELISA "sándwich" ilustrativo, el natalizumab puede utilizarse como anticuerpo diana e inmovilizarse en una superficie seleccionada que muestre afinidad por las proteínas, como un pocillo de una placa de microtitulación de poliestireno. A continuación, una muestra de un sujeto que ha tenido al menos una administración de natalizumab, se añade a los pocillos. Después de la unión y/o el lavado para separar materiales no unidos, se pueden detectar moléculas o compuestos de unión que se unen al anticuerpo diana. La detección puede conseguirse mediante la adición de un segundo anticuerpo que está enlazado a un marcador detectable. Adicionalmente, la identidad de la molécula o compuesto de unión como un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab puede ser confirmada según se describió anteriormente en el presente documento.

Como se entenderá por los expertos ordinarios en la técnica, a pesar de las características individuales (por ejemplo, las etapas confirmatorias descritas en el presente documento), en general, los ELISA tienen determinadas características en común tales como revestimiento, incubación y unión, lavado para separar especies no unidas específicamente, y detección de los complejos inmunes unidos.

En el revestimiento de una placa con un antígeno o anticuerpo, los pocillos de la placa generalmente se incuban con una solución del anticuerpo diana, ya sea durante la noche o durante un período especificado de horas. Un tampón de revestimiento puede ser un tampón de revestimiento de fosfato de sodio/BSA u otro tampón de revestimiento adecuado conocido en la técnica. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos es entonces "revestida" con una proteína inespecífica que es antigénicamente neutra con respecto a la muestra de ensayo. Esta proteína puede ser albúmina de suero bovino (BSA), caseína o disoluciones de leche en polvo, etc. El revestimiento permite el bloqueo de sitios de absorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y reduce así el fondo provocado por la unión no específica de antisueros sobre la superficie.

En un ELISA, se puede utilizar un medio de detección secundario o terciario o un medio de detección directo. Cuando se utilizan métodos de detección secundarios o terciarios, después de la unión de una proteína o anticuerpo al pocillo, el revestimiento con un material no reactivo para reducir el fondo (por ejemplo, con tampón

de bloqueo tal como tampón de bloqueo de Tris-sacarosa u otro tampón de bloqueo reconocido en la técnica), y el lavado para separar el material no unido, la superficie inmovilizante se pone en contacto con la muestra biológica a ensayar en condiciones eficaces para permitir la formación de un complejo inmune (antígeno/anticuerpo). La detección del complejo inmune requiere entonces un ligando de unión secundario marcado o anticuerpo, y un ligando de unión secundario o anticuerpo en conjunción con un anticuerpo terciario marcado o un tercer ligando de unión. En realizaciones preferidas, el segundo ligando de unión es natalizumab (por ejemplo, el mismo natalizumab que se utiliza para el anticuerpo diana).

Como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones eficaces para permitir la formación de un complejo inmune" significa que las condiciones incluyen preferiblemente la dilución de los antígenos y/o anticuerpos con disoluciones tales como BSA, gamma globulina bovina (BGG), solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween, PBS con caseína y Tween 20, o tampón PBS/BSA con Tween 20. En los métodos de la invención se pueden utilizar diversos otros diluyentes de ensayo conocidos en la técnica. Estos agentes añadidos también tienden a ayudar en la reducción de fondo no específico y pueden incluir NaCl hasta 0,5 M.

Como se usa en el presente documento, las condiciones "adecuadas" también significan que la incubación se encuentra a una temperatura o durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las etapas de incubación son típicamente de aproximadamente 1 a 2 a 4 horas más o menos, a temperaturas preferiblemente del orden de 25 °C a 27 °C, o puede ser durante la noche a aproximadamente 4 °C. En los métodos de la invención se pueden utilizar diversos parámetros de temperatura y tiempo de ensayo conocidos en la técnica.

Después de las etapas de incubación en un ELISA, la superficie de contacto se lava para separar el material no unido. Un proceso de lavado preferido puede incluir el lavado con una solución tal como PBS/Tween, TBS/Tween, o tampón borato, que también puede incluir NaCl hasta 0,5 M. Después de la formación de complejos inmunes específicos entre la muestra de ensayo y el anticuerpo diana, y del posterior lavado, se puede determinar la presencia de incluso cantidades diminutas de complejos inmunes. Se entenderá que en los métodos de la divulgación se pueden utilizar formulaciones tampón de lavado conocidas en la técnica adicionales.

Para proporcionar medios de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá una etiqueta detectable asociada. En determinadas realizaciones, el marcador detectable es una enzima que generará el desarrollo de color tras incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Por lo tanto, por ejemplo, se puede poner en contacto o incubar el primer y el segundo complejo inmunes con un anticuerpo conjugado con ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina, hidrógeno peroxidasa, u otro anticuerpo conjugado durante un período de tiempo y en condiciones que favorecen el desarrollo de una formación adicional del complejo inmune (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución con contenido en PBS tal como PBS-Tween).

También se entenderá por los expertos en la técnica que uno o más controles de calidad positivos y negativos se pueden utilizar en los métodos de la divulgación. Una muestra de control de calidad positivo puede ser una muestra de suero normal que contiene una cantidad predeterminada de un anticuerpo que se sabe que se une a natalizumab. Las muestras de control de calidad se pueden hacer reaccionar en paralelo con y bajo las mismas condiciones que las muestras biológicas y de control del ensayo y proporcionan una medida de la función del ensayo. Una muestra de control de calidad negativo puede ser una muestra de suero que se sabe no incluye un anticuerpo que se sabe que se une a natalizumab. Un experto entenderá cómo utilizar reacciones y muestras de control positivo y negativo en un ELISA para confirmar y validar la funcionalidad de las disoluciones y/o sustratos y/o protocolo utilizados en el ensayo. Por ejemplo, un control positivo puede incluir una cantidad conocida de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab, de manera que cuando se trata en las mismas condiciones que las muestras de ensayo (por ejemplo, la muestra biológica) indica que el ensayo funciona dentro de los parámetros esperados. Un ejemplo de un control negativo puede ser una muestra que se sabe que no incluye un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab. Tal control negativo, cuando se trata en las mismas condiciones que la muestra de ensayo (por ejemplo, la muestra biológica), demostrará que la unión detectada en una muestra biológica surge de la muestra biológica y no es debida a la contaminación de componentes del ensayo ni de otro factor no asociado con la muestra biológica. Un ejemplo no limitante de un ensayo abarcado por los métodos de la divulgación puede implicar los siguientes procedimientos. El revestimiento de los pocillos de una placa de ELISA con una solución de aproximadamente 0,25 µg/mL de referencia de natalizumab en un tampón e incubación de la placa revestida durante la noche a temperatura ambiente; lavado de los pocillos de la placa al menos una vez con un tampón de lavado e incubación de los pocillos de la placa con un tampón de bloqueo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente; dilución de las muestras de control y de las muestras de cribado en aproximadamente 1:10 en un diluyente de ensayo; dilución de las muestras de competencia y natalizumab (a aproximadamente 1 mg/mL) juntos en el diluyente de ensayo a una concentración final de natalizumab de aproximadamente 100 µg/mL y aproximadamente una dilución final 1:10 de las muestras de competencia; incubación de muestras de control, muestras de cribado y muestras de competencia aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente y lavado de los pocillos de la placa al menos una vez con tampón de lavado; incubación de las muestras en los pocillos

de la placa durante aproximadamente 60 y 150 minutos a temperatura ambiente y lavado de los pocillos de la placa al menos tres veces con tampón de lavado; adición de aproximadamente 1001 µL/pocillo de la placa de natalizumab biotinilado diluido a aproximadamente 1:1000 en el diluyente de ensayo, incubación de la placa durante aproximadamente 60-90 min a temperatura ambiente, y lavado de los pocillos de la placa al menos tres veces con tampón de lavado; adición de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante diluida a razón de aproximadamente 1:5000 en diluyente de ensayo a las muestras en pocillos de la placa, incubación de la placa durante aproximadamente 60-90 minutos a temperatura ambiente, y lavado de la placa al menos tres veces con tampón de lavado, adición de una cantidad suficiente de sustrato productor de color a los pocillos de la placa para visualizar la unión del anticuerpo, desarrollo de la placa durante varios minutos a temperatura ambiente, deteniendo el desarrollo mediante la adición de H₂SO₄ 1 N a los pocillos de la placa; y lectura de los pocillos de la placa, obteniendo así un resultado.

También se contempla que los reactivos de ELISA descritos en el presente documento pueden estar envasados en un kit que puede ser producido comercialmente para detectar la presencia de y/o medir un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab en una muestra biológica tal como se describe en el presente documento.

También se entenderá que los controles para uso en la invención pueden incluir, además de valores predeterminados (tales como valores de umbral clínicamente significativos identificados según se describe en el presente documento para una proteína terapéutica particular), muestras de materiales ensayados en paralelo con los materiales experimentales. Los ejemplos incluyen muestras de control negativo (por ejemplo, generadas a través de la fabricación) para ser ensayadas en paralelo con las muestras experimentales.

Como se utiliza en el presente documento, una muestra biológica puede ser sangre, plasma o suero. Como se usa en el presente documento, pueden obtenerse muestras biológicas utilizando métodos bien conocidos por los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Una muestra biológica puede ser obtenida directamente de un sujeto o puede obtenerse de células, tejidos o de otro cultivo. Una muestra biológica puede ser reciente o puede haber sido almacenada bajo condiciones adecuadas (por ejemplo, congelada, enfriada rápidamente, etc.) antes de su uso en los métodos de la invención.

Se debe apreciar que una muestra biológica puede obtenerse de un sujeto a diferentes intervalos de tiempo después de la administración de natalizumab. Sin embargo, el natalizumab puede tener una semivida in vivo característica, y la cantidad de natalizumab libre presente en una muestra biológica suele disminuir en función del tiempo tras la administración de natalizumab al sujeto. La presencia de natalizumab libre (no marcado y no inmovilizado) en una muestra biológica puede interferir con las reacciones de unión y detección de la invención. Por consiguiente, las muestras biológicas deben obtenerse el mayor tiempo posible después de una administración terapéutica, por ejemplo en un "valle" en el ciclo de tratamiento. Un "valle" representa las cantidades más bajas de natalizumab libre que están presentes en un sujeto durante un ciclo de tratamiento. Un valle puede producirse, por ejemplo, tiempo después de una administración terapéutica y poco antes de que una posterior administración terapéutica. Se debe apreciar que el momento del valle puede estar influenciado por muchos factores, incluyendo la cantidad de agente que se administra, la semivida del agente, la frecuencia de administración, etc. Por ejemplo, una administración mensual de natalizumab (por ejemplo, 300 mg de natalizumab) resulta en un valle aproximadamente 30 días después de una administración e inmediatamente antes de una administración posterior. Sin embargo, se debe apreciar que los ensayos de la invención pueden realizarse en muestras tomadas en diferentes momentos después de la administración de tratamiento, con la condición de que los ensayos sean relativamente insensibles a, o representen la presencia de natalizumab libre en la muestra biológica. Cuando se comparan los niveles de actividad de unión para diferentes muestras tomadas en diferentes puntos temporales, puede ser particularmente importante obtener cada una de las muestras de una fase similar en el ciclo de tratamiento (por ejemplo, un periodo de tiempo similar después de una administración terapéutica) de modo que los resultados pueden interpretarse sin necesidad de corregir las diferencias en los niveles de natalizumab libre en las muestras biológicas.

Se debe apreciar que las muestras biológicas se pueden diluir antes de ser sometidas a ensayo (por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces, e incluyen valores más altos o más bajos o cualquier valor entremedias). En una realización, una muestra de referencia que contiene una cantidad umbral clínicamente significativa de anticuerpo de referencia se puede diluir en la misma cantidad que la muestra biológica que se está ensayando, de manera que la señal obtenida para la muestra biológica puede compararse directamente con la señal obtenida para la muestra de referencia.

En algunas realizaciones, se utilizan una o más alícuotas de una muestra biológica. Como se usa en el presente documento, el término "alícuota" significa una porción o parte de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se pueden tomar dos o más alícuotas de una muestra biológica obtenida de un sujeto y las alícuotas se pueden someter a ensayo utilizando métodos de la invención para determinar la presencia de una respuesta inmune a natalizumab en el sujeto. Por ejemplo, se pueden tomar dos alícuotas sustancialmente equivalentes de una muestra biológica obtenida de un sujeto al que se ha administrado natalizumab y se puede detectar un nivel de actividad de unión soluble en una alícuota (por ejemplo, una "primera" alícuota) que se puede determinar. Adicionalmente, la otra alícuota (por ejemplo, la "segunda" alícuota) se puede evaluar utilizando los métodos

de la invención para determinar si la actividad de unión soluble detectada en la primera alícuota, que también estaría presente en la segunda alícuota en virtud de su origen de muestra común, es un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab. En algunas realizaciones, si al menos un nivel umbral de unión está presente en la primera alícuota y se determina que la actividad de unión soluble es la actividad de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab, se identifica que está presente en el sujeto una respuesta inmune a natalizumab.

Anticuerpos de unión a VLA-4

Aspectos de la divulgación se refieren a ensayo(s) de detección para identificar y/o monitorizar una respuesta inmune a natalizumab que se administran a un sujeto. En determinados aspectos, un ensayo de detección implica restos tanto de inmovilización como de detección. En algunas realizaciones, un ensayo de detección puede incluir también un resto de competencia. Como se describe en el presente documento, un resto de inmovilización se puede utilizar para inmovilizar un anticuerpo inducido (por ejemplo, un anticuerpo de suero) que se une a natalizumab. Un resto de detección se puede utilizar para detectar el anticuerpo inmovilizado. Un resto de competencia se puede utilizar para competir con el resto de inmovilización y/o de detección para la unión al anticuerpo inducido con el fin de determinar la especificidad de la unión al anticuerpo inducido. Los restos de inmovilización y detección pueden unirse independientemente a uno o más anticuerpos que son característicos de una respuesta inmune a natalizumab. Por consiguiente, los restos de inmovilización y detección pueden ser el natalizumab que se administró al sujeto (por ejemplo, la fracción de inmovilización puede ser una forma inmovilizada de natalizumab que se administró al sujeto, y la fracción de detección puede ser una forma marcada de natalizumab que se administró al sujeto). Sin embargo, en otras realizaciones, cada uno de los restos de inmovilización y detección, de forma independiente, pueden ser variantes de natalizumab que se administró al sujeto, con la condición de que los restos de inmovilización y detección se unan con una afinidad adecuada para detectar uno o más anticuerpos inducidos (por ejemplo, anticuerpos séricos) contra el natalizumab. El resto de competencia es típicamente una forma no marcada (o diferencialmente marcada) soluble del resto de inmovilización o detección. Sin embargo, el resto de competencia puede ser una variante del resto de inmovilización o detección, siempre que compita suficientemente por la unión a natalizumab para determinar la especificidad de la actividad de unión detectada en el ensayo.

Según aspectos de la divulgación, el natalizumab puede usarse terapéuticamente. Por consiguiente, se pueden utilizar natalizumab como resto de inmovilización, detección y/o competencia en un ensayo de detección de la divulgación.

Natalizumab y anticuerpos de unión a VLA-4 relacionados se describen, por ejemplo, en el documento US 5,840,299. mAb 21.6 y HP1/2 son anticuerpos monoclonales murinos ilustrativos que se unen a VLA-4. Natalizumab es una versión humanizada de mAb murino 21.6 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU N.º 5,840,299). También se ha descrito una versión humanizada de HP1/2 (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU N.º 6,602,503). Se describen varios anticuerpos monoclonales de unión a VLA-4 adicionales, tales como HP2/1, HP2/4, L25 y P4C2 (por ejemplo, en el documento de patente de EE. UU. N.º 6,602,503; Sanchez-Madrid y col., 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler y col., 1987 J. Biol. Chem. 2:114778-11485; Issekutz and Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147: 109 (TA-2 mab); Pulido y col., 1991 J. Biol. Chem., 266(16):10241-10245; y el documento de patente de EE.UU. N.º 5,888,507). Muchos anticuerpos de unión a VLA-4 útiles interactúan con VLA-4 en células, por ejemplo, linfocitos, pero no provocan una agregación celular. Sin embargo, se ha observado que otros anticuerpos de unión a VLA-4 provocan dicha agregación. HP1/2 no provoca agregación celular. El HP1/2 MAb (Sánchez-Madrid y col., 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349) tiene una potencia extremadamente alta, bloquea la interacción de VLA-4 tanto con VCAM1 como fibronectina y tiene especificidad para el epítipo B en VLA-4. Este anticuerpo y otros anticuerpos específicos del epítipo B (tales como los anticuerpos de unión del epítipo B1 o B2; Pulido y col., 1991 J. Biol. Chem., 266(16):10241-10245) representan una clase de anticuerpos de unión a VLA-4 útiles.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (las expresiones se utilizan indistintamente en esta invención) se realizan de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para fines comparativos). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP del paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de los huecos de 12, una penalización de la ampliación de huecos de 4 y una penalización del desplazamiento del marco de lectura de 5. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en esta invención, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

El experto en la materia se dará cuenta de que se pueden hacer sustituciones conservativas de aminoácidos en anticuerpos de unión a VLA-4 para proporcionar variantes funcionalmente equivalentes, de los anticuerpos, es decir, las variantes conservan las capacidades funcionales de los polipéptidos VLA-4. Como se usa en el presente documento, una "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga o de tamaño relativas de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las variantes pueden prepararse según métodos para alterar la secuencia de polipéptido conocidas para un experto en la técnica tal como se encuentran en referencias que recopilan tales métodos, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las variantes funcionalmente equivalentes ilustrativas de anticuerpos de unión a VLA-4 incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas en las secuencias de aminoácidos de proteínas divulgadas en el presente documento. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

Como se utiliza en esta invención, la expresión "se hibrida bajo condiciones de alta astringencia" describe condiciones para hibridación y lavado. Una orientación para la realización de las reacciones de hibridación puede encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y se pueden utilizar. Las condiciones de hibridación de alta astringencia incluyen hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C o condiciones sustancialmente similares.

Los anticuerpos pueden ser sometidos a ensayo para determinar una propiedad funcional, por ejemplo, unión a VLA-4, por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU N.º 6,602,503.

Generación de anticuerpos

Anticuerpos que se unen a VLA-4 pueden ser generados mediante inmunización, por ejemplo, utilizando un animal. Todo o parte de VLA-4 se puede utilizar como un inmunógeno. Por ejemplo, la región extracelular de la subunidad alfa-4 se puede utilizar como inmunógeno. En una realización, el animal inmunizado contiene células productoras de inmunoglobulinas con loci de inmunoglobulinas naturales, humanas o parcialmente humanas. En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Utilizando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XenoMouse™, Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), Solicitud de Patente Publicada de EE. UU N.º 2003-0070185, Patente de EE UU N.º 5,789,650, y el documento WO 96/34096. También se pueden producir anticuerpos no humanos contra VLA-4, por ejemplo, en un roedor. El anticuerpo no humano puede ser humanizado, por ejemplo, según se describe en la Patente de EE. UU N.º 6,602,503, EP 239 400, Patente de EE. UU N.º 5,693,761, y Patente de EE. UU N.º 6,407,213.

El documento EP 239 400 (Winter et al.) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una región variable dada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra. Se predice que será menos probable que anticuerpos sustituidos con CDR provoquen una respuesta inmune en los seres humanos en comparación con anticuerpos quiméricos verdaderos porque los anticuerpos sustituidos con CDR contienen considerablemente menos componentes no humanos (Riechmann y col., 1988, *Nature* 332, 323-327; Verhoeyen y col., 1988, *Science* 239, 1534-1536). Típicamente, las CDR de un anticuerpo murino son sustituidas en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano utilizando tecnología de ácido nucleico recombinante para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (habitualmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de la cadena pesada y ligera humanizados son co-expresados en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble.

Queen et al., 1989 *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec; 86(24):10029-33 y el documento WO 90/07861 han descrito un procedimiento que incluye la elección de regiones de marco V humanas mediante análisis por ordenador en cuanto a la óptima homología de secuencia de la proteína con la región de marco V del anticuerpo murino original, y el modelado de la estructura terciaria de la región V murina para visualizar los residuos de aminoácido marco que es probable que interactúen con las CDR murinas. Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen entonces sobre el marco humano homólogo. Véanse también las Patentes de EE. UU N.º 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; y 5,530,101. Tempest et al., 1991, *Biotechnology* 9, 266-271) utilizan, como patrón, los marcos de la región V derivados de las cadenas pesadas y ligeras NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin la introducción en los radicales de residuos de ratón. Una ventaja de utilizar el enfoque de Tempest et al., para construir anticuerpos humanizados basados en NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables de NEWM y REI son conocidas de la cristalografía de rayos X y, de este modo, se pueden modelar las interacciones específicas entre las CDR y residuos de marco de la región V.

Los anticuerpos no humanos pueden ser modificados para incluir sustituciones que insertan secuencias humanas de inmunoglobulina, por ejemplo, residuos de aminoácidos consenso humanos en posiciones particulares, por ejemplo, en una o más de las siguientes posiciones (preferiblemente al menos cinco, diez, doce, o todas): (en el FR del dominio variable de la cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L, y/o (en el FR del dominio variable de la cadena pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, y/o 103H (según la numeración de Kabat). Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU N.º 6,407,213.

Como resultará evidente para un experto en la técnica, la presente divulgación también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias humanas y no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en las que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas.

Las características de cada uno de estos tipos de anticuerpos y métodos para su uso son bien conocidas en la técnica. Los Nanobodies™ son los fragmentos funcionales más pequeños de anticuerpos y se derivan de anticuerpos de cadena sencilla que se producen de forma natural (véase Ablynx, Bélgica; ablynx.com). La tecnología Nanobody™ fue desarrollada a partir del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen un repertorio único de anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura de los Nanobody™ consiste en un dominio variable simple (VHH), una región de bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3). El dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que alberga la capacidad total de unión al antígeno de la cadena pesada original. Los Nanobodies™ combinan las características de los anticuerpos convencionales con características de fármacos de moléculas pequeñas. Los Nanobodies™ muestran una alta especificidad para la diana y una baja toxicidad inherente. Adicionalmente, los Nanobodies™ son muy estables, se pueden administrar por medios distintos a la inyección y son fáciles de fabricar.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a VLA-4 pueden ser producidos, por ejemplo, utilizando esplenocitos humanos cebados in vitro, según se describe por Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147, 86-95. Pueden prepararse mediante clonación de repertorio como se describe por Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-2436 o por Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Métodos 141, 227-236. Documento US 5,798,230. También se pueden utilizar grandes bancos de presentación de fagos humanos no inmunizados para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como agentes terapéuticos humanos utilizando una tecnología de fagos estándar (véase, por ejemplo, Vaughan et al, 1996 Nat Biotechnol. Mar;14(3):309-14; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4: 1-20; y Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8; Solicitud de Patente Publicada de EE. UU N.º 2003-0232333). Los anticuerpos pueden producirse en células procariotas y eucariotas. En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, scFvs) se expresan en una célula de levadura tal como Pichia (véase, por ejemplo, Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251:123-35), Hanseula, o Saccharomyces. Los anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, se producen en células de mamífero. Las células huésped de mamífero de ejemplo para expresión recombinante incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562, y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinante pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU N.º 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017). Los genes marcadores seleccionables ilustrativos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr-con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

En un sistema ilustrativo para la expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión a antígeno del mismo), un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células

- CHO dhfr-mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente enlazados a elementos reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares tales como un elemento regulador de potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador de potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular estándares para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped, y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad con una Proteína A o Proteína G. El documento US 6,602,503 también describe métodos ilustrativos para la expresión y purificación de natalizumab.
- Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función de Fc, por ejemplo, para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con C1q, o ambos. Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237, por ejemplo, según la numeración en la Patente de EE. UU N.º 5,648,260. Otras modificaciones ilustrativas incluyen las descritas en la Patente de EE. UU N.º 5,648,260.
- Para algunos anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos puede estar diseñado para sintetizar anticuerpos en los que está glicosilada la región Fc. Por ejemplo, el dominio Fc de moléculas de IgG está glicosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Esta glucosilación participa en funciones efectoras mediadas por receptores Fcγ y complemento C1q (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis y col. (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). El dominio Fc puede producirse en un sistema de expresión de mamífero que glucosila adecuadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones pos-traduccionales eucariotas.
- Los anticuerpos también pueden ser producidos por un animal transgénico. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 5,849,992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico para la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretado en su interior, el anticuerpo de interés. El anticuerpo puede ser purificado de la leche, o para algunas aplicaciones, se puede utilizar directamente.

Marcadores y detección

- Los aspectos de la divulgación incluyen el uso de anticuerpos de proteínas anti-terapéuticas, no inmovilizados (por ejemplo, natalizumab) como restos de detección para evaluar la presencia y/o el nivel de actividad de unión soluble que está unido a un anticuerpo inmovilizado contra una proteína terapéutica (por ejemplo, natalizumab). Los métodos para evaluar la presencia y/o el nivel de actividad de unión soluble pueden incluir el uso de uno o más restos de detección marcados (por ejemplo, natalizumab contiene o está unido a un marcador detectable). Un marcador detectable se define como cualquier resto que se puede detectar utilizando un ensayo. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales de la divulgación pueden ser acoplados a los agentes de marcado específicos para detectar la unión según procesos de acoplamiento estándares. Se puede utilizar una amplia diversidad de marcadores detectables tales como los que proporcionan una detección directa (por ejemplo, un marcador radiactivo, un fluoróforo [por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), etc.], un cromóforo, un marcador denso óptico o electrónico, etc.) o una detección indirecta (por ejemplo, una etiqueta de enzima tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). Los ejemplos no limitantes de marcadores detectables que han sido unidos a o incorporados en anticuerpos incluyen: enzimas, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad, y partículas de color o ligandos tales como biotina, etc. Además, los métodos de detección de la divulgación pueden incluir métodos de electroquimioluminiscencia (ECL).
- Se puede utilizar una diversidad de métodos para detectar un marcador, dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo. Los marcadores pueden ser detectados directamente a través de densidad óptica o electrónica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiactiva, etc., o pueden ser detectados indirectamente con conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Muchos marcadores detectables adicionales son conocidos en la técnica, como lo son los métodos para su fijación a los anticuerpos.
- Los anticuerpos marcados de la divulgación pueden ser anticuerpos que se utilizan in vitro, por ejemplo, en un inmunoensayo tal como un ELISA. Tales anticuerpos marcados de forma detectable pueden ser anticuerpos que tienen un marcador detectable incorporado en el anticuerpo, o pueden ser anticuerpos que están enlazados

a un ligando de unión secundario y/o a una enzima (una etiqueta de enzima) que generarán un producto coloreado tras el contacto con un sustrato cromogénico. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, hidrógenoperoxidasa (de rábano picante) o glucosa oxidasa. Los ligandos de unión secundarios preferidos son compuestos de biotina y/o de avidina y estreptavidina. El uso de tales marcadores es bien conocido por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU N.º 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241.

Un método de fijación puede incluir el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como anhídrido de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminetetraacético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o tetracloro-3.alfa-6.alfa. difenilglicouril-3 fijado al anticuerpo (Patentes de EE. UU N.º 4,472,509 y 4,938,948). Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o periodato. Los anticuerpos pueden marcarse con marcadores de fluoresceína en presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante la reacción con un isotiocianato. En otras realizaciones, los anticuerpos pueden marcarse mediante derivatización, por ejemplo mediante la introducción selectiva de grupos sulfhidrilo en la región Fc del anticuerpo, utilizando condiciones de reacción que no alteren el sitio de reconocimiento de anticuerpos.

La detección del marcador detectable en un ensayo de la divulgación también se denomina en el presente documento como detectar la "señal". Los métodos para detectar la señal en un inmunoensayo son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones importantes de la invención, la señal del ensayo puede detectarse utilizando con un lector de placas de múltiples pocillos (por ejemplo, lector de microplacas) para evaluar la cantidad y/o localización de una señal. La detección de la señal puede ser detección óptica u otros medios de detección adecuados para detectar una etiqueta detectable utilizada en la divulgación. Los métodos adicionales para la detección de marcadores son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en métodos de la divulgación. Los métodos de la divulgación incluyen ELISA que tienen una sensibilidad para detectar un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab, en donde la sensibilidad es de al menos aproximadamente 1000ng, o 500ng. En realizaciones preferidas, la sensibilidad del ELISA para la detección de un anticuerpo que se une específicamente a natalizumab es al menos aproximadamente 500 ng.

En general, la detección de la formación de inmunocomplejos se puede lograr a través de la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador tal como cualquiera de las etiquetas radiactivas, fluorescentes, biológicas y enzimáticas. Las patentes de EE. UU concernientes al uso de tales marcadores incluyen las Patentes de EE. UU N.º 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 y 4,366,241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario tal como una disposición de unión de un segundo anticuerpo y/o ligando de biotina/avidina tal como se conoce en la técnica.

Se debe apreciar que las técnicas descritas en el presente documento para obtener y producir natalizumab también se pueden utilizar para obtener y producir un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab con alta afinidad (por ejemplo, un anticuerpo de unión a natalizumab de alta afinidad (por ejemplo, 12C4)).

Kits

La divulgación también se refiere, en parte, a kits para someter a ensayo la presencia de una respuesta inmune a natalizumab en una muestra. Un ejemplo de dicho kit puede incluir natalizumab. Un kit puede incluir anticuerpos marcados y/o no marcados de forma detectable y puede incluir disoluciones y compuestos marcar de forma detectable un anticuerpo. Un kit de la divulgación puede incluir también uno o más de los siguientes componentes: placas, pipetas, viales, marcador detectable, disoluciones (por ejemplo, disoluciones de tampón de bloqueo, tampón de lavado, de unión, disoluciones diluyentes, etc.), muestras de control positivas y/o negativas y soluciones. Un kit de la divulgación también puede incluir instrucciones por escrito para el uso del kit para la identificación de una respuesta inmune a natalizumab en una muestra biológica. Los kits de la divulgación también pueden incluir componentes adicionales útiles en la realización de ensayos de control de ELISA positivo y/o negativo. Un kit de la divulgación también puede incluir equipos tales como lectores de placas y/o instrumentación robótica para su uso en los métodos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de inmunogenicidad de Natalizumab

El formato y diseño del ensayo se basó en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) puente. Se utilizaron reactivos y procesos estándares adecuados para los ensayos de puente. En resumen, utilizando procesos estándares natalizumab fue adsorbido a la superficie de placas de microtitulación seguido de una etapa de bloqueo para minimizar la unión no específica de anticuerpos séricos. Se diluyeron controles y muestras y se añadieron a los pocillos. Utilizando procesos estándares, la detección de anticuerpos anti-natalizumab unidos se logró mediante la incubación de las placas con biotina-natalizumab seguido de

estreptavidina fosfatasa alcalina (SA-AP). El desarrollo de color fue proporcional a la cantidad de anticuerpo anti-natalizumab unido.

5 El natalizumab se diluyó a una concentración específica en tampón de recubrimiento de placas y se incubó en placas ELISA de microtitulación de 96 pocillos durante toda la noche a temperatura ambiente. El volumen
 10 recomendado era de 100 µL/pocillo. Las placas se lavaron con tampón de lavado y después se incubaron con tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante >1 h. El volumen del tampón de bloqueo fue de 200 µL/pocillo. Las placas se lavaron con tampón de lavado y luego se incubaron con muestras de control de calidad y sujeto (paciente) diluidas en la relación 1:10 en diluyente de ensayo con o sin natalizumab añadido (100 µg/mL de concentración final) a temperatura ambiente durante 2 h ± 15 min. El diluyente del ensayo que
 15 contiene natalizumab añadido representó un paso confirmatorio. El volumen para el diluyente de ensayo era de 100 µL/pocillo. Las placas se lavaron a continuación en tampón de lavado y luego se incubaron con SA-AP a temperatura ambiente durante 30-35 min. El volumen para la incubación con SA-AP fue de 100 µL/pocillo. Las placas se lavaron a continuación en tampón de lavado y después se incubaron con sustrato de AP, fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) a temperatura ambiente durante 45-50 min. El volumen para la incubación en el sustrato AP fue de 100 µL/pocillo. Después se añadió solución de parada (por ejemplo, H₂SO₄, etc.) directamente a la mezcla de reacción del sustrato y la densidad óptica (DO) se leyó a 405 nm.

20 Para la aceptación del ensayo, los controles positivos y negativos tenían que proporcionar resultados dentro de un valor y una precisión predefinidos. Para la evaluación de los resultados de las muestras de sujetos (pacientes), las muestras fueron juzgadas como negativas si su valor de DO cayó por debajo de la muestra de control de calidad de corte negativo definido. Las muestras también se determinaron negativas si su valor de DO se encontraba por encima de la muestra de control de calidad de corte negativo definido y la inhibición de la señal de la muestra del sujeto (paciente) mediante natalizumab añadido en la etapa confirmatoria era menor que un porcentaje predefinido. Las muestras se determinaron positivas si su valor de DO se encontraba por encima de la muestra de control de calidad de corte negativo definido y la inhibición de la señal de la muestra del sujeto (paciente) mediante natalizumab añadido en la etapa confirmatoria era mayor que o igual a un porcentaje predefinido.

30 Ejemplo 2: Ensayo de cribado de una respuesta inmune a natalizumab

Se realizó un ensayo de cribado (según se describe anteriormente) en muestras de sujetos a los que se había administrado natalizumab. Se examinó la presencia de una respuesta inmune a natalizumab en pacientes a los que se había administrado natalizumab.

35 Las muestras biológicas de sujetos a los que se había administrado natalizumab se sometieron a ensayo para determinar la presencia de un anticuerpo soluble que se une específicamente a natalizumab utilizando los métodos descritos en el Ejemplo 1.

40 Los ensayos incluían el uso de un mAb de alta afinidad como control positivo. El mAb de alta afinidad detectó anticuerpos de unión (por ejemplo, anticuerpos que se unen a natalizumab) que estaban presentes en muestras biológicas de sujetos. El nivel de corte negativo se determinó a la concentración más baja que restituyó una exactitud/precisión aceptable (25 %/25 %); 50 ng/mL en suero al 10 %. La sensibilidad del mAb era de 500 ng/mL en suero puro (no diluido). Con respecto a la sensibilidad, se determinó que el mAb detectaba Abs antinatalizumab pero era insensible a anticuerpos monoclonales humanos irrelevantes. Se determinó que la interferencia con el mAb por otras moléculas o componentes de las muestras incluía la interferencia por fármaco libre en una proporción mAb:fármaco superior a 1:2. La Figura 1 ilustra los efectos de la interferencia de natalizumab libre con el inmunoensayo para anticuerpos anti-natalizumab. También se encontró que el factor reumatoide interfería con el ensayo.

50 Además del ensayo de cribado descrito en los Ejemplos 1 y 2, también se realizaron ensayos de caracterización para evaluar la unión en los ensayos de cribado. Las muestras biológicas de sujetos a los que se había administrado natalizumab se sometieron a ensayo en cuanto la presencia de un anticuerpo soluble que se une específicamente a natalizumab utilizando un ensayo de bloqueo de citometría de flujo. Como control positivo se utilizó un mAb de alta afinidad. El ensayo detectó anticuerpos de bloqueo. El nivel de corte negativo para el mAb utilizado se determinó en 3-4 desviaciones estándares por encima de la media de los niveles medidos en sueros obtenidos de pacientes no dosificados. Había una tasa de falsos positivos del 5 % y la sensibilidad del ensayo era de 500 ng/mL de suero puro. Se probó la especificidad del mAb y se determinó que detectaba anticuerpos anti-natalizumab, pero resultó ser insensible a anticuerpos monoclonales humanos irrelevantes. También se examinó la interferencia libre de fármacos con el ensayo. El ensayo mostró la presencia de interferencia libre de fármacos. Los resultados de una evaluación de la interferencia del ensayo de bloqueo por el fármaco libre se muestran en la Figura 2.

Bloqueo de ensayo para natalizumab

65 *Resultados*

Se compararon los resultados positivos de los ensayos de cribado y bloqueo. Había 217 ensayos de bloqueo positivos y 222 ensayos de cribado positivos, por lo tanto, había una diferencia de 5 % y un porcentaje de concordancia de 98 %. Por consiguiente, el ensayo de cribado proporciona una medida precisa de la respuesta inmune de un sujeto a natalizumab.

Ejemplo 3

Se realizó un ensayo de cribado (según se describe en los Ejemplos 1 y 2) en muestras de 625 sujetos a los que se había administrado natalizumab. Se examinó la presencia de una respuesta inmune a natalizumab en pacientes a los que se había administrado natalizumab. La incidencia de anticuerpos contra natalizumab en los pacientes examinados era: 91 % (569 pacientes) negativos a anticuerpos y 9 % (56 pacientes) positivos a "anticuerpo de unión" en cualquier punto temporal, con 3 % (19 pacientes) positivos "transitoriamente" y 6 % (37 pacientes) positivos a "persistentemente". Los pacientes positivos a transitorios tenían anticuerpos detectables (a una concentración de $>0,5 \mu\text{g/mL}$) en un solo punto temporal, pero negativos para anticuerpos en todos los otros puntos temporales. Los pacientes positivos a anticuerpos persistentes tenían anticuerpos detectables en dos o más puntos temporales que estaban separados por al menos 42 días, o en un solo punto temporal, sin muestras de seguimiento sometidas a ensayo.

La Figura 3 muestra el tiempo de primeros resultados positivos en los pacientes que desarrollaron cualquier anticuerpo. Un seis por ciento de los pacientes desarrolló anticuerpos "persistentes" contra natalizumab. Más del 90 % de los pacientes positivos a persistentes tenían primero anticuerpos detectables en la semana 12. Ningún sujeto se convirtió en positivo para los anticuerpos persistentes después de la semana 36. Los pacientes transitorios positivos tenían anticuerpos detectables en la semana 12, pero fueron posteriormente anticuerpos negativos.

Se analizaron los resultados para determinar la presencia de un efecto de los anticuerpos sobre la tasa de recaída del trastorno original en los pacientes tratados. La Figura 4 ilustra el efecto general de anticuerpos en la tasa de recaída. La tasa de recaída también se evaluó para los sujetos con respecto al tiempo transcurrido desde la administración de natalizumab. Las Figuras 5A-D representan la tasa de recaída a los 0-3 meses, 3-6 meses, 6-9 meses y 9-12 meses, respectivamente.

Resultados

Los resultados indicaron que no hay ningún efecto aparente de anticuerpos durante los tres primeros meses de tratamiento. De tres a seis meses, los pacientes positivos a anticuerpos "transitorios" mostraron una disminución en la eficacia del tratamiento con natalizumab. Los pacientes positivos a anticuerpos "persistentes" mostraron una pérdida de eficacia del tratamiento con natalizumab. De seis a doce meses, se restableció una plena eficacia en los pacientes positivos a anticuerpos "transitorios", pero no en pacientes positivos a anticuerpos "persistentes". En consecuencia, es importante identificar a los pacientes con anticuerpos positivos transitorios como población diana para el tratamiento continuado con natalizumab.

Equivalentes

Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no existe intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas.

REIVINDICACIONES

- 5 1.Un método para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa a natalizumab en un sujeto, el método comprende determinar si al menos dos muestras biológicas tomadas en diferentes puntos temporales de un sujeto al que se le ha administrado natalizumab contienen al menos un nivel umbral clínicamente significativo de 500 ng/ml en una muestra de suero de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab, en donde dichos puntos temporales están separados por al menos 42 días, y en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble en dichas al menos dos muestras es indicativa de una disminución de la eficacia o falta de eficacia del natalizumab.
- 10 2.El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab se determina mediante:
- 15 determinar un nivel de actividad de unión de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab en una primera alícuota de la muestra biológica; y
- determinar si la actividad de unión es específica para el natalizumab.
- 20 3.El método de la reivindicación 2, en donde la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda alícuota de la muestra biológica.
- 25 4.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando el nivel de actividad de unión con la actividad de unión de natalizumab marcado medida en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab no marcado.
- 30 5.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde un nivel de anticuerpo soluble que se une a natalizumab en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a natalizumab inmovilizado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de natalizumab soluble.
- 35 6.El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la cantidad de anticuerpo soluble frente a natalizumab se determina utilizando un ensayo ELISA de puente.
- 40 7.El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde un primer nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un primer inmunoensayo para una primera alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión a natalizumab se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda alícuota de la muestra biológica, en donde al segundo inmunoensayo se le añade una mayor cantidad de natalizumab soluble no marcado que al primer inmunoensayo, y en donde la presencia en la muestra biológica de al menos un nivel umbral de anticuerpo soluble que se une a natalizumab se indica si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia de actividad de unión para 500 ng/mL de un anticuerpo soluble que se une a natalizumab y el segundo nivel de actividad de unión es menor que un porcentaje predeterminado del primer nivel de actividad de unión.
- 45 8.El método de la reivindicación 7, en donde el primer y segundo inmunoensayos son ensayos ELISA puente.
- 50 9.El método de la reivindicación 7 u 8, en donde el primer y segundo ensayos comprenden natalizumab inmovilizado no marcado y natalizumab soluble marcado, en donde el natalizumab soluble marcado está marcado con una enzima, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo.
- 55 10.El método de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el primer y segundo inmunoensayos se realizan en volúmenes de reacción paralelos en un único sustrato de reacción.
- 11.El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la muestra biológica es una muestra de suero.
- 12.El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el sujeto es un paciente humano.
- 13.El método de la reivindicación 12, en donde el paciente tiene esclerosis múltiple, artritis reumatoide, o enfermedad de Crohn.

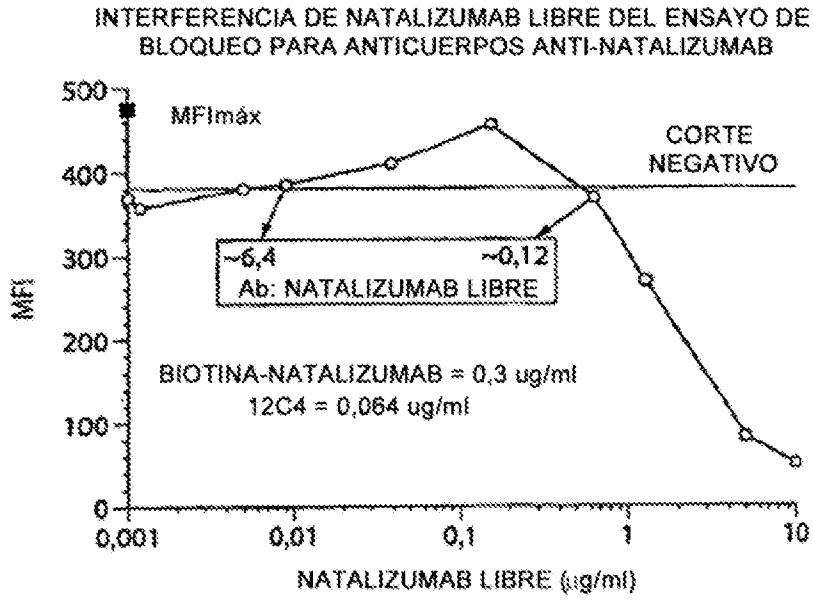


Fig. 2

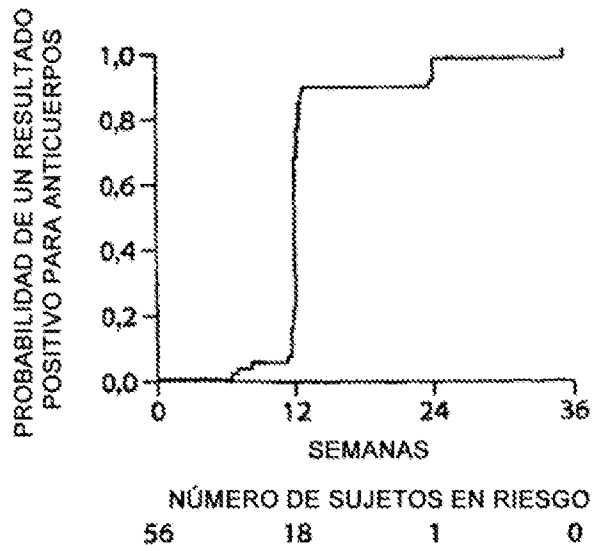


Fig. 3

EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS SOBRE LA TASA DE RECAÍDA

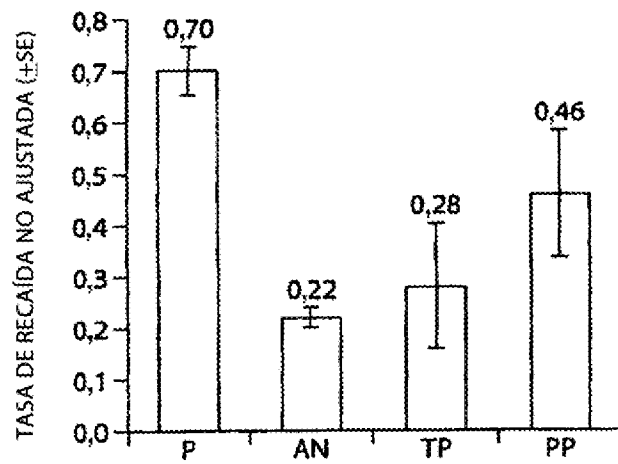


Fig. 4

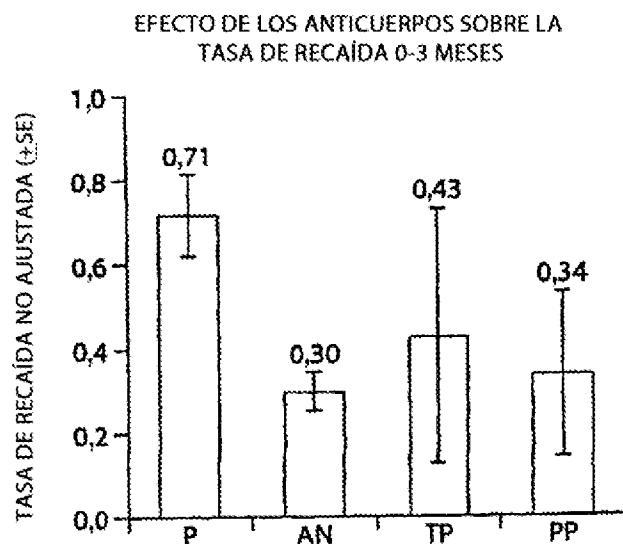


Fig. 5A

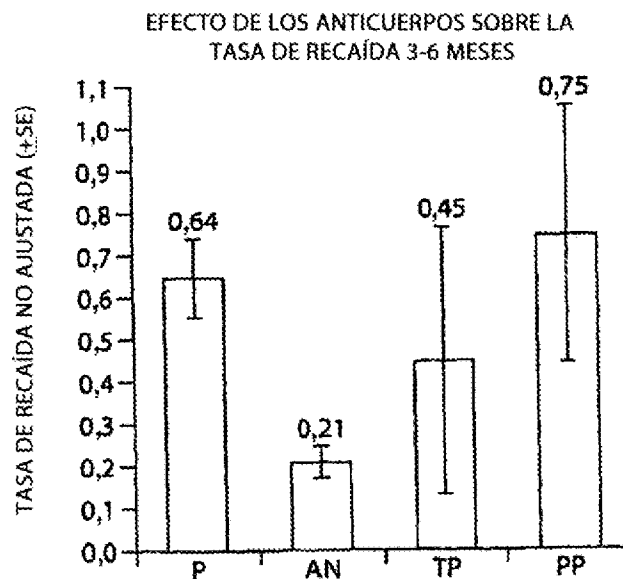


Fig. 5B

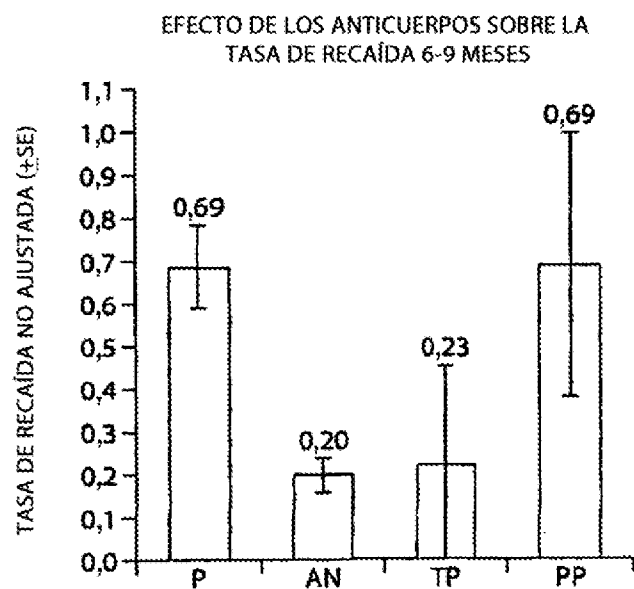


Fig. 5C

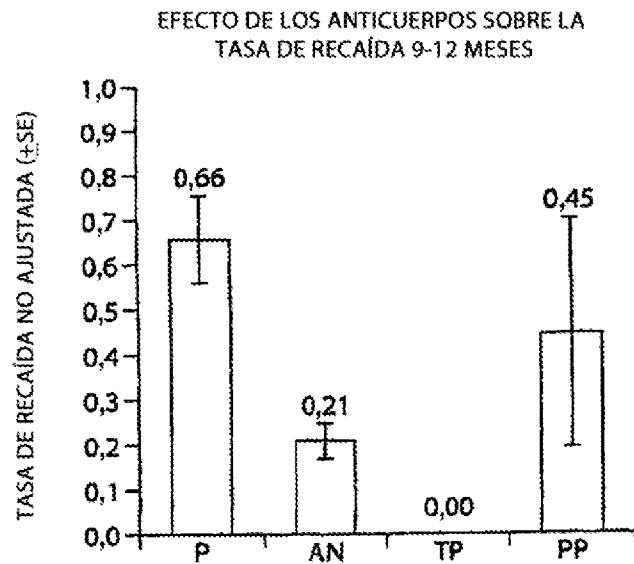


Fig. 5D