

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 915**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006** **E 06749243 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015** **EP 1872136**

54 Título: **Métodos y productos para evaluar una respuesta inmune a una proteína terapéutica**

30 Prioridad:

**04.04.2005 US 668404 P**

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

**29.05.2015**

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)  
14 CAMBRIDGE CENTER  
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:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 536 915 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para evaluar una respuesta inmune a una proteína terapéutica

**Solicitudes relacionadas**

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 (e) de la solicitud provisional de EE.UU. número de serie 60/668.404, presentada el 4 de abril de 2005.

**Campo**

La invención se refiere a la evaluación de pacientes en cuanto a una respuesta inmune a un agente terapéutico, y en particular a una proteína terapéutica, por ejemplo un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej. natalizumab).

**Antecedentes**

- 10 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. Productos terapéuticos biológicos disponibles incluyen AMEVIVE® (alefacept), ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan), ORTHOCLONE® (muromonab-CD3), ENBREL® (etanercept), REOPRO® (abciximab), RITUXAN® (rituximab), SIMULECT® (basiliximab), REMICADE®  
15 (infliximab), SYNAGIS® (palivizumab), HERCEPTIN® (trastuzumab), ZENAPAX® (daclizumab), CAMPATH® (alemtuzumab), MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicina), HUMIRA® (adalimumab), AVONEX® (Interferón beta-1a), 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 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.  
20

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.

**Sumario**

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

- En particular, la invención se refiere a un método para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa de un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto, comprendiendo el método determinar si al menos dos muestras biológicas, tomadas en diferentes momentos de un sujeto a quien se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4, contienen al menos un nivel umbral, clínicamente significativo, de aproximadamente 500 ng/ml en una muestra de suero de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde la presencia de al menos el nivel umbral del anticuerpo soluble en dichas al menos dos muestras es indicativo de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde los momentos están separados en al menos un mes y en donde la respuesta inmune clínicamente significativa indica una disminución de la eficacia o la falta de eficacia del anticuerpo de unión a VLA-4.  
30

- 35 La divulgación proporciona métodos y composiciones para la identificación, el seguimiento y/o la evaluación de una respuesta inmune a un agente terapéutico, p. ej., una proteína terapéutica, p. ej., un anticuerpo terapéutico. El hecho de que un paciente desarrolle cualesquiera anticuerpos a un agente terapéutico (tal como una proteína terapéutica o un anticuerpo terapéutico) puede o puede no correlacionarse con una respuesta clínica al agente terapéutico. Aspectos de la invención se basan, en parte, en el descubrimiento de un inesperado nivel de respuesta de anticuerpos que se puede utilizar como un umbral para la detección de una respuesta clínicamente significativa al agente terapéutico. 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 el agente terapéutico. 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 generalmente de al menos 2 desviaciones estándar por encima de un nivel de control negativo, p. ej., por encima de un nivel medio de pre-tratamiento 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 de 5% (p. ej., 1,645 desviaciones estándares por encima de la media) para respuestas inmunes observadas en pacientes que no habían recibido el agente terapéutico. De acuerdo con aspectos de la divulgación,  
40 la presencia de una respuesta inmune detectable en una muestra del paciente no es clínicamente significativa, a menos que la respuesta inmune alcance al menos un nivel de umbral predeterminado. La divulgación proporciona,  
45  
50

entre otros, métodos de identificar un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos a un agente terapéutico (p. ej., una proteína terapéutica, p. ej., un anticuerpo terapéutico), y métodos de identificación de pacientes que tienen una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a un agente terapéutico. La divulgación, en parte, también ofrece un nivel de umbral con el que identificar anticuerpos clínicamente significativos en un sujeto. De acuerdo con aspectos descritos en esta memoria, una respuesta inmune a un agente terapéutico (p. ej., natalizumab) puede no ser clínicamente significativa (p. ej., puede no mostrar una asociación significativa con la eficacia clínica reducida) a menos que la magnitud de la respuesta inmune alcance un nivel de umbral que puede ser predeterminado (p. ej., basado en respuestas inmunes obtenidas para diferentes grupos de pacientes). Sorprendentemente, los métodos descritos en esta memoria 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 al agente terapéutico. En contraposición, métodos de la divulgación se refieren a la detección de al menos un nivel de umbral de una respuesta inmune a un agente terapéutico, en 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 descritos en esta memoria son útiles para identificar a los pacientes con respuestas inmunes clínicamente significativas al proporcionar ensayos de rastreo para la detección de niveles de umbral de respuesta clínicamente significativos.

De acuerdo con la divulgación, una respuesta inmune clínicamente significativa a un agente terapéutico 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 eficacia del agente terapéutico. Generalmente, una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa indica una disminución de la eficacia o la falta de eficacia del agente terapéutico, o una reacción adversa al agente terapéutico. 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 agente terapéutico 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 agente terapéutico para ralentizar la progresión de la discapacidad en la escala 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 (resonancia magnética) 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 (p. ej., reacción de hipersensibilidad, p. ej., anafilaxis). Con la excepción de (f), este tipo de respuestas se evalúan dentro de un periodo determinado de tiempo después de la administración del agente, p. ej., dentro de 3 meses, 6 meses, 9 meses, o al menos un año.

En un aspecto, la invención proporciona métodos de identificar un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos a un agente terapéutico (p. ej., una proteína terapéutica, p. ej., un anticuerpo terapéutico). El método incluye (a) evaluar el nivel de anticuerpos anti-agente en una población control de pacientes que tienen un trastorno (p. ej., determinando el nivel medio o mediano de anticuerpos anti-agente 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 un agente terapéutico objeto durante al menos 3 meses, 6 meses o más); y (b) seleccionar un nivel de umbral de al menos 2 (p. ej., 2,5, 3, 4, 5 ó 6) desviaciones estándares por encima del nivel de anticuerpos anti-agente en la población de control. La presencia de al menos el nivel de umbral de anticuerpos anti-agente en un paciente al que se ha administrado el agente terapéutico (el paciente tratado) se correlaciona con una respuesta clínicamente significativa en el paciente tratado. Preferiblemente, el mismo reactivo de detección (p. ej., anticuerpo anti-agente marcado) se utiliza para evaluar al paciente tratado que el que se utiliza para identificar el nivel de anticuerpos anti-agente en la población de control. En una realización, el agente terapéutico es un anticuerpo terapéutico, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 21,6 humanizado, p. ej., natalizumab. En una realización, el trastorno es la esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el trastorno es una inflamación del sistema nervioso central (p. ej., 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 (p. ej., apoplejía o lesión de la médula espinal); enfermedad renal crónica; alergia (p. ej., asma alérgica); diabetes de tipo 1; trastornos inflamatorios del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa); miastenia grave; fibromialgia; una enfermedad artrítica (p. ej., artritis reumatoide o artritis psoriásica); un trastorno de

la piel inflamatorio/inmune (p. ej., psoriasis, vitiligo, dermatitis o liquen plano); lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; un cáncer hematológico (p. ej., mieloma múltiple, leucemia o linfoma); un cáncer sólido tal como un sarcoma o un carcinoma (p. ej., de pulmón, mama, próstata, o cerebro); o un trastorno fibrótico (p. ej., 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  $\alpha\beta 1\gamma$  o  $\alpha\beta 7$ .

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para identificar un paciente que tiene una respuesta de anticuerpos clínicamente significativa a una proteína terapéutica, p. ej., 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 (p. ej., 2, 5, 3, 4, 5 ó 6) desviaciones estándares por encima del nivel de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína terapéutica en una población de control (p. ej., 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). En una realización, la proteína terapéutica es un anticuerpo terapéutico, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 21,6 humanizado (al que también se alude como AN100226), p. ej., natalizumab. En una realización, el trastorno es la esclerosis múltiple. En algunas realizaciones, el trastorno es artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, el trastorno es la 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. 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 invención proporciona métodos para evaluar y/o modificar un régimen terapéutico basado en una respuesta inmune de un sujeto a un anticuerpo de unión a VLA-4.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto. Los métodos incluyen determinar si una muestra biológica de un sujeto, al que se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4, contiene un nivel de umbral clínicamente significativo de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde la presencia de al menos el nivel de umbral del anticuerpo soluble es indicativo de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4. En algunas realizaciones, una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4 se indica por la presencia de al menos el nivel de umbral de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 en al menos dos muestras biológicas tomadas del sujeto en diferentes momentos. En determinadas realizaciones, los momentos están separados por al menos un mes. En algunas realizaciones, al menos el nivel de umbral de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 está presente en dos muestras biológicas tomadas del sujeto en dos momentos consecutivos. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina: determinando un nivel de actividad de unión soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 en una primera parte alícuota de la muestra biológica; y determinando si la actividad de unión soluble es específica para el anticuerpo de unión a VLA-4. En determinadas realizaciones, la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda parte alícuota de la muestra biológica. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 marcado, medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado (p. ej., niveles medidos en presencia de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competitiva de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado). En determinadas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 inmovilizado medidos en presencia de dos o más cantidades diferentes de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble (p. ej., los niveles medidos en presencia de anticuerpo de unión a VLA-4 no soluble pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competitiva de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble). En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 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 anticuerpo de unión a VLA-4 marcado, medido en presencia de una segunda cantidad de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado. En algunas realizaciones, el primer y segundo niveles de actividad de unión se determinan en partes alícuotas primera y segunda de la muestra biológica. En determinadas realizaciones, la cantidad de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina utilizando un ensayo ELISA de puente. En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina en un primer inmunoensayo para una primera parte alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 se

determina en un segundo inmunoensayo para una segunda parte alícuota de la muestra biológica, en el que el segundo inmunoensayo se enriquece con una mayor cantidad de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble no marcado que el primer inmunoensayo, y en el que la presencia en la muestra biológica de al menos un nivel de umbral de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 se indica si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de la actividad de unión es inferior a un porcentaje predeterminado del primer nivel de la actividad de unión. En determinadas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de actividad de unión, medida para una cantidad de referencia de anticuerpo soluble, al anticuerpo de unión a VLA-4. En algunas realizaciones, la cantidad de referencia es de aproximadamente 500 ng/ml (p. ej., en una muestra de suero) de un anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4. Por ejemplo, la cantidad de referencia puede oscilar entre aproximadamente 400 ng/ml y aproximadamente 600 ng/ml (p. ej., aproximadamente 400 ng/ml, aproximadamente 425 ng/ml, aproximadamente 450 ng/ml, aproximadamente 475 ng/ml, 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 de aproximadamente 40 ng/ml a aproximadamente 60 ng/ml, p. ej., aproximadamente 50 ng/ml, de un anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4). Un nivel de referencia de la actividad de unión en un ensayo puede ser proporcionado por cualquier cantidad predeterminada de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 correspondiente a una dilución apropiada de la cantidad de referencia. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es un anticuerpo monoclonal murino humanizado contra VLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es una forma humanizada del anticuerpo murino mAb (anticuerpo monoclonal) 21.6, (p. ej., AN100226). En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 es un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab con una 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 puenteando los ensayos ELISA. En algunas realizaciones, el primer y el segundo ensayos comprenden un anticuerpo de unión a VLA-4 inmovilizado no marcado y un anticuerpo de unión a VLA-4 soluble marcado, en donde el anticuerpo de unión a VLA-4 soluble marcado está marcado con una enzima, un marcador fluorescente, un marcador de biotina (p. ej., el anticuerpo de unión a VLA-4 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. En algunas realizaciones, los momentos de al menos dos o más muestras biológicas obtenidas del sujeto están separados por al menos 15 días, 30 días, 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 de umbral clínicamente significativo de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 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 paralización de una terapia actual del sujeto. En algunas realizaciones, una terapia actual incluye la administración del anticuerpo de unión a VLA-4 al sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de selección de un régimen terapéutico para un sujeto. Los métodos incluyen someter a ensayo a un sujeto a quien se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4 en cuanto a la presencia de una respuesta inmune positiva a anticuerpo de unión a VLA-4 en primero y segundo momentos, seleccionar 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 está indicada por la presencia de al menos una cantidad umbral clínicamente significativa de la actividad de unión en una muestra biológica obtenida del sujeto en el momento. En algunas realizaciones, el primer y segundo momentos están separados por un período de tiempo clínicamente significativo. En determinadas realizaciones, el período de tiempo clínicamente significativo es de al menos 30 días. En algunas realizaciones, la terapia de anticuerpo de unión a VLA-4 se continúa si se detecta una respuesta inmune negativa en el segundo momento. En algunas realizaciones, se selecciona una terapia distinta de la terapia de anticuerpo de unión a VLA-4 si se detecta una respuesta inmune positiva tanto en el primer como en el segundo momentos. 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.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de seleccionar un régimen terapéutico para un sujeto. Los métodos incluyen detectar la presencia de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 en al menos dos muestras biológicas obtenidas de un sujeto, en donde al sujeto se le ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4, y las al menos dos muestras biológicas se obtienen del sujeto en instantes separados por al menos un intervalo de tiempo clínicamente significativo, y seleccionar un régimen terapéutico basado en la detección de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de VLA-4 en el sujeto en los instantes en los que se obtienen al menos dos muestras biológicas del sujeto. En algunas realizaciones, el intervalo clínicamente significativo que separa los instantes en los que las muestras se obtienen del sujeto es al menos de 15 días, 30 días, 45 días, 60 días, 90 días o más. En determinadas 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 paralización de una terapia actual del sujeto. En algunas realizaciones, una terapia actual incluye administrar al sujeto el anticuerpo frente a VLA-4. En algunas realizaciones, la detección de la presencia de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 comprende determinar si una muestra biológica obtenida de un sujeto al que se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4 contiene un nivel de umbral de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde la presencia de al menos el nivel de umbral del anticuerpo soluble es indicativa de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4. En determinadas realizaciones, al menos el nivel de umbral de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 está presente en dos muestras biológicas tomadas del sujeto en dos puntos de tiempo consecutivos. En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina mediante: determinando un nivel de actividad de unión soluble para el anticuerpo de unión a VLA-4 en una primera parte alícuota de la muestra biológica y determinando si la actividad de unión soluble es específica para el anticuerpo de unión a VLA-4. En algunas realizaciones, la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda parte alícuota de la misma muestra biológica. En determinadas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 marcado, medido en presencia de dos o más cantidades diferentes de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado (p. ej., niveles medidos en presencia de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competitiva de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado). En algunas realizaciones, un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 en la muestra biológica se determina comparando los niveles de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 inmovilizado, medido en presencia de dos o más cantidades diferentes de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble (p. ej., niveles medidos en presencia de ningún anticuerpo de unión a VLA-4 soluble pueden compararse con los niveles medidos en presencia de una cantidad competitiva de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble). En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión a un anticuerpo de unión a VLA-4 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 anticuerpo de unión a VLA-4 marcado, medido en presencia de una segunda cantidad de anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado. En determinadas realizaciones, el primer y segundo niveles de actividad de unión se determinan en partes alícuotas primera y segunda de la misma muestra biológica. En algunas realizaciones, la cantidad de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina utilizando un ensayo ELISA de puente. En algunas realizaciones, un primer nivel de actividad de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina en un primer inmunoensayo para una primera parte alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda parte alícuota de la muestra biológica, en donde el segundo inmunoensayo se enriquece con una mayor cantidad de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble no marcado que el primer inmunoensayo, y en donde la presencia en la muestra biológica de al menos un nivel de umbral de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 está indicada si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de actividad de unión es inferior a un porcentaje predeterminado del primer nivel de la actividad de unión. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de actividad de unión medida para una cantidad de referencia de anticuerpo soluble al anticuerpo de unión a VLA-4. En determinadas realizaciones, la cantidad de referencia es de aproximadamente 500 ng. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es un anticuerpo monoclonal murino humanizado frente a VLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es una forma humanizada del anticuerpo mAb murino 21.6. En algunas realizaciones, el anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab. En determinadas realizaciones, el primer y segundo inmunoensayos son ensayos ELISA de puente. En algunas realizaciones, el primer y el segundo ensayos comprenden un anticuerpo de unión a VLA-4 inmovilizado no marcado VLA-4 y un anticuerpo de unión a VLA-4 soluble marcado, en donde el anticuerpo de unión a VLA-4 soluble marcado está marcado con una enzima, un marcador fluorescente, un marcador de biotina (p. ej., el anticuerpo de unión a VLA-4 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 (p. ej., en pocillos separados de una placa de múltiples pocillos). En determinadas 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.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos de identificar un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos a un agente terapéutico de proteínas para un paciente que tiene un trastorno. Los métodos incluyen (a) evaluar el nivel de anticuerpos anti-agente en una población control de pacientes que tienen la enfermedad y que no han sido tratados con el agente y (b) seleccionar un nivel de al menos 2 desviaciones estándares por encima del nivel de anticuerpos anti-agente en la población control como un nivel de umbral clínicamente significativo de la respuesta de anticuerpos en pacientes que tienen la enfermedad y son tratados con el agente. En algunas realizaciones, el agente terapéutico de proteína es un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo.

De acuerdo con 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, en cuanto a 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 enfermedad. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica es un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por consiguiente, aspectos de la divulgación proporcionan métodos de detectar respuestas inmunes clínicamente significativas a un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto, determinando si una muestra biológica de un sujeto al que se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4 contiene un nivel de umbral de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde la presencia de al menos el nivel de umbral del anticuerpo soluble es indicativo de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4.

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

### **Breve Descripción de los Dibujos**

La Figura 1 ilustra la interferencia de natalizumab libre en un inmunoensayo.

- 15 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 como una 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.

- 20 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**

- 25 La divulgación se refiere, en parte, a métodos, composiciones y kits para detectar y monitorizar una respuesta inmune a una proteína terapéutica (p. ej., un anticuerpo terapéutico) que se administra a un sujeto. En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para la identificación de pacientes con una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo terapéutico. De acuerdo con la divulgación, 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 que 1,645 desviaciones estándares (p. ej., 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 agente terapéutico.

- 35 Determinados aspectos descritos en esta memoria se refieren a métodos para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa contra un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico que se administra a un sujeto. Aspectos de la divulgación son particularmente útiles para detectar y monitorizar una respuesta inmune en un sujeto que ha recibido al menos una dosis (p. ej., una dosis terapéutica) de un anticuerpo de unión a VLA-4. Aspectos de la divulgación incluyen identificar y/o monitorizar un sujeto con una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico, evaluar la respuesta inmune, y/o determinar un tratamiento clínico apropiado (p. ej., un régimen terapéutico particular), basado en la naturaleza y/o la extensión de la respuesta inmune. Información acerca de la respuesta de un sujeto a la administración de un anticuerpo de unión a VLA-4 se puede utilizar para ajustar, diseñar y/u optimizar un régimen terapéutico para el sujeto. Por consiguiente, un aspecto de la divulgación se refiere a identificar un sujeto que tiene una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. Otro aspecto de la divulgación se refiere a monitorizar la respuesta inmune de un sujeto a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a determinar las estrategias terapéuticas apropiadas para el tratamiento de determinadas enfermedades (p. ej., esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide, etc.) basadas en la respuesta inmune de un sujeto a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico.

- 50 Anticuerpos de unión a VLA-4 se pueden utilizar para tratar un cierto número de enfermedades y trastornos asociados con la inflamación. Tales trastornos incluyen, p. ej., la inflamación del sistema nervioso central (p. ej., 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, p. ej., apoplejía o lesión de la médula espinal; enfermedad renal crónica; alergia, p. ej., asma alérgica; diabetes

- tipo 1; trastornos inflamatorios del intestino, p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa; miastenia grave; fibromialgia; trastornos artríticos, p. ej., artritis reumatoide, artritis psoriásica; trastornos inflamatorios/inmunes de la piel, p. ej., psoriasis, vitiligo, dermatitis, liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjogren; cánceres hematológicos, p. ej., mieloma múltiple, leucemia, linfoma; cánceres sólidos, p. ej., sarcomas o carcinomas, p. ej., de pulmón, mama, próstata, cerebro; y trastornos fibróticos, p. ej., fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis proliferativa mesangial, glomerulonefritis crescéntica, 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  $\alpha 4\beta 7$ .
- En una realización, un anticuerpo de unión a VLA-4 es una versión humanizada del mAb murino 21.6, p. ej., natalizumab. 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., una versión humanizada del mAb murino 21.6 tal como natalizumab o AN100226) en un sujeto, y determinar si la respuesta es clínicamente significativa.
- Tal como se utiliza en esta memoria, "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.
- Tal como se utiliza en esta memoria, 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 (p. ej., aproximadamente 4 ó 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 (p. ej., 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. En una realización, un umbral clínicamente significativo para los anticuerpos anti-natalizumab es 500 ng/ml de suero del paciente (p. ej., un umbral de 50 ng/ml en un ensayo de suero 10 veces diluido).
- Tal como se utiliza en esta memoria, una respuesta inmune es una respuesta inmunogénica a una proteína terapéutica caracterizada por niveles incrementados 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 (p. ej., reconocen específicamente) y se unen a la proteína, p. ej., un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej. natalizumab). 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, 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 (p. ej., un anticuerpo de unión a VLA-4) que fue administrada al sujeto. En algunas realizaciones, los anticuerpos inducidos pueden ser detectados como anticuerpos solubles que están presentes en una muestra biológica (p. ej., una muestra de suero).
- Aspectos descritos en esta memoria 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. Tal como se utiliza en esta memoria, la actividad de unión se refiere a la cantidad detectada de unión a una proteína terapéutica en una muestra biológica. Tal como se describe en esta memoria, 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 tal como se describe en esta memoria.
- 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 descrito en esta memoria. 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, p. ej., anticuerpo de unión a VLA-4. Sorprendentemente, la presencia de cualquier respuesta inmune detectable a un anticuerpo terapéutico no es clínicamente significativa. De acuerdo con la divulgación, los métodos basados en el rastreo 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 que 1,645 desviaciones estándares por encima de un nivel medio de actividad de unión presente en sujetos que no han recibido el anticuerpo terapéutico. De acuerdo con la invención, la tasa de falsos positivos teórica de 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. Por lo tanto, a pesar de que el umbral clínicamente significativo debe fijarse en más de 1,645 desviaciones estándares por encima de un nivel de referencia pre-inmune, el umbral no debe ser tan alto como para reducir la eficiencia de detección de positivos reales.

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, p. ej., 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 momentos (por ejemplo, a los 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más momentos) separados por intervalos de tiempo clínicamente significativos. Sin embargo, posteriormente el paciente puede ser reclasificado como transitorio si el paciente da negativo para una respuesta inmune en un ensayo subsiguiente. Intervalos de tiempo clínicamente significativos pueden ser de al menos una semana, un mes, un año o más. Por ejemplo, el intervalo de tiempo umbral puede estar entre 30 y 180 días, aproximadamente 60 días, aproximadamente 42 días, etc. La presencia de una respuesta inmune transitoria puede ser indicativa de una reducción transitoria en la eficacia terapéutica. La presencia de una respuesta inmunitaria 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.

Tal como se utiliza en esta memoria, 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 momento 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. Ejemplos de procesos terapéuticos, aunque no pretende ser limitante, incluyen el uso de dispositivos médicos o cirugía. Por consiguiente, determinar o alterar un régimen terapéutico de un anticuerpo de unión a VLA-4 puede implicar determinar o alterar la cantidad de la dosis del anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico que se administra a un sujeto, la frecuencia de administración, la vía de administración, la duración del tratamiento (p. ej., el número de dosis que se administran), ya sea o no para combinar un tratamiento con anticuerpos VLA-4 de unión con uno o más tratamientos adicionales, si se debe interrumpir un tratamiento con anticuerpos de unión a VLA-4, si desea utilizar un anticuerpo de unión a VLA-4 diferente, y/o si se debe utilizar una combinación de anticuerpos de unión a VLA-4, etc. En una realización, la invención puede implicar determinar si desea utilizar una alternativa terapéutica a un anticuerpo de unión a VLA-4, p. ej., si se debe utilizar interferón beta.

Aspectos de la divulgación se refieren a detectar y/o monitorizar una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en un ser humano (p. ej., un paciente humano). Por consiguiente, tal como se utiliza en esta memoria, 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab). Un sujeto puede ser un paciente que está siendo (o ha sido) tratado crónicamente con un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab). Un sujeto puede ser un paciente que está siendo (o ha sido) tratado repetidamente con un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab). Tal como se utiliza en esta memoria, un tratamiento crónico puede implicar la administración de un anticuerpo de unión a VLA-4 a lo largo de un período prolongado de tiempo (p. ej., para controlar o gestionar los síntomas de una enfermedad o afección inflamatoria durante el período de tiempo). En contraposición, un tratamiento repetido puede implicar la repetición de un curso de tratamiento (p. ej., un período de administración) con un anticuerpo de unión a VLA-4 cuando sea necesario (p. ej., para tratar síntomas de una enfermedad inflamatoria cuando empeoran o "re-agudizan"). En una realización, se

considera que un paciente está siendo sometido a un tratamiento repetido cuando el sujeto se vuelve a tratar con un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico por primera vez. Se entenderá por los expertos ordinarios 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. Se debe apreciar que los aspectos descritos en esta memoria 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 administrado según se describe en esta memoria.

En un aspecto descrito en esta memoria, 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 anticuerpo de unión a VLA-4 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, p. ej., el nivel umbral se determina según se describe en esta memoria. Una respuesta inmune clínicamente relevante puede tener implicaciones clínicas, p. ej., indica que el sujeto debe ser evaluado para determinar si la dosificación del anticuerpo de unión a VLA-4 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 descrito en esta memoria, puede realizarse un ensayo cuantitativo en una muestra biológica para cuantificar la cantidad de anticuerpos (p. ej., el título de anticuerpos) contra un anticuerpo de unión a VLA-4 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.

De acuerdo con la divulgación, una respuesta inmune contra un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab) se puede evaluar en un sujeto a lo largo del tiempo mediante la realización de ensayos en muestras obtenidas del sujeto en diferentes momentos. La estrategia de evaluación múltiple permite la monitorización de una respuesta inmune de un sujeto al anticuerpo de unión a VLA-4 y puede permitir que el régimen de unión del anticuerpo a VLA-4 terapéutico que 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 respuesta inmune al anticuerpo de unión a VLA-4 que se ha administrado al sujeto, y en un segundo tiempo subsiguiente, 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 del anticuerpo en muestras de un sujeto a lo largo del tiempo mediante determinaciones secuenciales a intervalos de tiempo predeterminados permite la monitorización de una respuesta inmune a un tratamiento con anticuerpos de unión a VLA-4 terapéuticos. La detección y monitorización de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 administrado también permite el ajuste en el tratamiento global del sujeto, por ejemplo ajustando (p. ej., modificando o suspendiendo) el tratamiento con el anticuerpo de unión a VLA-4 y/o ajustando terapias adicionales (p. ej., terapias que modulan la respuesta inmune del sujeto).

La selección o el ajuste de un régimen terapéutico puede basarse en una determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 en al menos dos muestras biológicas obtenidas a diferentes tiempos de un sujeto al que se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4. La determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa de un sujeto al anticuerpo de unión a VLA-4 puede indicar que sería beneficioso iniciar, continuar, ajustar o detener la administración de un agente farmacéutico específico y/o la terapia para el sujeto. Por ejemplo, la determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 en al menos dos muestras biológicas obtenidas de un sujeto puede ser la base para alterar 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto puede sugerir iniciar o continuar un tratamiento con un agente farmacéutico inmunosupresor, etc. En algunas realizaciones, se puede seleccionar un régimen terapéutico inicial en base a la determinación de una respuesta inmune inicial a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una sola muestra biológica obtenida de un sujeto que ha sido tratado con un anticuerpo de unión a VLA-4. Después de la selección y la administración de un régimen terapéutico seleccionado, se puede hacer una determinación subsiguiente de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una o más muestras biológicas subsiguientes obtenidas del sujeto y puede proporcionar una base para ajustar el régimen terapéutico.

La determinación de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto en diferentes momentos puede compararse para evaluar o medir la aparición, el progreso o la regresión de una respuesta inmune en el sujeto a la terapia de anticuerpo de unión a VLA-4. La aparición de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto puede caracterizarse por un nivel o niveles incrementados de al menos un anticuerpo que se une a un anticuerpo de unión a VLA-4, y puede ir acompañada de la aparición de uno o más cambios fisiológicos o síntomas en el sujeto. El progreso de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico puede caracterizarse por un incremento adicional en el nivel del al menos un anticuerpo que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. 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 (p. ej., un incremento, disminución o modificación) de uno o más de los cambios o síntomas fisiológicos iniciales o de la aparición de uno o más cambios fisiológicos o síntomas adicionales. La regresión de una respuesta inmune en un sujeto a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico puede caracterizarse por una disminución en el o los niveles de uno o más anticuerpos que se unen a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. La regresión de una respuesta inmune también puede ir acompañada de una disminución de determinados cambios o síntomas fisiológicos. Sin embargo, se debe apreciar que la aparición, el progreso y/o la regresión de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico pueden ser clínicamente asintomáticos, distintos de los cambios detectables en los niveles de anticuerpos.

El progreso y la regresión de una respuesta inmune clínicamente significativa a un anticuerpo de unión a VLA-4 pueden generalmente ser indicados por el aumento o la disminución, respectivamente, del nivel de un anticuerpo que se une a un anticuerpo de unión a VLA-4 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 está presente en una primera muestra de un sujeto y se determina que un umbral clínicamente significativo de anticuerpos que se unen específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 está presente en una segunda o subsiguiente muestra del sujeto, esto puede indicar la aparición de una respuesta inmune al anticuerpo de unión a VLA-4 en el sujeto. El progreso de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto puede ser indicado por la presencia de un mayor nivel de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una segunda o subsiguiente muestra de un sujeto en comparación con el nivel presente en la muestra inicial o previa del sujeto. La regresión de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser indicada por la presencia de un nivel inferior de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una segunda o subsiguiente muestra de un sujeto en comparación con el nivel presente en la muestra inicial o previa del sujeto.

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 un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico está por encima de un umbral clínicamente significativo predeterminado. En algunas realizaciones, un umbral clínicamente significativo es más de 1,645 (p. ej., más de 2, 3, 4, 5 ó 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 anticuerpo VLA-4 terapéutico). En algunas realizaciones, los sujetos son sujetos sanos, y en determinadas realizaciones los sujetos son pacientes enfermos (p. ej., pacientes con esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide). En una realización, 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.

En una realización, los sujetos a los que se han administrado un anticuerpo de unión a VLA-4 pueden ser categorizados como que caen en una al menos una de tres categorías. Una categoría, a la que se alude en esta memoria como "negativa", incluye sujetos en los que las actividades de unión están en o por debajo de niveles de umbral clínicamente significativos (p. ej., un sujeto en el que los anticuerpos contra un anticuerpo de unión a VLA-4 no se detectan a una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml en una muestra biológica (p. ej., suero) obtenida del sujeto). Una segunda categoría, a la que se alude en esta memoria como "transitoria positiva" incluye sujetos en los que se detectan actividades de unión por encima de un nivel de umbral sólo un número limitado de veces, p. ej., en uno, dos, tres, cuatro, cinco momentos (p. ej., anticuerpos contra un anticuerpo de unión a VLA-4 no se detectan en un momento subsiguiente separado por al menos 30 días a partir del último momento). Una tercera categoría, a la que se alude en esta memoria como "positiva persistente" incluye sujetos en los que se detectan actividades de unión por encima de un nivel de umbral un número predeterminado de veces, p. ej., en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más momentos separados por un intervalo de tiempo umbral mínimo (p. ej., un sujeto en el que se detectan anticuerpos contra un anticuerpo de unión a VLA-4 se detectan a una concentración de al menos aproximadamente 500 ng/ml en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más muestras biológicas obtenidas del sujeto en momentos separados por al menos un intervalo de umbral). En algunas realizaciones, el intervalo de umbral es al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más días. Pacientes que son "persistentes positivos" pueden tener una pérdida de eficacia de la terapia de VLA-4 de anticuerpos, mientras que los pacientes "transitorios positivos" tienen plena eficacia restaurada después de sólo una disminución temporal de la eficacia.

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 momentos, p. ej., al menos dos momentos.

5 En una realización, se puede cambiar una terapia en base a una determinación de un solo resultado positivo. Aún 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.

10 Tal como se comentó 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, 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.

15 De acuerdo con la invención, el riesgo de una reducción en la eficacia terapéutica (p. ej., 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 (p. ej., en riesgo de una recaída) si se detecta un resultado positivo dentro de los 3 meses de la primera administración de un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. En una  
20 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 del anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. 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  
25 persistentemente positiva, una terapia de anticuerpo terapéutico no necesita interrumpirse, a menos que se vuelva ineficaz (p. ej., una pérdida de sustancialmente todos eficacia) o causa otras manifestaciones clínicas negativas.

30 En algunas realizaciones, el tratamiento con un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico 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 más factores distintos de una respuesta inmune del paciente al agente terapéutico. Un paciente no será un transitorio positivo si no se detecta una respuesta positiva. Por consiguiente, se puede considerar un tratamiento alternativo.

35 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 anticuerpo de unión a VLA-4). Sin embargo, no es necesaria una comparación con una cantidad pre-inmune tal como se comenta en esta memoria, 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

40 De acuerdo con aspectos descritos en esta memoria, se somete a ensayo una cantidad umbral de una respuesta de anticuerpos. Tal como se comenta en esta memoria, se puede realizar un ensayo cualitativo. Alternativamente, puede llevarse a cabo un ensayo cuantitativo, y en una realización los datos cuantitativos puede traducirse en una salida cualitativa (p. ej., si la cantidad de anticuerpo es mayor que una cantidad umbral).

45 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. 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, p. ej., a un anticuerpo de unión a VLA-4, o fragmentos de los mismos. Por ejemplo, técnicas de inmunodetección pueden incluir, pero no se limitan a ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) (que incluyen, pero no se  
50 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 transferencias Western. Además, 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 determinados ejemplos proporcionados en esta memoria se refieren a ensayos que utilizan un anticuerpo de unión a VLA-4 inmovilizado unido a una superficie (p. ej., un ELISA), un experto ordinario en la técnica reconocerá que la divulgación en algunos aspectos puede incluir ensayos sin unión superficial de un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., ensayos de citometría de flujo, etc.). Otras técnicas de inmunodetección pueden

incluir ensayos inmunoradiométricos (IRMA), fluorometría en tiempo retardado (TRF) o electroquimioluminiscencia (ECL). Un cierto número de métodos de inmunodetección útiles han sido descritos en la bibliografía científica tal como, p. ej., Doolittle M H y Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B y Galand P, 1993; De Jager R et al., 1993; y Nakamura et al., 1987.

- 5 En un aspecto, se realiza un ensayo para detectar la presencia de una actividad de unión para un anticuerpo de unión a VLA-4 en una muestra biológica. En una realización, la especificidad de la actividad de unión se puede evaluar determinando si la actividad de unión observada es específica para el anticuerpo de unión a VLA-4 o si es debida a un factor de interferencia que pueda estar presente en la muestra biológica tal como un factor reumatoide u otro factor de unión.
- 10 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. Los restos de inmovilización y detección pueden ser, respectivamente, anticuerpos de unión a VLA-4 inmovilizados no marcados y no marcados inmovilizados según se describe en esta memoria. En una realización, un resto de inmovilización puede estar unido
- 15 a un sustrato o superficie sólido (p. ej., 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 (p. ej., una perla magnética) a través de un enlace covalente o de otro tipo (p. ej., 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 (p. ej., un electrodo).

- Un resultado positivo se puede determinar si la cantidad detectada de la actividad de unión (p. ej., 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
- 25 competencia en el ensayo. El resto de competencia puede ser un anticuerpo de unión a VLA-4 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
- 30 actividad de unión es no específica y ahora se determina que el resultado positivo inicial es un resultado negativo para una respuesta inmune.

- De acuerdo con 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
- 35 une a un anticuerpo de unión a VLA-4. Por ejemplo, puede establecerse un nivel de umbral utilizando entre 10 ng y 1.000 ng (p. ej., aproximadamente 50 ng o aproximadamente 500 ng) de un anticuerpo 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
- 40 referencia que se utiliza para determinar el umbral (p. ej., 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.

- En una realización, la especificidad de la actividad de unión puede ser evaluada enriqueciendo el ensayo con una
- 45 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 (p. ej., aproximadamente 50 ng o aproximadamente 500 ng) de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble no marcado por ml de ensayo. Sin embargo, se pueden utilizar otras cantidades de resto de competencia.

- Por consiguiente, en algunas realizaciones descritas en esta memoria, un primer nivel de actividad de unión, en una
- 50 muestra biológica, al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina en un primer inmunoensayo para una primera parte alícuota de la muestra biológica, y un segundo nivel de actividad de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina en un segundo inmunoensayo para una segunda parte alícuota de la muestra biológica, en donde el segundo inmunoensayo se enriquece con una mayor cantidad de anticuerpo de unión a VLA-4 soluble no marcado que el primero inmunoensayo, y se indica la presencia de al menos un nivel de umbral de anticuerpo soluble contra
- 55 el anticuerpo de unión a VLA-4 si el primer nivel de actividad de unión es mayor que un nivel de referencia y el segundo nivel de actividad de unión es inferior a un porcentaje predeterminado del primer nivel de la actividad de unión.

Un experto ordinario 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. Por ejemplo, según se describe arriba, la evaluación y/o monitorización puede llevarse a cabo determinando si la cantidad de un anticuerpo se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 utilizando un "corte" de nivel sencillo. Tal como se utiliza en esta memoria, el nivel de corte de unión es el nivel en o por encima del cual la detección incrementada 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 en la muestra. En otras realizaciones, la identificación de una respuesta inmune al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico puede llevarse a cabo cuantitativamente para determinar un título de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una muestra biológica de un sujeto.

En un aspecto descrito en esta memoria, un ensayo de inmunodetección puede ser un ELISA. Tal como se entenderá por los expertos ordinarios en la técnica, el término "ELISA" abarca un cierto número de protocolos para la inmunodetección. Por ejemplo, los métodos ELISA incluyen ELISAs sándwich, ELISAs 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.

En algunas realizaciones descritas en esta memoria, un ensayo ELISA incluye el uso de un anticuerpo de unión a VLA-4 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. En algunas realizaciones, una primera parte alícuota de una muestra biológica se somete a ensayo utilizando un ensayo ELISA para determinar la presencia o ausencia de una cantidad umbral de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 diana inmovilizado y una segunda parte alícuota de la misma muestra biológica también se somete a ensayo utilizando un ELISA para confirmar si un nivel de umbral (o por encima del umbral) de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 diana inmovilizado es o no indicativo de un anticuerpo específico para el anticuerpo de unión a VLA-4. En un aspecto descrito en esta memoria, el nivel umbral de actividad de unión soluble en una parte alícuota es aproximadamente igual al nivel de la actividad de unión presente en una muestra de control o de referencia que comprende al menos aproximadamente 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. En una realización, el nivel de 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. El anticuerpo de referencia puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo anti-natalizumab murino (p. ej., 12C4 descrito en Sheremata et al, 1999, Neurology 52, páginas 1072-1074, que se incorpora aquí como referencia). Según se describe en esta memoria, si el nivel de unión al anticuerpo de unión a VLA-4 diana inmovilizado que está al menos en el nivel de umbral, y se determina que la actividad de unión soluble es la actividad de unión de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4, entonces se identifica una respuesta inmune al anticuerpo de unión de VLA-4 en el sujeto.

En general, métodos ELISA útiles en los métodos de la divulgación pueden incluir obtener una muestra biológica de un sujeto al que se ha administrado un anticuerpo terapéutico tal como un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej. natalizumab, etc.) y poner en contacto una parte alícuota de la muestra con un anticuerpo de inmovilización. En algunas realizaciones, el anticuerpo de inmovilización puede ser el mismo anticuerpo de unión a VLA-4 que se administró al sujeto. 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 (p. ej., un segundo anticuerpo marcado). 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 (p. ej., 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 descritas en esta memoria, un ensayo ELISA incluye el uso del anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. En algunas realizaciones, una primera parte alícuota de una muestra biológica se somete a ensayo utilizando un ensayo ELISA para determinar la presencia o ausencia de una cantidad umbral de actividad de unión para el anticuerpo de unión a VLA-4 diana inmovilizado, y una segunda parte alícuota de la misma muestra biológica se somete a ensayo utilizando un ELISA para confirmar si un nivel umbral (o por encima del umbral) de la unión al anticuerpo de unión a VLA-4 diana inmovilizado es o no indicativo de un anticuerpo específico para el anticuerpo de unión a VLA-4. En un aspecto descrito en esta memoria, el nivel umbral de actividad de unión soluble en una parte alícuota es aproximadamente igual al nivel de la actividad de unión presente en una muestra de control o de referencia que comprende al menos aproximadamente 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. En una realización, el nivel de 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. El anticuerpo de referencia puede ser policlonal o monoclonal. El anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo anti-natalizumab murino (p. ej., 12C4 descrito en Sheremata et al., 1999, *Neurology* 52, página 1072).

5 Un anticuerpo de referencia que se une a un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab (por ejemplo, un anticuerpo que se une a natalizumab con alta afinidad, p. ej., con afinidad nanomolar). En algunas realizaciones, un anticuerpo de referencia que se une a natalizumab puede bloquear la unión de natalizumab a VLA-4 (p. ej., 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 Maine Biotechnology Services, Inc, Portland ME; véase, p. ej., Sheremata et al, 1999, *Neurology* 52, página 1072.). 12C4 es un anticuerpo bloqueante que bloquea la unión de natalizumab a VLA-4. En algunas realizaciones, el anticuerpo de referencia compite 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 se determina utilizando un ELISA de puente. En un ELISA de puente, los anticuerpos que se unen específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., de una muestra biológica) actúan como un puente entre el anticuerpo de unión a VLA-4 revestido en una placa de ELISA y el anticuerpo de unión a VLA-4 marcado de forma detectable en disolución (p. ej., 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 parte 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 parte alícuota de la muestra biológica al anticuerpo inmovilizado (p. ej., un anticuerpo de unión a VLA-4 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 parte alícuota de la muestra biológica. La molécula o compuesto con actividad de unión soluble puede ser un anticuerpo inducido que se une específicamente al anticuerpo de unión a VLA-4, o puede ser un anticuerpo o receptor endógeno no inducido que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., un factor reumatoide [RF] o un anticuerpo anti-Fab). Después de este tiempo, la mezcla de muestra y anticuerpo (p. ej., 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. Para esta etapa de confirmación, se puede preparar y someter a ensayo una segunda parte alícuota de la muestra biológica según se describe para la primera parte alícuota, excepto que también se añade al ensayo (p. ej., el ensayo de ELISA) una cantidad predeterminada del anticuerpo de unión a VLA-4 de competencia no inmovilizado y no marcado. 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 anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado reduce la señal en más de una cantidad porcentaje esperada, entonces la actividad de unión del umbral (o por encima del umbral) se juzga como un indicador positivo en cuanto a la presencia de un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. En contraposición, si la presencia del anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado reduce la señal en menos de una cantidad porcentaje esperada, entonces la actividad de unión del umbral (o por encima del umbral) se juzga como negativa para un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4. Se debe apreciar que una señal no específica puede deberse a factores en suero distintos de un anticuerpo que se une al anticuerpo de unión a VLA-4. Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "enriquecer" o "enriquecido" se refieren a la adición de un anticuerpo de unión a VLA-4 de competencia soluble no marcado (o marcado de forma diferente) a una muestra o ensayo.

Tal como se utiliza en esta memoria, el "porcentaje de reducción" es el porcentaje del nivel de unión determinado en la primera parte alícuota. Así, por ejemplo, si hay una indicación de aproximadamente 500 ng/ml equivalentes de una molécula o compuesto con actividad de unión en la primera parte alícuota y la inclusión del anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado en la segunda parte alícuota reduce la cantidad de señal en más de un 40-90% (p. ej., 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. Pero si la inclusión del anticuerpo de unión a VLA-4 no marcado en la segunda parte 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. En algunas realizaciones, el anticuerpo de competencia puede ser natalizumab no marcado soluble. En algunas realizaciones, el natalizumab no marcado soluble se puede utilizar a una concentración final de aproximadamente 100 µg/ml. Sin embargo, se puede utilizar cualquier concentración de natalizumab no marcado libre si resulta en una disminución predeterminada (p. ej., aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, o más) en la señal obtenida para una muestra de control que contiene 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 (p. ej., 12C4). Tal como se indica en esta memoria, la presencia en una muestra biológica de un paciente de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 indica que el sujeto tiene una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4.

En un ELISA "sándwich" ilustrativo, un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico (p. ej., natalizumab) se puede utilizar como el anticuerpo diana y se puede inmovilizar sobre una superficie seleccionada que exhibe afinidad por proteínas tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno. A continuación, una muestra de un sujeto que ha tenido al menos una administración de un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico, p. ej., 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser confirmada según se describió anteriormente en esta memoria.

Como se entenderá por los expertos ordinarios en la técnica, a pesar de las características individuales (p. ej., las etapas confirmatorias descritas en esta memoria), en general, los ELISAs 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 disolución 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. Los pocillos de la placa se lavarán a continuación para separar el material adsorbido de forma incompleta. 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 adsorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y reduce así el fondo provocado por la unión no específica de antisuero 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 (p. ej. 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., el mismo anticuerpo de unión a VLA-4 al utilizado para el anticuerpo diana).

Tal como se utiliza en esta memoria, 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 0,5M.

Tal como se utiliza en esta memoria, 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 disolución tal como PBS/Tween, TBS/Tween, o tampón borato, que también puede incluir NaCl hasta 0,5M. Después de la formación de complejos inmunes específicos entre la muestra de ensayo y el anticuerpo diana, y del subsiguiente lavado, se puede determinar la

presencia de incluso cantidades diminutas de complejos inmunes. Se entenderá que en los métodos de la invención 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. Así, 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 (p. ej., incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una disolución 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 descritos en esta memoria. 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. Un experto ordinario 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 al anticuerpo de unión a VLA-4, de manera que cuando se trata en las mismas condiciones que las muestras de ensayo (p. ej., 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 al anticuerpo de unión a VLA-4. Un control negativo de este tipo, cuando se trata en las mismas condiciones que la muestra de ensayo (p. ej., 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 procesos. Revestimiento de los pocillos de una placa de ELISA con una disolución de aproximadamente 0,25 µg/mL de patrón 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 rastreo 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 rastreo 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 100 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N 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 esta memoria pueden estar empaquetados en un kit que puede ser producido comercialmente para detectar la presencia de y/o medir un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una muestra biológica tal como se describe en esta memoria.

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 esta memoria para una proteína terapéutica particular), muestras de materiales ensayados en paralelo con los materiales experimentales. Ejemplos incluyen muestras de control negativo (p. ej., generadas a través de la fabricación) para ser ensayadas en paralelo con las muestras experimentales.

Tal como se utiliza en esta memoria, una muestra biológica puede ser, pero no está limitada a cualquiera de los siguientes: un fluido corporal de un sujeto, incluyendo sangre, suero, plasma, orina, saliva, derrames pleurales, heces, líquido sinovial, fluido cerebro-espinal, mucus e infiltraciones de tejidos. Fluidos corporales preferidos incluyen sangre, plasma y suero. Tal como se utiliza en esta memoria, pueden obtenerse muestras biológicas utilizando métodos bien conocidos por los expertos ordinarios 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 fresco o puede haber sido almacenada bajo condiciones adecuadas (p. ej., 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 un agente terapéutico. Sin embargo, un agente terapéutico puede tener una característica en la semivida in vivo, y la cantidad de agente terapéutico libre que está presente en una muestra biológica disminuirá típicamente en función del tiempo después de la administración del agente al sujeto. La presencia de agente terapéutico 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 agente terapéutico 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 subsiguiente 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 un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., 300 mg de natalizumab) resulta en un valle aproximadamente 30 días después de una administración e inmediatamente antes de una administración subsiguiente. 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 agente terapéutico libre en la muestra biológica. Cuando se comparan los niveles de actividad de unión para diferentes muestras tomadas en diferentes momentos, puede ser particularmente importante obtener cada una de las muestras de una fase similar en el ciclo de tratamiento (p. ej., 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 agente terapéutico libre en las muestras biológicas.

Se debe apreciar que las muestras biológicas se pueden diluir antes de ser sometidas a ensayo (p. ej., 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 descritas en esta memoria, se utilizan una o más partes alícuotas de una muestra biológica. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "parte alícuota" significa una porción o parte de la muestra biológica. En algunas realizaciones, se pueden tomar dos o más partes alícuotas de una muestra biológica obtenida de un sujeto y las partes alícuotas se pueden someter a ensayo utilizando métodos de la invención para determinar la presencia de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en el sujeto. Por ejemplo, se pueden tomar dos partes alícuotas sustancialmente equivalentes de una muestra biológica obtenida de un sujeto al que se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab), y se puede detectar un nivel de actividad de unión soluble en una parte alícuota (p. ej., una "primera" parte alícuota) se puede determinar. Adicionalmente, la otra parte alícuota (p. ej., la "segunda" parte alícuota) se puede evaluar utilizando los métodos de la invención para determinar si la actividad de unión soluble detectada en la primera parte alícuota, que también estaría presente en la segunda parte alícuota en virtud de su origen de muestra común, es un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4. En algunas realizaciones, si al menos un nivel umbral de unión está presente en la primera parte alícuota y se determina que la actividad de unión soluble es la actividad de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4, se identifica que está presente en el sujeto una respuesta inmune al anticuerpo de unión a VLA-4.

#### Anticuerpos de Unión a VLA-4

Aspectos de la divulgación se refieren a un ensayo o ensayos de detección para identificar y/o monitorizar una respuesta inmune a uno o más anticuerpos de unión a VLA-4 terapéuticos que se administran a un sujeto. En determinados aspectos descritos en esta memoria, 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. Según se describe en esta memoria, un resto de inmovilización se puede utilizar para inmovilizar un anticuerpo inducido (p. ej., un anticuerpo de suero) que se une al anticuerpo de unión a VLA-4. 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 un anticuerpo de unión a VLA-4. Por consiguiente, los restos de inmovilización y detección pueden ser el mismo anticuerpo de unión a VLA-4 que se administró al sujeto (p. ej., el resto de inmovilización puede ser una forma inmovilizada del anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico que se administró al sujeto, y el resto de detección puede ser una forma marcada del anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico 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 del anticuerpo de unión a

VLA-4 terapéutico 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 (p. ej., anticuerpos séricos) contra el anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico. 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 al anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico para determinar la especificidad de la actividad de unión detectada en el ensayo.

De acuerdo con aspectos descritos en esta memoria, uno cualquier o más anticuerpos de unión a VLA-4 (incluyendo natalizumab y/o anticuerpos de unión a VLA-4 relacionados) se pueden utilizar terapéuticamente. Por consiguiente, uno cualquiera o más de los anticuerpos de unión a VLA-4 se pueden utilizar como restos de inmovilización, detección y/o competencia en un ensayo de detección de la divulgación. En una realización, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser un anticuerpo IgG (p. ej., un anticuerpo IgG4). En otra realización, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser policlonal o monoclonal. En todavía otra realización, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser una versión humanizada de un anticuerpo murino.

Natalizumab y anticuerpos de unión a VLA-4 relacionados se describen, p. ej., 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, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 5.840.299). También se ha descrito una versión humanizada de HP1/2 (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.602.503). Se describen varios anticuerpos de unión a VLA-4 monoclonales adicionales tales como HP2/1, HP2/4, L25 y P4C2 (p. ej., en la Patente de EE.UU. N° 6.602.503; Sánchez-Madrid et al, 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler et al., 1987 J. Biol. Chem. 2:11478-11485; Issekutz y Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147:109 (TA-2 mab); Pulido et al, 1991 J. Biol. Chem., 266(16):10241-10245; y en la Patente de EE.UU. N° 5.888.507). Muchos anticuerpos de unión a VLA-4 útiles interactúan con VLA-4 en células, p. ej., linfocitos, pero no provocan una agregación de células. Sin embargo, se ha observado que otros anticuerpos de unión a VLA-4 provocan dicha agregación. HP1/2 no provoca la agregación de células. El mAb HP1/2 (Sánchez-Madrid et al., 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 para el epítipo B (tales como los anticuerpos de unión al epítipo B1 o B2; Pulido et al, 1991 J. Biol. Chem., 266(16):10241-10245) representan una clase de anticuerpos de unión a VLA-4 útiles anticuerpos que se unen.

Un anticuerpo de unión a VLA-4 ilustrativo tiene una o más CDRs, p. ej., las tres CDRs de HC y/o las tres CDRs de LC de un anticuerpo particular descrito en esta memoria, o CDRs que son, en suma, al menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% idénticas a un anticuerpo de este tipo, p. ej., natalizumab. En una realización, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en esta memoria. En una realización, los bucles hipervariables L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en esta memoria.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable HC y/o LC es al menos 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 ó 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable HC y/o LC de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., natalizumab. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en esta memoria, p. ej., natalizumab. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principal o totalmente en las regiones de marco.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio variable HC y LC pueden ser codificados por una secuencia que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad a una secuencia de ácido nucleico descrita en esta memoria o una que codifica un dominio variable o a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria. En una realización, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones de marco (p. ej., FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable HC y/o LC son al menos 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 ó 100% idénticas a las regiones de marco correspondientes de los dominios variables HC y LC de un anticuerpo descrito en esta memoria. En una realización, una o más regiones de marco de cadena pesada o ligera (p. ej., FR1, FR2 y FR3 de HC) son al menos 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 100% idénticas a la secuencia de regiones de marco correspondientes de un anticuerpo de la línea germinal humana.

Cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (las expresiones se utilizan indistintamente en esta memoria) se realizan como sigue. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (p. ej., 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 los fines de comparación). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5. Luego se comparan los residuos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o

nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza en esta memoria, "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.

- 5 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. Tal como se utiliza en esta memoria, 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.
- 10 Variantes pueden prepararse de acuerdo con métodos para alterar la secuencia de polipéptido conocidas para un experto ordinario en la técnica tal como se encuentran en referencias que recopilan tales métodos, p. ej., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al, comps., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., comps., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Variantes funcionalmente equivalentes ilustrativas de anticuerpos de unión a VLA-4
- 15 incluyen sustituciones de aminoácidos conservativas en las secuencias de aminoácidos de proteínas descritas en esta memoria. 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.

- Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se hibrida bajo condiciones de alta rigurosidad" describe condiciones para hibridación y lavado. Una orientación para la realización de las reacciones de hibridación puede
- 20 encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1-6.3.6. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y se pueden utilizar. Condiciones de hibridación de alta rigurosidad incluyen hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C o condiciones sustancialmente similares.

- Los anticuerpos pueden ser sometidos a ensayo en cuanto a una propiedad funcional, p. ej., unión a VLA-4, p. ej.,
- 25 según se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.602.503.

#### Generación de Anticuerpos

- Anticuerpos que se unen a VLA-4 pueden ser generados mediante inmunización, p. ej., 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
- 30 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, p. ej., XenoMouse™,
- 35 Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994), solicitud de patente publicada de EE.UU. N° 2003- 0070185, Patente de EE.UU. N° 5.789.650 y documento WO 96/34096. También se pueden producir anticuerpos no humanos contra VLA-4, p. ej., en un roedor. El anticuerpo no humano puede ser humanizado, p. ej., según se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.602.503, EP 239 400, Patente de EE.UU. N° 5.693.761 y Patente de EE.UU. N° 6.407.213.

- El documento EP 239 400 (Winter et al.) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una
- 40 región variable dada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDRs) 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 et al, 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeven et al, 1988, Science 239, 1534-1536). Típicamente, CDRs de un anticuerpo murino son sustituidas
- 45 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 USA dic.; 86(24):10029-33 y el documento WO 90/07861 han descrito un
- 50 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 CDRs murinas. Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen entonces
- 55 sobre el marco humano homólogo. Véanse también las patentes de EE.UU. N° 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 CDRs y residuos de marco de la región V.

Anticuerpos no humanos pueden ser modificados para incluir sustituciones que insertan secuencias humanas de inmunoglobulina, p. ej., residuos de aminoácidos consenso humanos en posiciones particulares, p. ej., en una o más de las siguientes posiciones (preferiblemente al menos cinco, diez, doce, o todos): (en el FR (marco) 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 (de acuerdo con la numeración de Kabat). Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. N° 6.407.213.

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

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de unión a VLA-4 puede ser un anticuerpo VLA-4 de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio sencillo o un Nanobody™. 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](http://ablynx.com)). La tecnología Nanobody™ fue desarrollada a partir del descubrimiento de que camélidos (camellos y llamas) poseen un repertorio único de anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura de 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. Nanobodies™ combinan las características de los anticuerpos convencionales con características de fármacos de moléculas pequeñas. Nanobodies™ muestran una alta especificidad para la diana y una baja toxicidad inherente. Adicionalmente Nanobodies™ son muy estables, se pueden administrar por medios distintos a la inyección y son fáciles de fabricar. En determinadas realizaciones, un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico, un resto de inmovilización y/o un resto de detección pueden ser un Nanobody™ humanizado.

#### *Producción de Anticuerpos*

Anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a VLA-4 pueden ser producidos, p. ej., utilizando esplenocitos humanos cebados in vitro, según se describe por Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147, 86-95. Se pueden preparar por clonación del repertorio según se describe por Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-2436 o por Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 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, p. ej., 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° 2003-0232333). Los anticuerpos pueden ser producidos en células procariotas y eucariotas. En una realización, los anticuerpos (p. ej., scFvs) se expresan en una célula de levadura tal como Pichia (véase, p. ej., Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251: 123-35), Hanseula, o Saccharomyces.

En una realización, anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, p. ej., IgG, se producen en células de mamífero. Células huésped de mamífero ilustrativas para la expresión recombinante incluyen células 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 marcador seleccionable de DHFR, p. ej., según se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), líneas celulares linfocíticas, p. ej., células de mieloma NSO y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, p. ej., un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (p. ej., 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, p. ej., las Patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). 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 (p. ej., 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 (p. ej., 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 un anticuerpo de unión a VLA-4.

Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, p. ej., modificaciones que alteran la función de Fc, p. ej., 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, p. ej., uno o más de los residuos 234 y 237, p. ej., de acuerdo con la numeración en la patente de Estados Unidos N° 5.648.260. Otras modificaciones ilustrativas incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 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 glicosilación participa en funciones efectoras mediadas por receptores Fcγ y complemento C1q (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis et al. (1998) Immunol. Rev.163:59-76). El dominio Fc puede ser producido en un sistema de expresión de mamífero que glicosila 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° 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.

Tal como se utiliza en esta memoria, los anticuerpos de unión a VLA-4 de la divulgación pueden ser anticuerpos de unión a VLA-4 sustancialmente de longitud completa o fragmentos funcionales de los mismos. Por ejemplo, si un fragmento de un anticuerpo de unión a VLA-4 es suficiente para permitir la unión específica por un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4, es un anticuerpo de unión a VLA-4 funcional y se puede utilizar en los métodos y kits descritos en esta memoria. Un experto ordinario en la técnica será capaz de identificar los fragmentos de anticuerpos de unión a VLA-4 y determinar si un fragmento de anticuerpo de unión a VLA-4 es un fragmento de anticuerpo de unión a VLA-4 funcional, utilizando sólo procesos de rutina y ensayos de unión. Por lo tanto, las descripciones y ejemplos de métodos de uso de anticuerpos de unión a VLA-4 inmovilizados y no inmovilizados que se proporcionan en esta memoria, se aplican también al uso de fragmentos de anticuerpos de unión a VLA-4 inmovilizados y no inmovilizados funcionales.

#### Marcadores y detección

Aspectos de la divulgación incluyen el uso de anticuerpos de proteínas anti-terapéuticas, no inmovilizados (p. ej., anticuerpos de unión a VLA-4) 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 (p. ej., un anticuerpo de unión a VLA-4 diana). 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 (p. ej., un anticuerpo de unión a VLA-4 que 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 descritos en esta memoria pueden ser acoplados a los agentes de marcado específicos para detectar la unión de acuerdo con procesos de acoplamiento estándares. Se puede utilizar una amplia diversidad de marcadores detectables tales como los que proporcionan una detección directa (p. ej., un marcador radiactivo, un fluoróforo [p. ej., proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), etc.], un cromóforo, un marcador denso óptico o electrónico, etc.) o una detección indirecta (p. ej., una etiqueta de enzima tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). 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 descritos en esta memoria pueden incluir métodos de electroquimioluminiscencia (ECL).

5 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.

10 Anticuerpos marcados de la divulgación pueden ser anticuerpos que se utilizan in vitro, p. ej., 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. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, hidrógenoperoxidasa (de rábano picante) o glucosa oxidasa. 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° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241.

20 Se conocen en la técnica numerosos métodos para la fijación o conjugación de un anticuerpo a su marcador detectable. 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 tetracoloro-3.alfa-6.alfa.-difenilglicouril-3 fijado al anticuerpo (Patentes de EE.UU. N° 4.472.509 y 4.938.948).

25 Anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. 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 sulfhidrido en la región Fc del anticuerpo, utilizando condiciones de reacción que no alteren el sitio de reconocimiento de anticuerpos.

30 La detección del marcador detectable en un ensayo descrito en esta memoria también se denomina en esta memoria como detectar la "señal". Métodos para detectar la señal en un inmunoensayo son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones importantes de la invención, la señal de ensayo puede ser detectada utilizando un lector de placas de múltiples pocillos (p. ej., lector de microplacas) para evaluar la cantidad y/o ubicación de una señal. La detección de la señal puede ser la detección óptica u otros medios de detección adecuados para detectar un marcador detectable utilizado en la divulgación. Métodos adicionales para la detección de marcadores son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en métodos descritos en esta memoria. Métodos de la divulgación incluyen ELISAs que tienen una sensibilidad para la detección de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4, en los que la sensibilidad es al menos aproximadamente 1000 ng, 500 ng o 50 ng. En realizaciones preferidas, la sensibilidad del ELISA para la detección de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VLA-4 es al menos aproximadamente 500 ng.

40 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. Patentes de EE.UU. concernientes al uso de tales marcadores incluyen las Patentes de EE.UU. N° 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.

50 Se debe apreciar que las técnicas descritas en esta memoria para obtener y producir un anticuerpo de unión a VLA-4 (p. ej., natalizumab) también se pueden utilizar para obtener y producir un anticuerpo de referencia que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 con alta afinidad (p. ej., un anticuerpo de unión a natalizumab de alta afinidad (p. ej., 12C4).

#### Kits

55 La divulgación también se refiere, en parte, a kits para someter a ensayo la presencia de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una muestra. Un ejemplo de un kit de este tipo puede incluir los anticuerpos mencionados anteriormente, incluyendo, pero no limitados a Natalizumab u otro anticuerpo de unión a VLA-4, o un fragmento del mismo. 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 (p. ej., disoluciones de tampón de bloqueo, tampón de lavado, de unión, disoluciones diluyentes, etc.), muestras de control positivas y/o negativas y disoluciones. Un kit de la divulgación también puede incluir instrucciones por escrito para el uso del kit para la identificación de una respuesta inmune a un anticuerpo de unión a VLA-4 en una muestra biológica. 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.

El natalizumab se diluyó a una concentración específica en tampón de revestimiento de placa y se incubó en placas de microtitulación de 96 pocillos de ELISA durante la noche a temperatura ambiente. El volumen recomendado era 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 de tampón de bloqueo era 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 de ensayo que contiene natalizumab añadido representaba una etapa confirmatoria. 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 era 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 de AP era de 100 µl/pocillo. Disolución de parada (p. ej., H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, etc.) se añadió luego directamente a la mezcla de reacción del sustrato y la densidad óptica (OD) se leyó a 405 nm.

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 OD cayó por debajo de la muestra de control de calidad de corte negativo definido. Las muestras también fueron juzgadas negativas si su valor OD caía 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 fueron juzgadas positivas si su valor OD caía 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.

### Ejemplo 2: Ensayo de Rastreo de una Respuesta Inmune a un anticuerpo VLA-4

Se realizó un ensayo de rastreo (según se describe anteriormente) en muestras de sujetos a los que se había administrado natalizumab. La presencia de una respuesta inmune a un anticuerpo VLA-4 se examinó en pacientes que habían sido sometidos a la administración de natalizumab.

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.

Los ensayos incluían el uso de un mAb de alta afinidad como control positivo. El mAb de alta afinidad detectó anticuerpos de unión (p. ej., 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 10% de suero. 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 (anticuerpos) anti-natalizumab, 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 parte del fármaco libre en una relación mAb:fármaco mayor que 1:2. La Fig. 1 ilustra los efectos de la interferencia de natalizumab libre con el inmunoensayo para los anticuerpos anti-natalizumab. También se encontró que el factor reumatoide interfería con el ensayo.

Además del ensayo de rastreo descrito en los Ejemplos 1 y 2, también se realizaron ensayos de caracterización para evaluar la unión en los ensayos de rastreo. 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 sometió a ensayo la especificidad del mAb y se determinó que el mAb detectaba anticuerpos anti-natalizumab, pero se encontró que era 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 en el ensayo de bloqueo por parte del fármaco libre se muestran en la Fig. 2.

#### *Bloqueo de Ensayo para natalizumab*

##### *Resultados*

- Se compararon los resultados positivos de los ensayos de rastreo y bloqueo. Había 217 ensayos de bloqueo positivos y 222 ensayos de rastreo positivos, por lo tanto, había una diferencia de 5% y un porcentaje de concordancia de 98%. Por consiguiente, el ensayo de rastreo proporciona una medida precisa de la respuesta inmune de un sujeto a un anticuerpo de unión a VLA-4 terapéutico.

#### Ejemplo 3

- Se realizó un ensayo de rastreo (según se describe en los Ejemplos 1 y 2) en muestras de 625 sujetos a los que se había administrado natalizumab. La presencia de una respuesta inmune a un anticuerpo VLA-4 se examinó en pacientes que habían sido sometidos a la administración de natalizumab. La incidencia de anticuerpos contra natalizumab en los pacientes examinados era: 91% (569 pacientes) de anticuerpo negativo y 9% (56 pacientes) de "anticuerpo de unión" positivo en cualquier momento, con 3% (19 pacientes) "transitoriamente" positivo y 6% (37 pacientes) "persistentemente" positivo. Los pacientes transitorios positivos tenían anticuerpos detectables (a una concentración de  $> 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) en un solo momento, pero negativos para anticuerpos en todos los otros momentos. Los pacientes persistentes positivos tenían anticuerpos detectables en dos o más momentos que estaban separados por al menos 42 días, o en un solo momento, sin muestras de seguimiento sometidas a ensayo.

- La Fig. 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 persistentes positivo tenían primero anticuerpos detectables en la semana 12. Ningún sujeto se convirtió en positivo para los anticuerpos persistentes después de la semana 36. Pacientes transitorios positivos tenían anticuerpos detectables en la semana 12, pero fueron subsiguientemente 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 Fig. 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 Figs. 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 con anticuerpos "transitorios"-positivos mostraron una disminución en la eficacia del tratamiento con natalizumab. Pacientes con anticuerpos "persistentes"-positivos mostraron una pérdida de eficacia del tratamiento con natalizumab. De seis a doce meses, se restableció una plena eficacia en los pacientes con anticuerpos "transitorios"-positivos, pero no en pacientes con anticuerpos "persistentes"-positivos. Por consiguiente, es importante identificar a los pacientes con anticuerpos transitorios-positivos como una población diana para la terapia continua con anticuerpos de unión a VLA-4.

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

1. Un método para detectar una respuesta inmune clínicamente significativa de un anticuerpo de unión a VLA-4 en un sujeto, comprendiendo el método determinar si al menos dos muestras biológicas, tomadas en diferentes momentos de un sujeto a quien se ha administrado un anticuerpo de unión a VLA-4, contienen al menos un nivel umbral, clínicamente significativo, de aproximadamente 500 ng/ml en una muestra de suero de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde la presencia de al menos dicho nivel umbral del anticuerpo soluble en dichas al menos dos muestras es indicativo de una respuesta inmune clínicamente significativa al anticuerpo de unión a VLA-4, en donde dichos momentos están separados en al menos un mes y en donde dicha respuesta inmune clínicamente significativa indica una disminución de la eficacia o la falta de eficacia del anticuerpo de unión a VLA-4.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dichos momentos son dos momentos consecutivos.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que un nivel de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina:  
determinando un nivel de actividad de unión soluble al anticuerpo de unión a VLA-4 en una primera parte alícuota de la muestra biológica; y  
determinando si la actividad de unión soluble es específica para el anticuerpo de unión a VLA-4.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la especificidad de la actividad de unión soluble se determina en una segunda parte alícuota de la muestra biológica.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4 se determina utilizando un ensayo ELISA de puente.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo de unión a VLA-4 es un anticuerpo monoclonal murino humanizado contra VLA-4.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el que el anticuerpo de unión a VLA-4 es una forma humanizada del anticuerpo murino mAb 21.6.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el que el anticuerpo de unión a VLA-4 es natalizumab.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sujeto es un paciente humano.
10. El método de la reivindicación 9, en el que el que el paciente tiene esclerosis múltiple, artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende, además, seleccionar un régimen terapéutico para el sujeto si en las al menos dos muestras biológicas del sujeto se determina un nivel umbral de un anticuerpo soluble que se une al anticuerpo de unión a VLA-4.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la selección de un régimen terapéutico comprende evaluar una terapia actual del sujeto, determinar una nueva terapia para el sujeto, modificar una terapia actual del sujeto o detener una terapia actual del sujeto.
13. El método de la reivindicación 12, en el que una terapia actual del sujeto comprende administrar al sujeto el anticuerpo de unión a VLA-4.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el método comprende las etapas de:  
revestir pocillos de ensayo con natalizumab;  
incubar una muestra de control, una muestra de rastreo y una muestra de competencia en pocillos de ensayo separados;  
añadir natalizumab biotinilado a las muestras en los pocillos de ensayo; y  
detectar el natalizumab biotinilado utilizando un ensayo con peroxidasa de rábano picante.
15. El método de la reivindicación 14, en el que se utiliza natalizumab a una concentración de 0,25 µg/ml para revestir los pocillos de ensayo.
16. El método de la reivindicación 14 ó 15, en el que la muestra de competencia contiene natalizumab soluble no marcado a una concentración final de 100 µg/ml.

INTERFERENCIA DE NATALIZUMAB LIBRE EN EL INMUNOENSAYO PARA ANTICUERPOS ANTI-NATALIZUMAB

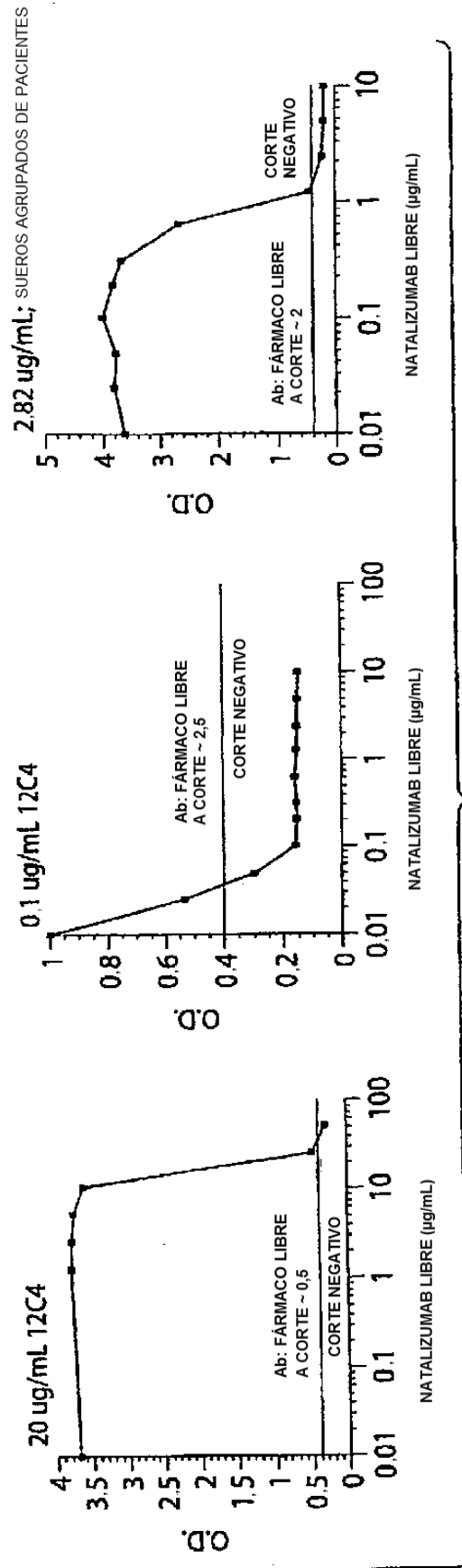


Fig. 1

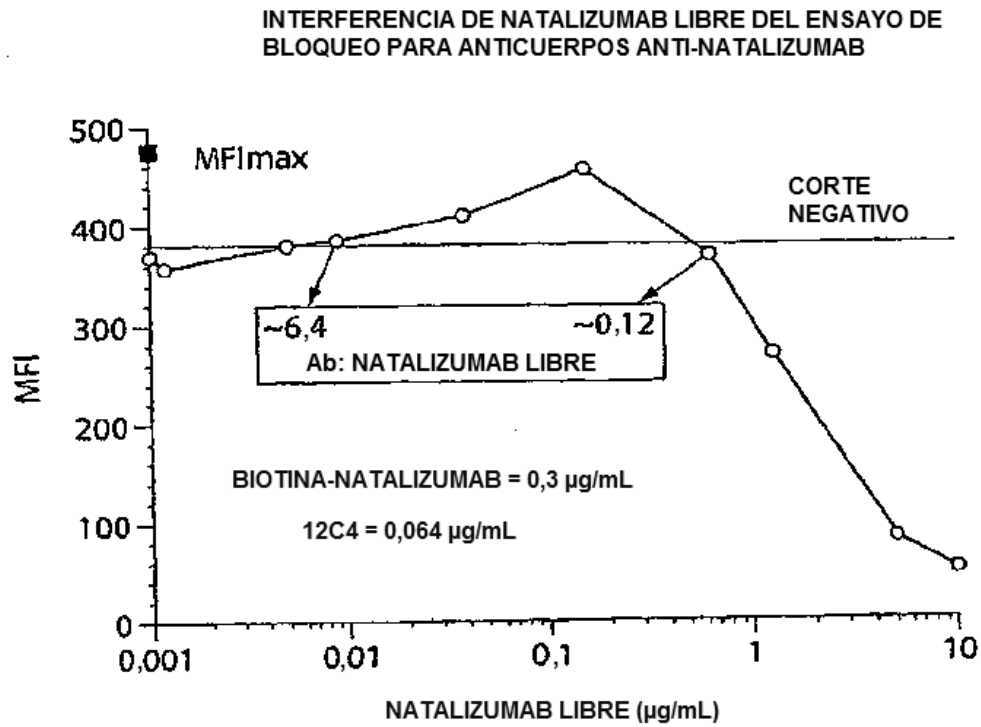


Fig. 2

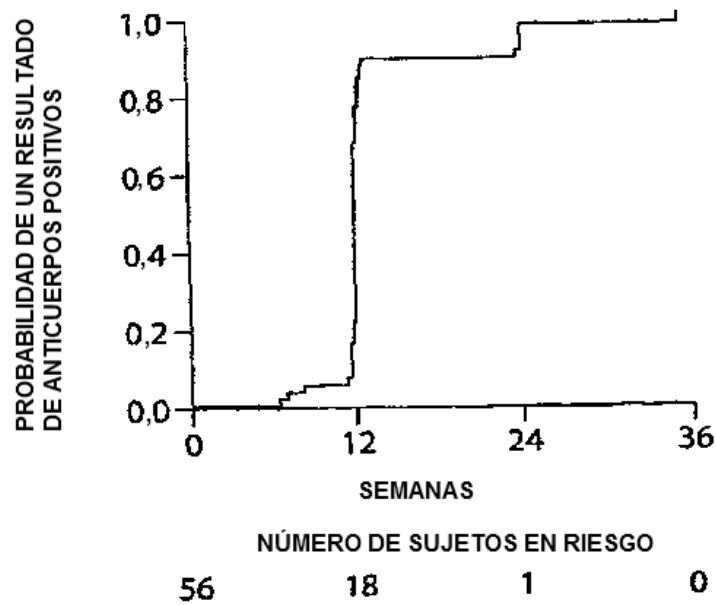


Fig. 3

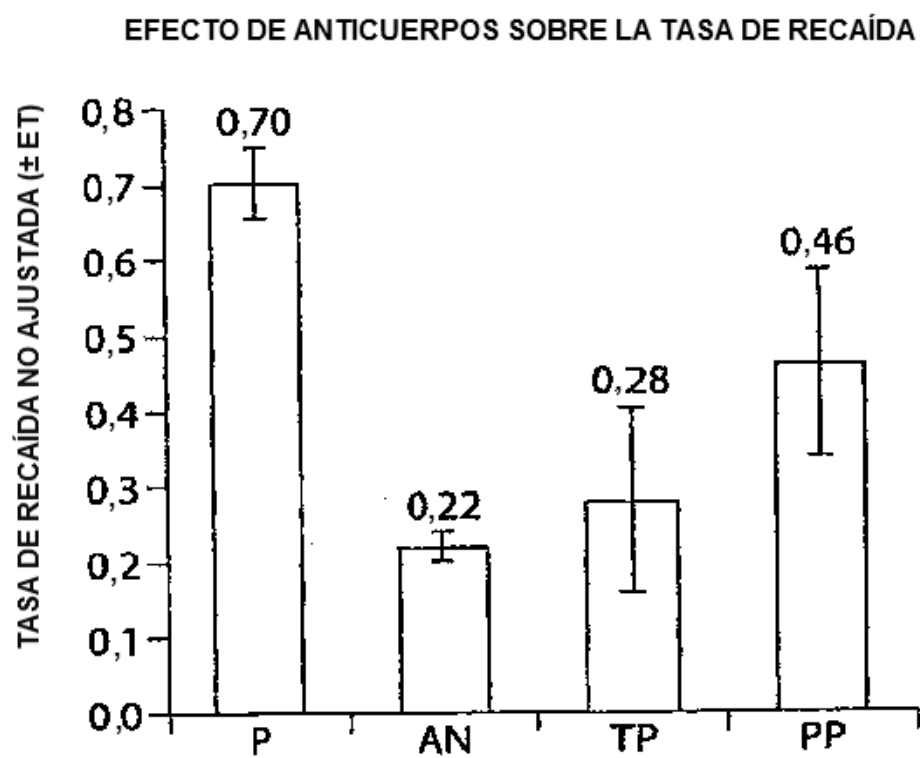


Fig. 4

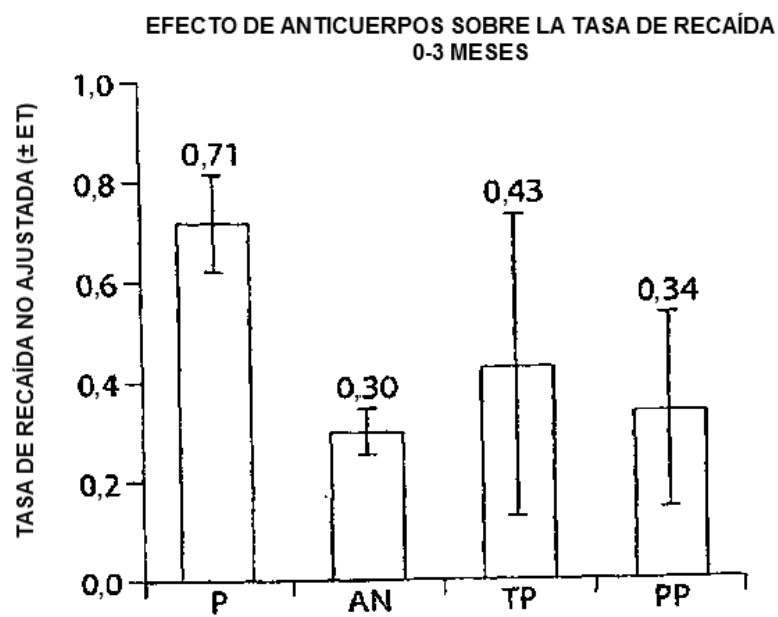


Fig. 5A

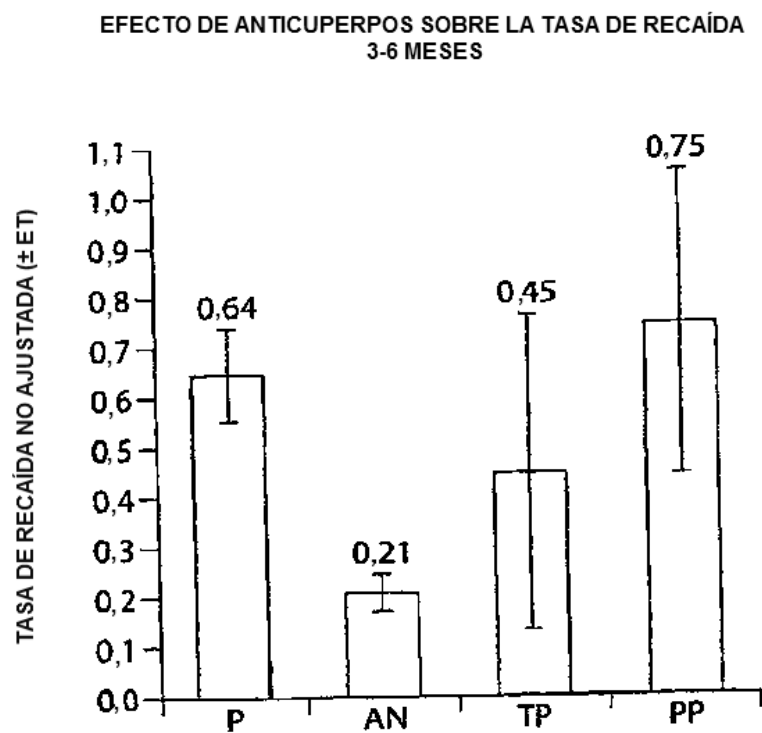


Fig. 5B

EFFECTO DE ANTICUERPOS SOBRE LA TASA DE RECAÍDA  
6-9 MESES

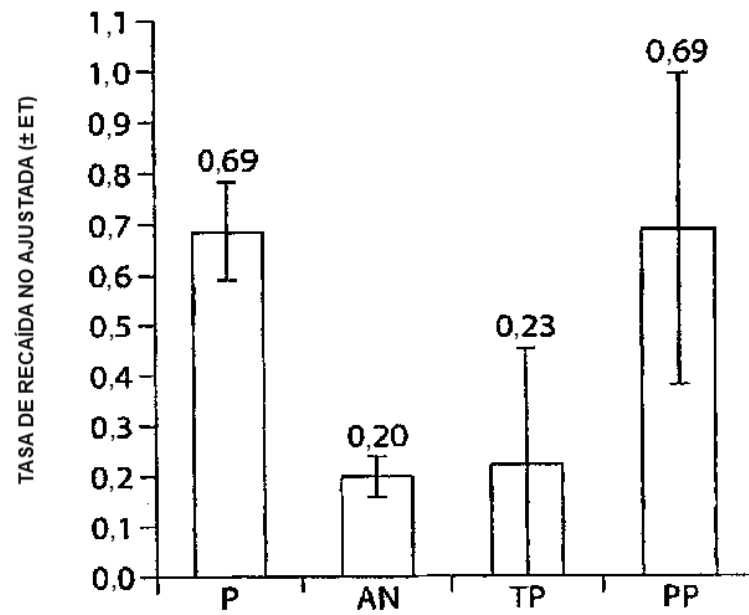


Fig. 5C

EFFECTO DE ANTICUERPOS SOBRE LA TASA DE RECAÍDA  
9-12 MESES

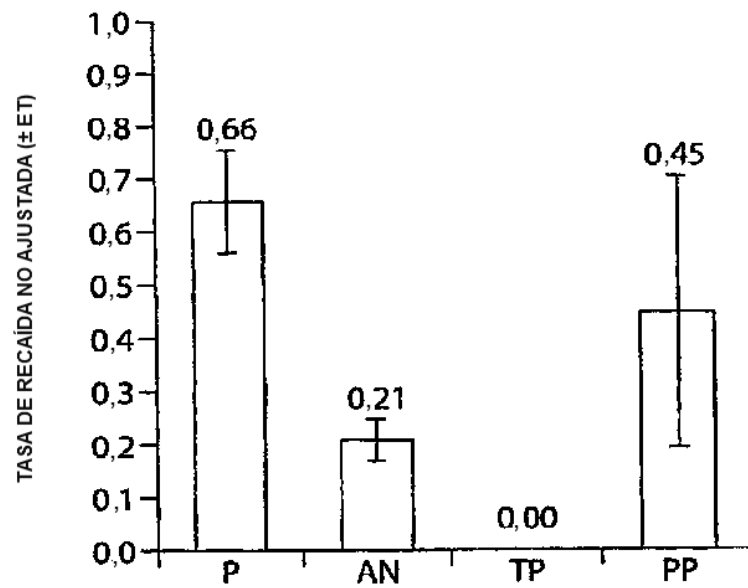


Fig. 5D