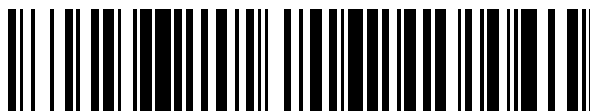


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 173**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2011 PCT/US2011/020832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11085369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2011 E 11732315 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2524060**

54 Título: **Ensayo para anticuerpos contra el virus jc**

30 Prioridad:

11.01.2010 US 294048 P
22.03.2010 US 316193 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2018

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

GORELIK, LEONID;
SIMON, KENNETH J.;
SUBRAMANYAM, MEENA y
RUSHE, MIA MARIE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 664 173 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

Ensayo para anticuerpos contra el virus jc

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 61/294.048, depositada el 11 de enero de 2010, y la solicitud de EE. UU. y la solicitud provisional con n.º 61/316.193 del 22 de marzo de 2010.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los procedimientos y reactivos para analizar muestras para la presencia de anticuerpos contra virus JC.

15 ANTECEDENTES

La leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) es una infección oportunista del sistema nervioso central (SNC) que se asocia con la exposición al virus JC (VJC), un virus de polioma que se cree patogénico en humanos solamente bajo condiciones de supresión inmune o modulación inmune. Aunque se requiere la presencia de VJC para el desarrollo de la LMP, se considera que el riesgo de LMP, de forma no esclarecida, se asocia a la convergencia de múltiples factores virales y relacionados con el huésped que provocan que el virus se convierta en patogénico (Major, "Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Immunomodulatory Therapies" Annu. Rev. Med 61:35-47 (2010) [2009 Aug. 31, publicación electrónica antes de impresión]). Son diversos los estudios publicados que informan de la prevalencia de la infección por VJC en la población humana. Esta información se basa en diversos tipos de estudios que incluyen el análisis por PCR para el ADN viral y la detección de anticuerpos contra VJC. A pesar de la prevalencia de VJC en la población, la infección con VJC resulta pocas veces en LMP, incluso en sujetos con inmunosupresión documentada.

Los informes publicados sobre la detección del ADN de VJC sugieren que el procedimiento es insensible y de uso limitado para evaluar la exposición al VJC debido a que el ADN del VJC fue detectado pocas veces y de manera irregular en plasma, suero o células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LMP infectados con VJC. La detección de anticuerpos anti-VJC parece ser un marcado más sensible de la infección por VJC; sin embargo los resultados presentados con variables. En 1973, Padgett y Walker publicaron un estudio que presentó una seroprevalencia de VJC de 65-84 % usando un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH) (Padgett and Walker, "Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy" J. Infect. Dis. 127:467-70, 1973). Los informes posteriores de las tasas de seroprevalencia de VJC usando el ensayo de IH o ELISA oscilaron entre 33-91 %. Las tasas de seroprevalencia variables entre estos estudios se deben probablemente a las diferencias marcadas en el tamaño y características demográficas de los estudios, y, quizás con más importancia, a las diferencias en los procedimientos de ensayo.

Por lo tanto, se desea aplicar un ensayo fiable y sensible para determinar la presencia de anticuerpos contra VJC que se pueda usar, por ejemplo, para evaluar si un sujeto se ha expuesto al VJC.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se refiere al desarrollo de un ensayo analíticamente validado, sensible para detectar la presencia de anticuerpos contra VJC en un fluido biológico, p. ej., suero o plasma.

En función de la descripción contenida en el presente documento, presente invención proporciona un procedimiento que comprende:

- 50 (a) contactar la muestra con partículas similares a las virales altamente purificadas (HPVLP, siglas en inglés) que consisten principalmente en la proteína VP1 del virus JC (VJC), en solución bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP, de esta forma proporcionando una muestra preincubada;
- 55 (b) contactar la muestra preincubada con una HPVLP, que consiste principalmente en una proteína VP1 del VJC, inmovilizada en un sustrato sólido bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP;
- (c) detectar el nivel de anticuerpo contra VJC en la unión de muestra preincubada con las HPVLP inmovilizadas; y
- 60 (d) comparar el nivel detectado anticuerpo contra VJC en la muestra biológica preincubada con el nivel de anticuerpo contra VJC detectado en la muestra biológica obtenida del sujeto que fue preincubada en una solución sin HPVLP, y

que entró en contacto con la HPVLP inmovilizada en un sustrato sólido bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP, donde las HPVLP están compuestas de más de 5, al menos 50, 150 o 360 polipéptidos VP1.

- 5 En un aspecto, al menos aproximadamente el 10 % de las HPVLP en una preparación de las HPVLP purificadas contienen más de cinco polipéptidos VP1 por HPVLP. En otros aspectos, al menos aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 % o aproximadamente el 90 % de las HPVLP en una preparación de HPVLP purificadas
10 contienen más de cinco polipéptidos VP1 por HPVLP.

El sustrato sólido puede ser una placa de microtitulación o un portaobjeto. En algunas realizaciones, la HPVLP consiste esencialmente en una proteína viral VP1. La HPVLP puede incluir además otras proteínas virales, por ejemplo al menos una de una VP3 o una VP2 de VJC. La(s) proteína(s) viral(es) en la HPVLP se pueden derivar por
15 vía recombinante (p. ej., unaVP1 de la cepa MAD1) o puede ser una proteína viral de origen natural (p. ej., derivada de una fuente de origen natural). El procedimiento puede realizarse mediante el uso, por ejemplo, de una muestra biológica obtenida de un sujeto que está tratado con un fármaco inmunomodulador, un sujeto que está considerando iniciar el tratamiento con un fármaco inmunomodulador, o un sujeto sospechoso de tener Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

20 Un ensayo descrito en el presente documento puede usarse para evaluar la presencia de anticuerpos contra VJC en un sujeto que nunca ha recibido tratamiento con un inmunomodulador; o en un sujeto que ha recibido anteriormente un inmunomodulador, pero que ya no está recibiendo tratamiento con el inmunomodulador; o en el sujeto que está sometido actualmente al tratamiento con un inmunomodulador.

25 La detección de anticuerpos contra VJC que se unen a las HPVLP en un ensayo caracterizado en la invención puede indicar que un sujeto se expone a un riesgo aumentado de LMP. La detección de anticuerpos contra VJC puede indicar también que el sujeto se expone a un riesgo aumentado de síntomas adversos, tal como el desarrollo de LMP, después de la administración de determinados agentes terapéuticos, tales como determinados
30 inmunomoduladores, y por tanto, el sujeto no es candidato para el tratamiento con estos agentes. Por ejemplo, la detección de anticuerpos contra VJC en una muestra de un sujeto puede indicar que el sujeto no es un candidato para el tratamiento terapéutico anti-VLA-4, tal como natalizumab. En determinadas realizaciones, la detección de anticuerpos contra VJC en una muestra biológica puede indicar que el sujeto es un candidato para el tratamiento con inmunomodulador, tal como natalizumab, excepto que el sujeto fuera a experimentar el seguimiento reforzado
35 durante el tratamiento que un sujeto que no tiene anticuerpos detectables contra VJC. Por ejemplo, el seguimiento reforzado puede incluir la observación de síntomas adversos, tales como síntomas que podrían indicar el desarrollo de LMP.

El fallo para detectar los anticuerpos contra VJC que se unen a las HPVLP en un ensayo caracterizado en la
40 invención puede indicar que el sujeto es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, tal como natalizumab, y en un aspecto, al sujeto se le administra además el inmunomodulador. Un sujeto determinado que no tiene anticuerpos contra VJC puede evaluarse nuevamente, al menos cada año (p.ej., al menos cada 3 meses, cada 6 meses, cada 9 meses, o cada 12 meses) para determinar si el sujeto desarrolló anticuerpos contra VJC, lo que podría indicar que el sujeto se infectó con VJC. Un sujeto en el que anteriormente no se detectaron anticuerpos
45 contra VJC en una muestra biológica, y que desarrolla posteriormente anticuerpos contra VJC en una muestra biológica, puede dejar de recibir tratamiento con un inmunomodulador.

En algunas realizaciones, un sujeto que fue identificado anteriormente como portador de anticuerpos contra VJC, puede evaluarse posteriormente en una fecha subsiguiente para determinar que no tiene anticuerpos contra VJC.
50 Estos sujetos pueden determinarse para ser candidatos a recibir tratamiento con un inmunomodulador, tal como natalizumab. En un aspecto, a un sujeto que dio anteriormente positivo para la presencia de anticuerpos contra VJC y que dio negativo posteriormente para anticuerpos contra VJC se le puede administrar el inmunomodulador, y someter a un seguimiento reforzado en comparación con el sujeto que nunca dio positivo para anticuerpos contra VJC, tal como para monitorizar los síntomas que podrían indicar el desarrollo de LMP.

55 Un ensayo caracterizado en la invención es útil para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno inmunológico, tales como esclerosis múltiple (EM) o enfermedad de Crohn (EC). En una realización, un ensayo descrito en el presente documento fue validado para usarse en pacientes con EM y EC, de tal modo que demuestra que el ensayo es eficaz para detectar anticuerpos contra VJC en pacientes con EM y EC en un ambiente de prueba
60 controlada, tal como es un ensayo clínico.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende una HPVLP y al menos un reactivo para realizar un ensayo con el objeto de identificar un nivel de anticuerpo contra VJC en una muestra, tal como una muestra biológica.

5

En otros aspectos, la descripción se refiere a una solución que comprende partículas de HPVLP esencialmente consistentes en partículas que contienen VP1 que son mayores en tamaño que un pentámero VP1, p. ej., que contienen aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 o 72 pentámeros o que contienen aproximadamente 25 moléculas de VP1, aproximadamente 50 moléculas de VP1, aproximadamente 100 moléculas de VP1, aproximadamente 150 moléculas de VP1, aproximadamente 200 moléculas de VP1, aproximadamente 300 moléculas de VP1, aproximadamente 350 moléculas de VP1 o aproximadamente 360 moléculas de VP1.

Otro aspecto caracterizado en la descripción es un procedimiento para preparar una solución de HPVLP, el procedimiento comprende eliminar las partículas que contienen VP1 de la solución que sean del tamaño de un pentámero VP1 o menores. En un procedimiento, los polipéptidos VP1 se expresan en células, p. ej., en células de insectos o células de mamífero. Las células se lisan, y después las células se tratan con una nucleasa, tal como, benzonasa. El resto celular se elimina por precipitación, tal como precipitación con sal (p. ej., sulfato de amonio), y después el sobrenadante que contiene VP1 se concentra y se purifica adicionalmente mediante difiltración, tal como por uno o dos pases a través de una membrana, p. ej., una membrana de filtración por flujo tangencial (FFT). La solución que contiene las partículas que contienen VP1, p. ej., las HPVLP, se purifican después adicionalmente a través de una etapa de intercambio iónico, y se realiza la elución de las HPVLP, p. ej., con tampón. La pureza de VP1 puede evaluarse, p. ej., mediante electroforesis (p. ej.: SDS-PAGE) o espectrometría de masas. La presencia de las HPVLP puede confirmarse por microscopía, p. ej., microscopía electrónica. El porcentaje de proteína total en forma de HPVLP puede determinarse mediante la ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación.

25

En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para identificar un sujeto en riesgo de desarrollar LMP, tal como al obtener una muestra biológica del individuo; contactar la muestra biológica con las HPVLP bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra el virus JC (VJC) en la muestra con una HPVLP; detectar el nivel de unión del anticuerpo contra VJC en la muestra con las HPVLP; y correlacionar el nivel detectado con un conjunto de referencia, donde el sujeto se expone al riesgo aumentado de LMP si se detecta la unión del anticuerpo contra VJC. El conjunto de referencia se selecciona para indicar una tasa de falsos negativos de aproximadamente 5 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 1 % o menos.

En otro aspecto, la descripción presenta un procedimiento de identificación de riesgo de LMP en un sujeto mediante la determinación del nivel de anticuerpos anti-VJC en una muestra del individuo, tal como a partir de una muestra de plasma, sangre o suero; y asignar un nivel de riesgo al sujeto de acuerdo con el nivel de anticuerpos anti-VJC en la muestra. El sujeto podría estar recibiendo una terapia inmunomoduladora, tal como un tratamiento anti-VLA4, p. ej., natalizumab, o podría ser un candidato para recibir una terapia inmunomoduladora. En algunos aspectos, el sujeto es diagnosticado con una enfermedad o trastorno inmunológico, tal como esclerosis múltiple o enfermedad de Crohn. En un aspecto, el nivel de anticuerpos anti-VJC se determina usando un ensayo de una etapa, y en otro aspecto, el nivel de anticuerpos anti-VJC se determina usando un ensayo de dos etapas. Ya sea el ensayo de una etapa o el ensayo de dos etapas, podría incluirse un ensayo de ELISA.

En un aspecto, el procedimiento de identificación del riesgo de LMP en un sujeto incluye además determinar el nivel de anticuerpos anti-VJC en el sujeto en una muestra de una fecha posterior a la muestra inicial; comparar el nivel de anticuerpos anti-VJC en la muestra de fecha posterior con el nivel de la muestra de la muestra inicial; y determinar si el sujeto se expone al riesgo aumentado de LMP en la fecha posterior en comparación con el momento de la muestra inicial.

En un aspecto, la descripción presenta un procedimiento para monitorizar el riesgo de LMP en un individuo, el procedimiento comprende determinar el nivel de anticuerpos anti-VJC en un sujeto usando una muestra de una primera fecha; asignar un riesgo de LMP (p. ej., riesgo alto, moderado o bajo) basado en el nivel de anticuerpos anti-VJC en el sujeto en la primera fecha; determinar el nivel de anticuerpos anti-VJC en el sujeto usando una muestra de una segunda fecha; y asignar un riesgo de LMP (p. ej., riesgo alto, moderado o bajo) basado en el nivel de anticuerpos anti-VJC en el sujeto en la segunda fecha.

Como se usa en el presente documento, una «HPVLP» es una VLP (siglas en inglés de «partícula similar a virus») altamente purificada consistente en su mayoría de la proteína VP1. Una «HPVLP» que se presenta en la invención está compuesta principalmente de la proteína principal de la cápsida «VP1», que puede ser una VP1 de origen natural o una VP1 recombinante, del poliomavirus, virus JC (VJC). Una HPVLP puede estar compuesta de, p. ej.,

60

más de una unidad pentamérica, al menos 10 subunidades pentaméricas, al menos 20 unidades pentaméricas, al menos 30 unidades pentaméricas, al menos 50 unidades pentaméricas, al menos setenta y dos subunidades pentaméricas o más de VP1. Una HPVLP puede contener los polipéptidos de VP1 en una configuración indeterminada (p. ej., los polipéptidos se podrían o no organizar en pentámeros), en cuyo caso una HPVLP puede componerse de más de 5 polipéptidos de VP1, al menos 50 polipéptidos de VP1, al menos 150 polipéptidos de VP1, al menos 360 polipéptidos de VP1 o más. Las HPVLP incluyen capsómeros, que contienen aproximadamente de 10 a 24 pentámeros. Una HPVLP presente en la invención puede unirse a los anticuerpos contra el virus JC de origen natural e intacto. En algunas realizaciones, una HPVLP incluye un segundo, y opcionalmente un tercer, tipo de polipéptido que es una proteína menor de la cápsida del virus JC, p. ej., al menos un polipéptido de VP2 o VP3. La VP2 o VP3 pueden ser recombinantes o polipéptidos de origen natural o derivados naturalmente.

Las partículas «altamente purificadas» de este tipo contienen más de un pentámero de VP1, p. ej., al menos 5, 10, 20, 34, 40, 50, 60, 70, 72 pentámeros de VP1, o menos de 100 pentámeros de VP1. Las partículas altamente purificadas de este tipo pueden obtenerse, por ejemplo, por un procedimiento que implica la filtración doble. Por ejemplo, en una realización, una preparación altamente purificada de las VLP se obtiene mediante la purificación de las partículas por centrifugación al menos dos veces, p. ej., a través de la almohadilla de sacarosa. En general, una preparación de HPVLP puede identificarse por su actividad en un ensayo de ELISA usando las muestra de control definidas. En algunos casos, las muestras de control de este tipo son controles negativos y/o muestras de control que contienen bajos niveles de anticuerpos contra VJC.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un gráfico que describe los resultados de un ELISA de HPVLP en muestras de sujetos positivos para el ADN de VJC en su orina (Uropositivo) y negativos para el ADN de VJC en su orina (Uronegativo). El cuadro representa el intervalo intercuartílico (IQR, sus siglas en inglés) con la línea media en el centro; los paréntesis representan las observaciones en 1,5 veces el IQR. Los signos «+» representan las observaciones más allá de 1,5 veces el IQR (valores extremos). *Prueba U de Mann-Whitney.

La FIG. 2 es un gráfico que describe los niveles de anticuerpos anti-VJC según se midió mediante ELISA frente al nivel urinario del ADN de VJC según se midió por PCRc (n=204). Los círculos abiertos representan las muestras de orina y suero recogidas a intervalos de tiempo similares de STRATA. Los círculos cerrados representan las muestras recogidas en diferentes intervalos de tiempo. Para las 17 muestras con los resultados del ensayo de ADN por debajo del nivel de cuantificación (<500 copias/ml), el nivel se estableció en el límite de detección.

La FIG. 3 es un gráfico que describe los datos de reactividad cruzada de VBK-VJC de un conejo inmunizado con VBK. El antisuero del conejo inmunizado con VBK se unió con alta afinidad (EC50 = 1:100.000) y reaccionó de forma cruzada con las VLP de VJC (EC50 = 1:5.000).

Las FIG. 4A y 4B describen el ensayo de reactividad anti-VJC de las muestra de suero de los pacientes uronegativos (n=311) (FIG. 4A) y uropositivos (n=204) (FIG. 4B) en la detección y confirmación de los ELISA. La distribución de la reactividad serológica de las muestras en la detección por ELISA se muestran destacadas, con puntos de cortes inferiores (DON₄₅₀= 0,10) y superiores (DON₄₅₀= 0,25) (paneles a la izquierda). En el ELISA de confirmación adicional (paneles a la derecha), un punto de corte en 40 % de inhibición se destaca (línea vertical) con regiones sombreadas que denotan las muestras que no confirmaron tener anticuerpos específicos anti-VJC (DON₄₅₀ ≤ 0,25 y porcentaje de inhibición ≤ 40 %).

Las FIG. 5A y 5B son histogramas que describen la frecuencia de observaciones dentro de cada intervalo de inhibición del 10 % para todos los pacientes (n=515) (FIG. 5A) y pacientes uropositivos (n=204) (FIG. 5B). La

distribución consistió en dos picos claramente definidos, óptimamente con la máxima separación del 40 % de inhibición. Un nivel de inhibición de 40 % se correspondió con aproximadamente el quinto percentil inferior de la distribución de respuesta de las muestras uropositivas.

- 5 Las FIG. 6A y 6B son gráficos de valores Don_{450} del ELISA de detección (FIG. 6A) frente a los valores de porcentaje de inhibición del ELISA de confirmación (FIG. 5B) para las 11 muestras pre-LMP. Las líneas horizontales representan los valores Don_{450} de 0,10 y 0,25, la línea vertical representa el porcentaje de inhibición de 40 %.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10

Un ensayo sensible para los anticuerpos contra VJC que minimiza los falsos negativos y minimiza la detección de anticuerpos de reacción cruzada resulta útil para la identificación de sujetos que se expusieron al VJC. La implementación de una prueba de este tipo puede ser útil en la identificación de los sujetos que tienen una infección actual por VJC o que tuvieron suficiente exposición en el pasado al VJC para desarrollar anticuerpos contra el virus.

15

Un ensayo de este tipo puede proporcionar además una herramienta para ayudar a los médicos en la vigilancia clínica y en la estratificación de riesgo de LMP. Por ejemplo, tal ensayo puede ser útil para los médicos y pacientes como parte de una evaluación de riesgo del paciente en desarrollar LMP, evaluando con precisión si el sujeto se expuso a VJC. En algunos casos, el análisis puede incluir la determinación de los niveles de anticuerpos contra VJC en una muestra biológica del paciente.

20

Se encuentran ciertas dificultades en el desarrollo de un ensayo útil para los anticuerpos contra VJC, por ejemplo, el establecimiento de puntos de corte validados. Los solicitantes resolvieron este problema usando los datos derivados de las pruebas de muestras de orina y plasma de los pacientes que son uropositivos o uronegativos para el ADN de VJC. Otro problema es el desarrollo de un ensayo con especificidad y reproducibilidad. Los solicitantes resolvieron este problema mediante el uso de un ensayo de anticuerpo de una partícula altamente purificada que contiene la proteína viral. Además, los solicitantes descubrieron que el uso de un ensayo secundario para resolver las muestras con resultados ambiguos en el ensayo primario mejora la utilidad del ensayo para proporcionar un resultado útil para tales muestras.

25

30

En consecuencia, se desarrolló un ensayo analíticamente validado que usa una partícula similar a virus (VLP) altamente purificada que contiene VP1 para detectar la presencia de anticuerpo contra VJC en el fluido corporal, tal como suero, plasma, orina, LCR, u otro fluido corporal que contiene anticuerpos. En los experimentos para validar el nuevo ensayo, se identificó una prevalencia de aproximadamente 54 % de anticuerpos contra VJC en una población de pacientes con EM inscritos en un estudio clínico. Una característica clave del ensayo que se describe en el presente documento es el uso de una partícula similar a virus altamente purificada (HPVLP).

35

Una ventaja del ensayo que se describe en la presente descripción es que tiene una tasa de falsos negativos relativamente baja, p. ej., una tasa de falsos negativos de aproximadamente 10 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 1 % o menos para la detección de anticuerpos contra VJC. En general, el ensayo tiene una tasa de falsos negativos de sólo el 3 % o menos para la detección de anticuerpos contra VJC. Como se describe en el presente documento, el ensayo nuevo puede usarse para monitorizar la tasa de seroconversión para VJC. Por ejemplo, el ensayo se usó para descubrir una tasa de seroconversión anual de no más de aproximadamente 2 % en una cohorte de sujetos a ensayo que fueron negativos inicialmente para el anticuerpo contra VJC. Esto demuestra que el ensayo puede ser útil para monitorizar el estado de exposición al VJC de un sujeto en el tiempo.

45

50

El ensayo se puede usar para la detección de anticuerpos contra VJC en cualquier sujeto humano, incluyendo un sujeto que está considerando el tratamiento con un inmunomodulador, por ejemplo, una terapia anti-VLA-4 (p. ej., natalizumab), una terapia anti-CD20 (p. ej., rituximab), una terapia anti-CD11a (p. ej., efilizumab), o micofenolato de mofetilo; en un sujeto que se trata actualmente con un inmunomodulador; o un sujeto que dejó el tratamiento con un inmunomodulador. El ensayo puede ser útil para otras personas que puedan ser susceptibles a LMP, tales como los individuos que tienen trastornos linfoproliferativos, tal como mieloma múltiple o un linfoma; los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o que tienen el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), tumores malignos hematológicos, o una enfermedad autoinmune tal como lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad inflamatoria intestinal, tales como la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa, esclerosis múltiple (EM) o artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR). El ensayo puede ser útil además para los sujetos que reciben terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras, tales como los pacientes de trasplante. Las terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras ejemplares incluyen natalizumab, rituximab, efilizumab, y micofenolato de mofetilo. El ensayo puede ser útil para la detección de anticuerpos contra VJC en un sujeto que tiene un trastorno, o

60

que se trata con un fármaco, descrito en Piccinni y col. "Stronger association of drug-induced progressive multifocal

leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents" Eur. J. Clin. Pharmacol. 66:199-206, 2010, cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento por referencia.

VP1

5

Se descubrió que el uso de las HPVLP en un ensayo para anticuerpos contra VJC puede mejorar la precisión del ensayo y es útil en un ensayo adecuado para propósitos analíticos y de diagnóstico. La VP1 para usar en la producción de las HPVLP puede generarse usando los procedimientos conocidos en la técnica y puede ser VP1 de origen natural o VP1 producida por vía recombinante, p. ej., una VP1 de un virus VJC. En general, la VP1 que se usa es la VP1 de la cepa MAD1 de VJC. En algunas realizaciones, la VP1 que se usa en el ensayo comprende VP1 de más de una cepa VJC, por ejemplo, de una o más cepas 1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4, y 7. Después de la preparación de VP1, p. ej., VP1 sintetizada por vía recombinante, la VP1 para el uso en los ensayos que se describen en el presente documento es entonces purificada adicionalmente mediante procedimientos bioquímicos estándar, que incluyen los procedimientos de ultracentrifugación/gradiente de densidad, o una serie de etapas de precipitación química, concentración/diafiltración y cromatografía de intercambio iónico. Los procedimientos de purificación normalmente incluyen una etapa para eliminar las proteínas más pequeñas, que incluyen polipéptidos del monómero VP1, o pentámero de VP1. La eliminación de estas partículas más pequeñas se puede realizar, por ejemplo, en una etapa o en dos etapas (p. ej., una primera etapa de filtración para eliminar los monómeros de VP1, y después una segunda etapa de filtración para eliminar las partículas del pentámero de VP1). Tales procedimientos bioquímicos de purificación son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los ejemplos 1 y 7 proporcionan dos procedimientos diferentes de purificación de VLP-VP1 de VCJ.

Una preparación de HPVLP (varias HPVLP) de acuerdo con un aspecto de la presente invención no contiene cantidades significativas de monómero VP1 (p. ej., se purificaron para eliminar los monómeros). Una preparación de HPVLP de acuerdo con otro aspecto de la presente invención no contiene cantidades significativas de moléculas VP1 en configuraciones del tamaño de un pentámero de VP1, o menor (incluyendo el monómero). La HPVLP puede prepararse a partir de VP1 recombinante o VP1 de origen natural (p. ej., aislada del virus o cápsida del virus). En algunas realizaciones, los componentes adicionales de VJC, tales como una o ambas de las proteínas de la capa menor del virus JC, p. ej., VP2 o VP3, se incluyen en la partícula de HPVLP o se asocian con el sustrato.

30

En algunos casos, la VP1 expresada por vía recombinante no puede ensamblarse en pentámeros o en las HPVLP que se asemejan a las cápsidas virales de origen natural, por ejemplo, la VP1 que se expresa por vía recombinante puede ensamblarse en tubos u otras geometrías no esféricas. Como consecuencia, la invención se refiere a procedimientos para producir las HPVLP que son sustancialmente esféricas en geometría. La invención incluye las preparaciones de HPVLP donde al menos aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 99 % de las HPVLP en la preparación se asemejan a las cápsidas VJC de origen natural (p. ej., están en una configuración icosaédrica o sustancialmente esférica). En algunas realizaciones, una preparación HPVLP contiene al menos 10 %, 15 %, 20 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % de las HPVLP en la preparación se asemejan a las cápsidas VJC de origen natural. Los procedimientos de este tipo pueden incluir la expresión de proteínas virales bajo condiciones que resultan en una preparación y/o aislamiento y purificación de proteínas virales de este tipo expresadas como se describe en el presente documento para producir una preparación de este tipo.

45

Procedimientos de fabricación de la HPVLP

Las HPVLP pueden prepararse, por ejemplo, mediante la transformación de un baculovirus con un vector que expresa un gen de VP1 a partir de un virus JC. El baculovirus se usa para infectar un cultivo de células, tales como un cultivo de células de insectos (p. ej., células SF9) o un cultivo de células de mamífero, y las células expresan la proteína VP1. Las HPVLP se aíslan lisando las células, y purificando las partículas a través de una serie de etapas de centrifugación y ultrafiltración. En general, la purificación se realiza usando procedimientos tales como sedimentación por almohadilla de sacarosa, ultracentrifugación isopícnica y ultrafiltración extensa u otros procedimientos conocidos por expertos en la técnica. En determinadas realizaciones, la purificación incluirá centrifugar dos veces las partículas a través de una almohadilla de sacarosa. En un procedimiento de purificación alternativo, las células se lisan, y las partículas se aíslan mediante una serie de etapas de precipitación y concentración/diafiltración con una etapa final de intercambio iónico.

La pureza puede evaluarse usando cualquiera de las técnicas adecuadas conocidas en la técnica, por ejemplo, ultracentrifugación analítica, microscopía electrónica, análisis por PAGE, espectrometría de masas, concentración de

60

proteína, o actividad en un ELISA con sueros controles. Las VLP escasamente purificadas resultan en un fondo alto y producen falsamente altos niveles de anticuerpos contra VJC o tasas de exposición calculadas.

En algunas realizaciones, las HPVLP contienen VP1 como la única proteína del virus JC.

5

En algunas realizaciones, las HPVLP son partículas heterogéneas, y por lo tanto, incluyen la proteína VP1, y al menos una de las proteínas de la capa menor del virus JC, p. ej., VP2 o VP3. En otra realización, la HPVLP incluye las proteínas VP1, VP2 y VP3. Una HPVLP que incluye VP1 y VP2 puede producirse usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la transformación de un baculovirus con un ácido nucleico que incluye un gen de VP1 y un gen de VP2, tal como bajo el control de los mismos o diferentes promotores. Un cultivo de células se infecta con el baculovirus, y las células expresan VP1 y VP2, y forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. En una realización, los genes de VP1 y VP2 están en diferentes moléculas de ADN, las moléculas de ADN se transforman en diferentes baculovirus y los baculovirus se usan para transfectar las células en el mismo cultivo. Las células expresan las proteínas VP1 y VP2 y forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. En algunos casos, una HPVLP heterogénea incluirá, p. ej., uno o dos polipéptidos de VP2 por cada cinco polipéptidos de VP1. En general, una HPVLP contendrá más polipéptidos de VP1 que polipéptidos de VP2, como es el caso del virus JC de origen natural.

Una HPVLP que incluye tanto VP1 como VP3 o ambas moléculas puede producirse, por ejemplo, mediante la transformación de un baculovirus con un ácido nucleico que incluye un gen de VP1 y VP3 o un gen de VP1 o VP2, respectivamente, bajo el control de los mismos o diferentes promotores. Un cultivo de células se infecta con el baculovirus, y las células expresan VP1 y VP2 o VP1 y VP2, y forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. En algunas realizaciones, los genes VP1 y VP3 o VP1 y VP2 están en diferentes moléculas de ADN, las moléculas de ADN se transforman en diferentes baculovirus y los baculovirus se usan para transfectar las células en el mismo cultivo. Las células expresan las proteínas VP1 y VP3 o genes VP1 y VP2 respectivamente, y forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. Las partículas HPVLP pueden aislarse a partir de tales preparaciones usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se usan para aislar las cápsidas de VJC.

Normalmente, un pentámero de VP1 que es una HPVLP heterogénea incluirá, p. ej., cinco polipéptidos de VP1 y un polipéptido de VP3 y/o un polipéptido de VP2, dependiendo de si un gen de VP3 o un gen de VP2 se usó para preparar los constructos. Normalmente habrá más polipéptidos VP1 que polipéptidos VP3 o VP2 en una HPVLP. En algunos aspectos, la VP2 o VP3 es de un virus de polioma que no es un virus JC, p.ej., un polipéptido del virus BK.

Una HPVLP que incluye en total las tres moléculas VP1, VP2 y VP3 puede producirse mediante la transformación de un baculovirus con un ácido nucleico (p. ej., a un ADN circular, p. ej., < 5,5 kb) que incluye un gen de VP1, VP2 y VP3 o un gen de VP1 o VP3, tal como bajo el control de los mismos o diferentes promotores. Un cultivo de células, tal como un cultivo de células de mamífero, se infecta con el baculovirus, y las células expresan las proteínas VP1, VP2 y VP3. Por consiguiente se forman las HPVLP e incluyen en total los tres tipos de proteínas. En una realización, el VP1, y cualquiera de los genes de VP2 y VP3 o ambos se encuentran en diferentes moléculas de ADN, las moléculas de ADN se transforman en el mismo baculovirus o diferente, y el baculovirus se usa para infectar las células en los mismos cultivos o por separado. Las células expresan las proteínas VP1, VP2 y VP3, y forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. Una HPVLP heterogénea puede incluir, p. ej., cinco polipéptidos de VP1 y uno de cada uno de los polipéptidos de VP2 y VP3, a pesar de que las proporciones podrían variar dentro de la preparación. Normalmente habrá más polipéptidos VP1 que polipéptidos VP2 y VP3 en una HPVLP.

En algunas realizaciones, la HPVLP será mayor en tamaño que un pentámero de VP1. Se entiende por mayor en tamaño, que la masa de la proteína contenida en una partícula HPVLP es mayor que el pentámero que contiene únicamente a VP1.

50

En otras realizaciones, el procedimiento para preparar una solución de HPVLP puede incluir la eliminación de las partículas de la solución (p. ej., partículas que contienen monómeros de VP1 o VP1 pequeños) que son del tamaño de un pentámero de VP1 o más pequeñas. Los procedimientos tales como centrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño se pueden usar para realizar esta etapa de purificación. En algunas realizaciones, otros procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, se pueden usar en la preparación de las HPVLP que son mayores que un pentámero de VP1. En general, una preparación de HPVLP adecuada para usar en un ensayo contendrá al menos 20 % HPVLP, al menos 25 % de HPVLP, al menos 40 % de HPVLP, al menos 60 % de HPVLP, al menos 65 % de HPVLP, al menos 70 % de HPVLP, al menos 80 % de HPVLP, al menos 85 % de HPVLP, al menos 90 % de HPVLP, al menos 95 % de HPVLP, o al menos 99 % de HPVLP comparado con partículas no HPVLP (p. ej., por porcentaje de pentámeros comparado con los monómeros

60

VP1 y los agregados contienen menos de cinco moléculas VP1).

Punto de corte

5 La invención proporciona los procedimientos de análisis que emplean «puntos de corte» para reducir las tasas de falsos positivos y falsos negativos. Los puntos de corte se establecen basados en los datos de los ensayos de HPVLP (p. ej., para detectar anticuerpos contra VJC en una muestra biológica), que se promedian, por ejemplo, entre las muestras de prueba duplicadas y múltiples repeticiones (por ejemplo, al menos dos, al menos cuatro, o al menos ocho repeticiones de las muestras de control).

10 En una versión de un ensayo de acuerdo con la presente descripción, los resultados de los ensayos iniciales de detección de HPVLP, p. ej., ensayos ELISA, provocarán que una muestra de prueba se clasifique como que tiene o no tiene anticuerpos específicos a VJC, o, si la muestra no cae en una de estas dos clasificaciones, la muestra se someterá después a un ensayo de confirmación adicional. Por ejemplo, las muestras que producen un resultado
15 menor que un nivel establecido (p. ej., un $DO_{450} < 0,1$) en un ensayo ELISA de HPVLP presentado en la invención se clasificarán como carentes de anticuerpos específicos a VJC, y las muestras que proporcionan un resultado mayor que un nivel establecido (p. ej., un $DO_{450} > 0,25$) en el ELISA se clasificarán como positivos para anticuerpos específicos a VJC. Las muestras que no caen claramente en una de estas clasificaciones (p. ej., $0,1 < DO_{450} < 0,25$) se pueden probar en un ensayo confirmatorio.

20 En una realización, el ensayo confirmatorio requiere una etapa de pre-incubación, donde la muestra de ensayo se preincuba con tampón de control (u otra solución adecuada) o con las HPVLP (en tampón u otra solución adecuada) para preadsorber los anticuerpos específicos a VJC previo al análisis en un ELISA de HPVLP, como se describe con más detalles a continuación. Después de la pre-incubación con HPVLP si la reacción en el ensayo primario
25 disminuye por debajo del 40 % en comparación con el tampón de control, la muestra se interpreta entonces siendo negativa para la presencia de anticuerpos específicos a VJC. Si los resultados muestran una reducción ≥ 40 % en la reacción en comparación con el tampón de control en el ensayo primario después de la pre-incubación con HPVLP la muestra se interpreta entonces que contiene anticuerpos específicos a VJC. En realizaciones de la invención, se realiza solo el ensayo confirmatorio.

30 Un ejemplo de un procedimiento para seleccionar y verificar los puntos de corte adecuados se proporciona en el Ejemplo 4.

Sustrato

35 Cualquier sólido adecuado se puede usar para el formato de ensayo de HPVLP. En algunas realizaciones, el sustrato es una placa de microtitulación (p. ej., una placa de 96 pocillos) un portaobjetos, una esfera, o una columna. El sustrato puede ser adecuado para los procedimientos de detección cromogénicos o quimioluminiscentes.

Ensayo

Los ensayos se llevan a cabo mediante la adición de una muestra biológica a un sustrato que fue recubierto con una HPVLP y se detectó usando los procedimientos conocidos en la técnica. En general, una plataforma de base sólida se usa como una placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de 96 pocillos); a pesar de que se pueden usar
45 otros formatos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, se diluye la muestra biológica antes del uso en un ensayo.

En determinadas realizaciones, el formato de ensayo es un ensayo inmunoenzimático (ELISA). A grandes rasgos, el procedimiento incluye normalmente recubrir el sustrato con un antígeno de captura tal como HPVLP, incubar la
50 muestra que contiene los anticuerpos de unión dirigidos al reactivo de captura, lavar para eliminar las especies inespecíficamente unidas, y detectar los complejos inmunes de unión, p. ej., por un ensayo cromogénico o quimioluminiscente. Los sustratos cromográficos producen un producto final de color, que se puede detectar y medir visualmente o con el uso de un espectrofotómetro. Los sustratos quimioluminiscentes producen luz, que pueden medir usando un luminómetro.

55 El recubrimiento de la placa con HPVLP en general incluye incubar el sustrato sólido (tal como pocillos de una placa de microtitulación) con una solución de HPVLP a una concentración adecuada (p. ej., $1 \mu\text{g/ml}$), ya sea durante toda la noche o durante un determinado número de horas. La HPVLP puede incluir la VP1 como el único componente viral de VJC, o la HPVLP puede ser una partícula heteróloga, que contiene al menos una de VP2 o VP3 por partícula o al
60 menos una de cada una VP2 y VP3 por partícula. Después del recubrimiento con HPVLP, los pocillos de la placa se

lavan. El sustrato se «recubre» después con una proteína no específica que es antigénicamente neutral con respecto a las muestras que se prueban. Los materiales de recubrimiento adecuados se conocen en la técnica e incluyen albúmina de suero bovino (ASB), caseína o soluciones de leche en polvo.

5 La muestra de referencia se incuba con el sustrato preparado bajo condiciones eficaces para permitir la formación de complejos (HPVLP/anticuerpo contra VJC), formando de este modo un complejo de unión. La detección del complejo de unión se realiza usando un anticuerpo marcado que puede unirse al anticuerpo humano. En general, el anticuerpo marcado puede detectar IgG humana o IgG e IgM humanas. En algunos casos, el ensayo se puede realizar usando procedimientos de detección secundarios o terciarios.

10

Una muestra de referencia puede ser del mismo material biológico (p. ej., plasma, suero, orina o LCR) aislado de un sujeto conocido que se infecta con el virus JC basado en la presencia del ADN de VJC en la orina del sujeto (uropositivo). Una muestra de referencia se usa para establecer el punto de corte del ensayo tal que la tasa de falsos negativos del ensayo no es mayor que 1 % - 3 %.

15

«Bajo condiciones eficaces para permitir la formación del complejo» significa generalmente las condiciones en las que los reactivos se diluyeron para reducir el fondo y proporcionar las lecturas de los resultados que se encuentran dentro del intervalo especificado. Los diluyentes pueden incluir, en ejemplos no limitativos, soluciones que incluyen ASB, tampón fosfato salino (PBS), o PBS que contiene Tween.

20

Condiciones «adecuadas» incluyen además las condiciones que son a una temperatura y/o durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las incubaciones son normalmente de aproximadamente una a dos horas o de una a cuatro horas, a temperaturas de aproximadamente 25 °C a 27 °C, o pueden ser durante toda la noche a aproximadamente 4 °C. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica comprenderán que otras condiciones

25

pueden ser adecuadas.

En general, uno o más lavados se realizan entre las incubaciones del ensayo. Las soluciones de lavado apropiadas incluyen el tampón de dilución (p. ej., PBS o PBS/Tween) o tampón de borato.

30 En general, la detección del anticuerpo unido a HPVLP se realiza usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En general, los procedimientos de este tipo se basan en la detección de una etiqueta o marcador, tal como una etiqueta radioactiva, fluorescente, biológica o enzimática. Las patentes de EE. UU. concernientes al uso de tales marcadores incluyen, por ejemplo, las patentes estadounidenses con N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. En general, la detección de la unión del

35 anticuerpo contra VJC se detecta usando un anticuerpo secundario que se marca. En general, el anticuerpo secundario es específico para la detección de IgG humana. La cuantificación se logra por la medición del grado de color generado, p. ej., usando un espectrofotómetro de espectro visible.

El Ejemplo 2 ilustra un procedimiento de realización del ensayo y aquellos expertos en la técnica entenderán que se

40

pueden preparar modificaciones adecuadas.

En una realización, el ensayo se realiza en un consultorio médico, por un profesional sanitario, p. ej., un médico, una enfermera o un técnico, que trabaja en una instalación donde se obtiene la muestra biológica de un paciente. En otra realización, la muestra biológica obtenida de un paciente se transporta a otra instalación, p. ej., a una instalación de

45

terceros, donde se realiza el ensayo. En este último caso, los resultados del ensayo pueden comunicarse al profesional sanitario, tal como por ejemplo a través de un formulario, que se puede enviar por correo o por vía telemática (p. ej., a través de un fax o por correo electrónico) o a través de una base de datos en línea. En una realización, los resultados del ensayo (incluyendo el ensayo de detección y, opcionalmente, un ensayo confirmatorio) pueden almacenarse en una base de datos a la que puede acceder un profesional sanitario a través de la World

50

Wide Web.

Prueba secundaria

En la presente invención, se emplea una prueba secundaria (también referida en el presente documento como

55

«ensayo confirmatorio») de la muestra. Para la prueba secundaria, se usan dos alícuotas de una muestra biológica. La primera se prepara antes de su uso en el ensayo mediante preincubación de la muestra en la presencia de un tampón de ensayo en solución durante un período de tiempo (p. ej., durante 30 minutos, una hora, o más tiempo tal como toda la noche a 4 °C). La segunda alícuota se prepara antes de su uso en el ensayo mediante preincubación de la muestra en la presencia de HPVLP en solución durante un período de tiempo (p. ej., durante 30 minutos, o una

60

hora, o más tiempo). Las dos alícuotas se usan después en el ensayo de HPVLP como se señala en el presente

documento, y se prepara la asignación de la muestra para el anticuerpo contra VJC positivo o anticuerpo negativo. Si los resultados del ensayo para la alícuota incubada con HPVLP en solución son los mismos que para la primera alícuota incubada con el tampón en el ensayo primario (es decir, aproximadamente la misma DO), entonces, la muestra se interpreta que es negativa para la presencia de anticuerpos específicos de VJC. Si los resultados del ensayo son inferiores después de la pre-incubación (es decir, en el ensayo secundario), entonces, la muestra se interpreta que contiene anticuerpos específicos de VJC.

Un ensayo caracterizado en la invención que utiliza una prueba secundaria es referido en el presente documento también como una «prueba de dos etapas» o un «ensayo de dos etapas».

10

Informe de los resultados del ensayo

En algunas realizaciones, el ensayo incluye una visualización (p. ej., DO) con relación a una referencia o una visualización que es una evaluación de si la muestra es positiva, negativa o indeterminada para la presencia de anticuerpos contra VJC. En algunos aspectos, se proporciona un kit que incluye al menos HPVLP y, opcionalmente, otros componentes para un ensayo. Por ejemplo, el kit puede incluir controles positivos y negativos del ensayo, tampones y sustratos (p. ej, placas de microtitulación) para la preparación de las herramientas para realizar el ensayo ELISA primario, y el ensayo de confirmación secundario. El kit puede incluir, p. ej., disolventes o tampones, controles, un estabilizador, un conservante, un anticuerpo secundario, p. ej., un anticuerpo anti-HRP (IgG) y un reactivo de detección

20

La HPVLP puede proporcionarse en cualquier forma, p. ej., forma líquida, seca, semi-seca, o liofilizada, o en una forma para el almacenamiento en un estado congelado. En algunos aspectos, las HPVLP preparadas se sedimentan y almacenan en una forma semi-sólida.

25

Normalmente, las HPVLP se proporcionan en una forma que es estéril. Cuando la HPVLP se proporciona en una solución líquida, la solución líquida generalmente es una solución acuosa, p. ej., una solución acuosa estéril. Cuando la HPVLP se proporciona como una forma seca, la reconstitución generalmente se logra por la adición de un solvente adecuado. El solvente, p. ej., tampón estéril, opcionalmente se puede proporcionar en un kit.

30

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene las HPVLP en una concentración adecuada para el uso en el ensayo o con instrucciones para la dilución para uso en el ensayo. En algunos aspectos, el kit contiene recipientes separados, divisores o compartimentos para HPVLP y componentes del ensayo, y el material informativo. Por ejemplo, las HPVLP pueden estar contenidas en un frasco o vial, y el material informativo puede estar contenido en una funda plástica o paquete. En otros aspectos, los elementos separados del kit están dentro de un solo recipiente, no dividido. Por ejemplo, una composición HPVLP se contiene en un frasco o vial que tiene unido al mismo el material informativo en la forma de una etiqueta. En algunos aspectos, el kit incluye una pluralidad (p. ej., un paquete) de recipientes individuales, cada uno que contiene una o más formas unitarias de HPVLP (p.ej., para uso con un ensayo). Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de ampollas, sobres de papel, o paquetes de blíster, cada uno conteniendo una única unidad de HPVLP para el uso en un ensayo de detección o confirmatorio. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables. El recipiente puede etiquetarse para el uso.

35

En un aspecto, el kit puede incluir material informativo para la realización o interpretación del ensayo. En otro aspecto, el kit puede proporcionar orientación sobre dónde informar de los resultados del ensayo p. ej., a un centro de tratamiento o profesional sanitario. El kit puede incluir formularios para informar de los resultados de un ensayo de HPVLP descrito en el presente documento, y la dirección e información de contacto referente a dónde enviar tales formularios u otra información relacionada, o una dirección URL (siglas en inglés de Localizador uniforme de recursos) para informar de los resultados en una base de datos en línea o una aplicación en línea (p. ej., una aplicación de programa). En otro aspecto, el material informativo puede incluir orientación referente a si un paciente debería recibir tratamiento con un fármaco inmunomodulador, dependiendo de los resultados del ensayo.

45

El material informativo de los kits no se limita en su forma. En muchos casos, el material informativo, p. ej., instrucciones, se proporciona en material impreso, p. ej., un texto, figura, y/o fotografía impresos, p. ej., una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo puede proporcionarse además en otros formatos, tales como material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio. En otro aspecto, el material informativo del kit es una información de contacto, p. ej., una dirección física, dirección de correo electrónico, hipervínculo, página web, o un número de teléfono, donde el usuario del kit puede obtener información sustantiva acerca del ensayo HPVLP y/o su uso en los procedimientos descritos en el presente documento. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

50

55

60

En algunos aspectos, se proporciona una muestra biológica a un proveedor del ensayo, p. ej., un proveedor de servicios (tal como la instalación de un tercero) o un profesional sanitario, que evalúa la muestra en un ensayo y proporciona una lectura. Por ejemplo, en un aspecto, un proveedor del ensayo recibe una muestra biológica de un individuo, tal como plasma, muestra de sangre o suero, y evalúa la muestra usando un ensayo descrito en el presente documento, y determina que la muestra contiene anticuerpos contra VJC. El proveedor del ensayo, p. ej., un proveedor de servicios o profesional sanitario, puede concluir después que el sujeto está en riesgo aumentado de LMP. El proveedor del ensayo puede determinar además que el sujeto no es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, tal como una terapia anti-VLA, tal como natalizumab, o que el sujeto es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, pero el candidato tendrá el seguimiento reforzado, en comparación con un sujeto en el que se determina que no tiene anticuerpos contra VJC. Por ejemplo, el candidato deberá ser examinado con más frecuencia para el desarrollo de síntomas adversos, tales como síntomas que podrían indicar el desarrollo de LMP.

En una realización, el proveedor del ensayo realiza un ensayo descrito en el presente documento y determina que un sujeto no tiene anticuerpos detectables contra VJC. El proveedor del ensayo determina además que el sujeto es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, tal como natalizumab. En una realización, el proveedor del ensayo informa a un profesional sanitario que el sujeto es un candidato para el tratamiento con el inmunomodulador, y al candidato se le administra el inmunomodulador.

El proveedor del ensayo puede proporcionar los resultados de la evaluación, y, opcionalmente, las conclusiones referentes a una o más de las opciones de diagnóstico, pronóstico o terapia adecuada para, por ejemplo, un profesional sanitario, o paciente, o una compañía de seguros, en cualquier formato adecuado tal como por correo o por vía telemática, o a través de una base de datos en línea. La información recogida y proporcionada por el proveedor del ensayo se puede almacenar en una base de datos.

La invención se ilustra, además, por los siguientes ejemplos, los cuales no deben construirse como limitantes.

EJEMPLOS

30

Ejemplo 1: Síntesis y purificación de partículas VP1 altamente purificadas

Las HPVLP consistentes en proteína VP1 de la cápsida de VJC o VBK se produjeron en células de insecto SF9 transfectadas con un baculovirus recombinante. En el caso de las partículas que contienen VP1 de VJC, el baculovirus recombinante se transformó con un ácido nucleico que expresa VP1 de la cepa Mad-1 de VJC. La VLP recombinante se cosechó antes de la lisis celular y se purificó por ultracentrifugación diferencial, lavado con detergente y ultrafiltración.

Brevemente, las células infectadas con baculovirus se cosecharon por centrifugación a 3000 x G aproximadamente tres días después de la infección y se almacenaron congeladas hasta la purificación de las HPVLP. La purificación se realizó usando aproximadamente 100 gramos de sedimentos de células congeladas. Las células descongeladas se lisaron en 500 ml de PBS suplementado con 0,1 mM CaCl₂(PBS-C). Las células se rompieron al pasar la suspensión de células dos veces a través de un microfluidizador Microfluidizer®. El resto celular se eliminó por sedimentación a 8000 x G durante 15 minutos. El volumen de sobrenadante se ajustó a 720 ml con PBS-C y se cargó en 5 ml de almohadillas de sacarosa al 40 %. Las HPVLP se sedimentaron dos veces a través de almohadillas de sacarosa en un rotor SW28 a 100.000 x G durante 5 horas. Los sedimentos de HPVLP se resuspendieron en PBS-CaCl₂ y después se trataron con 0,25 % de desoxicolato durante 1 hora a 37 °C seguido por la adición de 4 M de NaCl suplementado con 0,1 mM de CaCl₂ durante 1 hora a 4 °C. El material precipitado se eliminó por centrifugación a 8000 x G durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se concentró y el tampón se intercambió por ultrafiltración a través de una membrana Pelicon-2 500.000 MWCO (siglas en inglés para peso molecular de corte) (Millipore). Las VLP concentradas se aplicaron al centro de un gradiente por etapa del 25-40 % de Optiprep™ (Sigma, St. Louis, MO) y se bandeó a 190.000 g durante 17 horas en un rotor de Tipo 50.2. Las bandas VLP se recogieron y se concentraron después y el tampón se intercambió en una celda Amicon agitada (Millipore) con una membrana 300.000 MWCO (peso molecular de corte). El material concentrado se filtró a través de un filtro de PES de 0,22 μ (polietersulfona) y se almacenó a 4 °C. Las VLP preparadas de esta manera se denominan HPVLP en el presente documento. La calidad de VLP se determina generalmente por electroforesis en gel y microscopía electrónica.

Para desnaturalizar las VLP para la determinación de proteína, se añadieron EDTA, DTT y SDS a las concentraciones finales de 2 mM, 2 mM y 2 % respectivamente. La concentración de proteína completamente

desnaturalizada se determinó mediante el uso del ensayo BCA de Pierce (ácido bicinconínico).

- Para el análisis por electroforesis en gel, se cargó un volumen suficiente para suministrar 2 µg a 5 µg de proteína total en geles de poliacrilamida prefabricados de 4 % a 20 % (NOVEX, San Diego, California) mediante el uso de un sistema de tampón NuPAGE® ácido morfolinoetanosulfónico-SDS (Invitrogen, Carlsbad, California). Los geles se sometieron a electroforesis a una corriente constante de 70 mA/gel a 80 mA/gel durante 30 minutos. Las bandas de proteínas se fijaron con metanol al 50 % y ácido acético al 10 % en agua destilada y se visualizaron con un reactivo azul de Coomassie colloidal commercial (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 10 Las VLP se evaluaron usando microscopía electrónica. Las muestras VLP se colocaron sobre rejillas de carbono, y se lavaron con agua brevemente y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y se dejaron secar. Las rejillas se visualizaron y fotografiaron en un Tecnai™ G2 Spirit BioTWIN TEM.

Un procedimiento de purificación alternativa de VLP-VP1 de VJC se presenta se presenta en el Ejemplo 7 más adelante.

Ejemplo 2: Ensayo de HPVLP para anticuerpo

- Un ensayo sensible para anticuerpos anti-VJC se desarrolló usando las HPVLP descritas en el presente documento y se refieren en este documento en sus diversas realizaciones como un ensayo de HPVLP. En un ejemplo del ensayo, las placas de microtitulación de 96 pocillos se prepararon por adición de una solución que contiene HPVLP a una concentración de 1 µg/ml y la incubación de las placas fue durante toda la noche a 4 °C. Los pocillos se enjuagaron con tampón diluyente y se bloquearon después durante una hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo de caseína y se enjuagaron con tampón diluyente. Los controles del ensayo y muestras de suero o plasma se diluyeron 1:200 en diluyente de ensayo. Las muestras diluidas y controles se añadieron a los pocillos e incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se lavaron con tampón diluyente. La detección se realizó con anticuerpo anti-humano-HRP (IgG) en burro, que se añadió a los pocillos e incubó a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron después y se añadió tampón TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Chromagen, Inc., San Diego, California). Después de un desarrollo durante un tiempo adecuado que permite desarrollar el color (aproximadamente 20 minutos), la reacción se detuvo con H₂SO₄ 1 N, y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los niveles de anticuerpo anti-VJC en las muestras se expresaron como unidades DO.

El ensayo se interpretó como se describe más abajo usando las unidades de DO para determinar los niveles.

- 35 En la prueba secundaria, si las muestras desconocidas produjeron por encima de 40 % de inhibición competitiva de unión con HPVLP en la solución, la muestra se consideró VJC + (VJC positiva), y <40 % de inhibición se anotó como VJC - (VJC negativo).

Inicialmente, las muestras con valores de DO mayores que la DO del punto de corte (media de la DO del control negativo x 1,23) se definieron como positivas para la presencia de anticuerpos contra VJC, mientras que las muestras con valores de DO igual o menores que la DO del punto de corte se definieron como negativas.

- Los controles que se usan en el ensayo se seleccionaron en base a la DO objetivo y la especificidad (como se determina en el ensayo de confirmación secundaria para especificidad (descrito *infra*) e incluyeron el Control Positivo 1, que mezcló sueros de donantes con alta reactividad en el ensayo definido como que tiene valor de DO objetivo de aproximadamente 1,0 y para la especificidad compitió con VJC >80 %; el Control Positivo 2 que contenía sueros de donantes mezclados con una menor reactividad en el ensayo se definió como que tiene un valor objetivo de la DO de aproximadamente 0,25 en el ensayo y la especificidad compitió con VJC > 80 %; y el Control Negativo, que mezcló sueros de donante con reactividad similar al tampón de control en el ensayo que tiene un valor DO objetivo de aproximadamente 0,07 (tenga en cuenta que el tampón de ensayo tiene un valor de DO de aproximadamente 0,045).

En algunos casos, un ensayo de titulación se llevó a cabo cuyas muestras positivas se probaron en diluciones múltiples, y la dilución más alta dando un valor de DO mayor que la DO del punto de corte se definió como el título IgG de VJC.

Los ensayos se validaron desde la perspectiva de especificidad, precisión, interferencia de matriz, robustez y estabilidad del reactivo.

60

Ejemplo 3: Ensayo secundario de confirmación

En algunos casos un ensayo secundario de confirmación (ensayo secundario) se llevó a cabo además de la prueba descrita *supra*. En el ensayo de confirmación, las muestras plasma o suero) se incubaron con HPVLP (concentración dinal de VLP = 1 µg/ml; dilución de la muestra final = 1:200) durante una hora a temperatura ambiente antes del uso en el ensayo. Las muestra de control se incubaron en tampón de ensayo, y no en presencia de HPVLP. El ensayo se realizó después como se describió anteriormente. Un porcentaje de inhibición DO_{n450} se calculó como: % de inhibición = $100 \times [1 - (\text{promedio de } DO_{n450}) (\text{muestras pre-incubadas VLP de MAD-1 VJC}) \div (\text{promedio } DO_{n450}) (\text{muestras incubadas con el tampón})]$.

Si los resultados del ensayo eran los mismos después de la pre-incubación con tampón como en el ensayo primario (es decir, aproximadamente la misma DO), entonces, la muestra se interpreta que es negativa para la presencia de anticuerpos específicos de VJC. Si los resultados del ensayo eran inferiores después de la pre-incubación con las HPVLP (es decir, en el ensayo secundario), entonces, la muestra se interpreta que contiene anticuerpos específicos a VJC.

Ejemplo 4: Algoritmo de punto de corte del ensayo de detección/confirmación

La prueba serológica (prueba de anticuerpo contra VJC) se configuró como un ensayo en dos etapas: un ELISA de detección y un ELISA de confirmación adicional (ensayo secundario).

Para la comparación de los resultados entre las placas de ensayo, series de ensayo, y analistas, los resultados de las muestras se normalizaron al valor de densidad óptica (DO_{450}) del control positivo en la placa y se informaron como DO_{450} normalizada como se describe más abajo.

Para implementar la utilidad del ensayo HPVP, los puntos de corte se derivaron usando un modelo Weibull de distribución de la mezcla de tres componentes. En estas determinaciones, se usaron las siguientes definiciones:

$$DO (DO_n) \text{ normalizada de ensayo de detección} = \frac{\text{media(muestra_DO_duplicados)}}{\text{media(PC1_DO_repeticiones)}}$$

Por ejemplo:
 Promedio (duplicados de la DO de la muestra) = 0,60
 Promedio (repeticiones de la DO del Control Positivo 1) = 1,20
 DO normalizada = $0,60/1,20 = 0,50$.

Para el ensayo de confirmación

$$\text{Porcentaje de inhibición del ensayo de confirmación} = 100 \% \times \left(1 - \frac{\text{competencia_muestra_DO}}{\text{sin competencia_muestra_DO}}\right)$$

En el ELISA de confirmación adicional, la HPVLP soluble se usó para pre-adsorber anticuerpos de alta afinidad contra VJC, en las muestras antes de la evaluación de las muestras en el ELISA de detección. Los resultados se calcularon como porcentaje de inhibición para determinar la disminución de la reactividad en el ELISA de detección después de que las muestras se pre-adsorbieron con HPVLP [% de inhibición = $100 \times [1 - (\text{promedio } DO_{n450} \text{ de muestras pre-incubadas con HPVLP}) \div (\text{promedio } DO_{n450} \text{ de muestras incubadas con tampón})]$].

Las tasas de falsos positivos y falsos negativos se definieron como sigue. La tasa de falsos negativos es la proporción de muestras verdaderas positivas de virus JC que se determinan mediante el ensayo que sean negativas a anticuerpos. La tasa de sero-positivos es la proporción de muestras determinadas que sean sero-positivas (es decir, tienen anticuerpos contra VJC como se determinó usando el algoritmo del punto de corte anti-VJC de detección/confirmación).

Los datos se analizaron usando SAS versión 9. Los datos que no demuestran una distribución normal se analizaron por la prueba U de Mann-Whitney. Los datos categóricos se analizaron usando la prueba χ^2 de Pearson o la prueba

exacta de Fisher dependiendo del tamaño de la muestra. El coeficiente de correlación de Pearson se usó para evaluar la relación entre DO_{450} y los niveles urinarios del ADN de VJC. Todas las pruebas fueron de dos lados a un nivel alfa de 0,05. Los límites de confianza para las tasas de seroprevalencia y falsos negativos se obtuvieron por el procedimiento de estimación del percentil (6) usando 10.000 estimaciones.

5

Ejemplo 4(a): Reactividad serológica a VJC

Se llevó a cabo un estudio para establecer un ensayo con objeto de detectar anticuerpos anti-VJC en pacientes con EM y llevar a cabo una evaluación preliminar de la utilidad clínica potencial del ensayo para la estratificación del riesgo de LMP. Para caracterizar las respuestas de anticuerpos frente a gentes infecciosos en humanos, fue importante tener sueros de referencia tanto de sujetos infectados como de no infectados. Aunque la naturaleza asintomática de la infección de VJC hace que sea imposible identificar sujetos negativos «verdaderos», los solicitantes fueron capaces de identificar una población de sujetos positivos «verdaderos» por la medición del ADN de VJC en la orina de sujetos «uropositivos».

15

Los niveles urinarios del ADN de VJC [recogidos en el protocolo de ensayo clínico STRATA](reinicio de la dosificación de natalizumab) se determinaron por un ensayo cuantitativo en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (PCRc) (ViraCor Laboratories, Lee's Summit, Missouri), con un límite de cuantificación de 500 copias/ml y un límite de detección de 50 copias/ml.

20

El nivel de anticuerpo anti-VJC de 831 muestras de suero en pacientes con EM, que incluyen las muestras de 204 pacientes uropositivos a VJC se evaluó inicialmente para los anticuerpos anti-VJC en un ELISA de detección para determinar la distribución de las respuestas serológicas. Los resultados del ensayo junto al nivel urinario del ADN mostraron la presencia de dos superposiciones pero de poblaciones distintas de reactividad de IgG a VJC (FIG. 1).

25

El nivel medio de reactividad de los pacientes de EM uropositivos a ADN de VJC ($DO_{450} = 0,895$) fue significativamente superior que el de los pacientes de EM uronegativos a ADN de VJC ($DO_{450} = 0,131$; $p < 0,001$), y ningún paciente uropositivo mostró reactividad de ensayo por debajo de un DO_{450} de 0,10. Por lo tanto, se estableció un punto inferior de corte de ensayo en DO_{450} de 0,10, donde la tasa empírica de falsos negativos en la zona negativa fue 0 %.

30

Muchos pacientes con niveles no detectables de ADN de VJC en la orina (uronegativos) tuvieron reactividad serológica similar a aquella de los pacientes uropositivos. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que una prueba de orina del ADN de VJC es propensa a dejar de detectar todos los sujetos infectados por el VJC.

35 Ejemplo 4(b): Carga urinaria del ADN de VJC y actividad serológica

Para abordar la preocupación potencial de que los pacientes infectados por VJC con bajos niveles de replicación viral podrían tener bajos niveles de anticuerpo séricos que no se detectan en el ensayo serológico (falsos negativos potenciales) se examinó la correlación entre los niveles virales y la reactividad del anticuerpo. La FIG. 2 muestra los datos de 204 pacientes STRATA uropositivos a ADN de VJC, e ilustra que no existe ninguna relación detectable entre los niveles urinarios del ADN de VJC y los niveles de anticuerpos anti-VJC en muestras con DO_{450} por debajo de 0,60 (coeficiente de correlación de Pearson = 0,048, $p = 0,751$). Este resultado es cierto incluso si la orina y el suero se recogieron en el mismo intervalo de tiempo del estudio STRATA (coeficiente de correlación de Pearson = 0,002, $p = 0,993$). En la $DO_{450} > 0,60$, una correlación más fuerte se observó con una proporción superior de muestras de suero de sujetos con altas copias/ml de ADN de VJC presentando valores superiores de DO_{450} , de acuerdo con documentos de la bibliografía (e.g., Egli y col., J. Infect. Dis. 199:837-846, 2009). Estos datos sugieren que los resultados seronegativos son probablemente debido a una ausencia de infección de VJC, en lugar de a niveles virales muy bajos.

50 Ejemplo 4(c): Evaluación de la reactividad cruzada VBK-VJC

La asignación de un punto de corte conservativo único que controla la tasa de falsos negativos en 0 % es poco probable para excluir la detección de anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otros virus de poliovirus comunes (falsos positivos), tales como anticuerpos anti-VBK, que comparten alta identidad con VJC, en la proteína cápsida VP1. Además, la reactividad cruzada del anticuerpo de ese tipo se podría presentar a través de la exposición de epítomos virales conservados cuando la HPVLP se recubre directamente con la placa de ELISA. Debido a que las infecciones dobles con VBK y VJC pueden ocurrir en humanos, y no es posible identificar de forma fiable los pacientes que se infectaron con el VBK y no con VJC, el asunto de la reactividad cruzada se examinó en conejos, una especie en la que no puede ocurrir la infección natural, ya sea con VBC o VJC.

60

Los conejos se inmunizaron con VBK por inyección subcutánea de proteínas en solución salina tamponada con fosfato sin adyuvante, seguido por tres inyecciones de refuerzo durante un período de tres meses. Las muestras de suero se ensayaron por la unión directa a VJC o VBK por ELISA. Los antisueros de conejos inmunizados con VBK unieron las VLP de VBK con alta afinidad ($EC_{50} = 1:100.000$) y reaccionaron de forma cruzada con la HPVLP con menor afinidad ($EC_{50} = 1:5.000$). El suero pre-inmune no mostró reactividad. Los datos representativos de un conejo se muestran en la FIG. 3.

Debido a que los anticuerpos contra VBK reaccionaron de forma cruzada con VJC, produciendo de este modo una señal falsa positiva en el ensayo anti-VJC (FIG. 3), la reactividad de bajo nivel contra VJC en humanos podría representar la baja afinidad de los anticuerpos anti-VBK que reaccionan de forma cruzada con VJC para producir señales falsas positivas.

Ejemplo 4(d): Medición de la respuesta de anticuerpo específico a VJC (ELISA de confirmación adicional)

Para distinguir a los pacientes con anticuerpos específicos a VJC de aquellos con anticuerpos reactivos cruzados de afinidad potencialmente baja, se desarrolló un ELISA de competencia usando HPVLP soluble (ensayo secundario). Los anticuerpos de afinidad superior específicos a VJC se esperó que fueran más eficazmente competitivos por el antígeno soluble, mientras que los anticuerpos de afinidad inferior pueden desprenderse de los complejos formados con el antígeno VJC en solución y unirse a la VLP de VJC que se recubre en la placa ELISA. Un subconjunto de 515 muestras de suero de pacientes uropositivos ($n = 204$) y uronegativos ($n = 311$) se muestrearon de manera sistemática y no proporcional para la evaluación en el ELISA después de la pre-adsorción ya sea con VLP de VJC soluble o tampón de ensayo. En las FIG. 4A y 4B, la reactividad de las muestras de suero de pacientes uronegativos o uropositivos en los ensayos de detección y confirmación se muestran en paralelo. Las muestras con fuerte reactividad VJC se inhibieron altamente por la pre-adsorción de anticuerpos con VJC soluble, mientras que las muestras con niveles bajos de anticuerpos VJC mostraron competencia diferencial. Las respuestas de anticuerpo en la mayoría de los pacientes uropositivos fueron fuertemente competitivas (FIG. 4B). Estos resultados apoyan la idea de que una proporción significativa de baja reactividad de suero a VJC se podría deber a la reactividad cruzada de los anticuerpos no específicos a VJC.

La distribución de las respuestas de los sueros en el ELISA de confirmación consistió de dos picos definidos, separados más óptimamente en la inhibición al 40 % (FIG. 5A) correspondiendo aproximadamente al quinto percentil inferior de la distribución de respuesta de las muestras uropositivas (FIG. 5B). Por lo tanto, el nivel de inhibición de 40 % se seleccionó como el punto de corte para el ELISA de confirmación.

Ejemplo 4(e): Ensayo serológico anti-VJC de dos etapas finalizado

Mediante la combinación de los ensayos de detección y confirmación, se mejora mucho la posibilidad de detectar las muestras con anticuerpos específicos a VJC «verdaderos». En el análisis final, las muestras con valores $DO_{n450} < 0,10$ en el ELISA de detección se consideran negativas para los anticuerpos contra VJC, y aquellas con valores $DO_{n450} > 0,25$ en el ELISA de detección se consideran positivas para los anticuerpos contra VJC. Las muestras con reactividad entre los valores de Don de 0,10 a 0,25 se probaron además en el ELISA de confirmación. En el ELISA de confirmación, todas las muestras que presentan inhibición $> 40\%$ se clasifican como positivas (FIG. 4). En los valores de $DO_{n450} > 0,25$, la probabilidad de observar la inhibición $> 40\%$ fue aproximadamente del 95 %.

Ejemplo 4(f): Seropositividad a VJC en la cohorte STRATA y tasa de falsos negativos

Basado en el algoritmo anterior, la tasa de seroprevalencia en la población STRATA se estimó como un 53,6 % con estimación determinada por los límites de confianza de 95 % con intervalo de 49,9 % a 57,3 % [$0,536 = 0,451$ (probabilidad del ELISA de detección $DO_{n450} > 0,25$) + $0,085$ (probabilidad de ELISA de detección DO_{n450} que cae entre 0,10 y 0,25, y ELISA de confirmación adicional % de inhibición de $> 40\%$)]. Este cálculo de seroprevalencia supone la confirmación de los anticuerpos anti-VJC en proporciones iguales de las muestras de sujetos uropositivos y uronegativos en la región Don entre 0,10 y 0,25. (porcentaje de inhibición $> 40\%$), esta hipótesis se apoyó por una prueba exacta de Fisher de 2 lados con un valor p de 0,702.

De los 204 pacientes uropositivos, cinco tuvieron DO_{n450} entre 0,10 y 0,25 y no confirmaron que tuvieran anticuerpos específicos anti-VJC (porcentaje de inhibición $\leq 40\%$; FIG. 4B).

Ejemplo 5: Validación de ensayo

La validación del ensayo fue realizada por Focus Diagnostics, Inc. (Cypress, California), donde se demostraron los

parámetros de rendimiento, que incluyeron: precisión inter e intra-ensayo, especificidad, sensibilidad y estabilidad de los reactivos del ensayo y controles. Los parámetros de rendimiento del ensayo, se demostraron incluyendo la precisión inter e intra-ensayo, especificidad, sensibilidad y estabilidad de los reactivos del ensayo y los controles. Los parámetros de precisión se evaluaron por tres analistas independientes, tanto en plasma como en suero en cuatro días diferentes y usando preparaciones independientes de los controles del ensayo. Para la demostración de la especificidad del ensayo, diez muestras de suero y plasma individual de voluntarios sanos o pacientes con EM [TYSABRI® (natalizumab) sin tratar] fueron preincubados ya sea con tampón de ensayo o una concentración definida de HPVLP o VLP de VBK en solución. La robustez se evaluó por la variación de los límites superior e inferior de los tiempos de incubación de la muestra, conjugado, y etapas de adición de sustrato y fueron evaluados diferentes lotes de reactivo de recubrimiento HPVLP para demostrar un rendimiento consistente del control del ensayo. La interferencia de la matriz fue evaluada por la determinación del porcentaje de recuperación en muestras enriquecidas con concentraciones predefinidas de anticuerpos anti-VJC y por muestras enriquecidas que contienen anticuerpos específicos a VJC con concentraciones diversas de anticuerpos monoclonales humanos irrelevantes.

15 Ejemplo 6: Determinación del nivel de anticuerpos contra VJC en pacientes con LMP

Las muestras de plasma y suero (intervalos de tiempo únicos seleccionados al azar de las colecciones en serie) se obtuvieron en un total de 831 pacientes del estudio de seguridad de re-dosificación y tratamiento de TYSABRI (STRATA). STRATA es un estudio abierto, de un solo grupo, multinacional (Norteamérica, Europa, Australia y Nueva Zelanda) en el que todos los pacientes reciben 300 mg de natalizumab por infusión intravenosa cada 4 semanas durante 48 semanas. Las muestras de orina recogidas de acuerdo con el protocolo STRATA fueron analizadas para la presencia del ADN de VJC.

Desde la aprobación de la comercialización de TYSABRI® en junio de 2006 al 9 de febrero de 2010, hubo 35 casos comunicados de LMP en el tratamiento con natalizumab. Además, hubo tres casos de LMP en los ensayos clínicos anteriores a la aprobación de natalizumab (10, 13, 25). Las muestras almacenadas se obtuvieron de muchos casos de LMP y de los posibles intervalos de tiempo antes del diagnóstico de LMP (anterior a LMP). Las muestras de plasma o suero sólo estuvieron disponibles a partir de 11 pacientes con LMP tratados con natalizumab (10 pacientes con EM y 1 paciente con Crohn: Tabla 1). Las muestras de suero fueron probadas que se obtuvieron de uno a tres años antes del diagnóstico de LMP. Casi todas estas muestras se habían recogido de pacientes que participaban en registros o estudios clínicos y se almacenaron a -70 °C hasta el análisis. Notablemente, los anticuerpos anti-VJC se detectaron en todos los 11 pacientes (100 %) a través de la combinación del ELISA de detección del nivel serológico y el ELISA de confirmación adicional (FIG. 6A y 6B) descrito anteriormente. Mediante el uso de una prueba exacta de Fisher de una muestra, el resultado fue significativamente diferente de la proporción esperada (53,6 %) con un valor de p de 0,002.

Estos datos indican que el ensayo de la presente invención se puede usar para determinar la presencia o ausencia de anticuerpo contra VJC en los sujetos y como parte de una evaluación global del riesgo de contraer LMP.

40 Tabla 1. Muestras de 11 pacientes con LMP tratados con natalizumab que tuvieron muestras de sangre disponibles antes del diagnóstico.

Sujeto	Fuente	Geografía	Diagnóstico de LMP (fecha)	Exposición a natalizumab		Uso de inmunosupresor	
				N.º de dosis o meses	Dosis final	Tipo	Duración
1	Estudio clínico*	Bélgica	Marzo de 2005	5 dosis	Junio de 2003	Infliximab Azatiopina	32 meses 73 meses
2	Estudio clínico (SENTINEL)	Estados Unidos	Febrero de 2005	28 dosis	Diciembre de 2004	Ninguno	
3	Estudio clínico (SENTINEL)	Estados Unidos	Febrero de 2005	37 dosis	Enero de 2005	Ninguno	
4	Posterior a la comercialización	Suecia	Junio de 2008	17 meses	Junio de 2008	Ninguno	
5	Estudio clínico (STRATA)	Alemania	Junio de 2009	34 dosis	Abril de 2009	Mitoxantrona	11 meses
6	Estudio clínico (STRATA)	Francia	Junio de 2009	35 dosis	Mayo de 2009	Mitoxantrona	10 meses
7	Posterior a la	Suecia	Junio de 2009	29	Junio de	Ninguno	

	comercialización			meses	2009		
8	Posterior a la comercialización	Suiza	Agosto de 2009	28 dosis/25 meses.	Junio de 2009	Mitoxantrona	18 meses
						Azatiopina	21 meses
9	Posterior a la comercialización	Suiza	Octubre de 2009	36 meses	Septiembre de 2009	Mitoxantrona	4 años
10	Estudio clínico (STRATA)	República Checa	Octubre de 2009	44 dosis	Septiembre de 2009	Azatiopina	3 meses
11	Posterior a la comercialización	Estados Unidos	Octubre de 2009	33 dosis	Septiembre de 2009	Metotrexato	Desconocido

*Enfermedad de Crohn; SENTINEL = Seguridad y eficacia de natalizumab en combinación con Interferon Beta-1a en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente; STRATA = Seguridad de re-dosificación y tratamiento de TYSABRI; cada día = 4 x día; cada semana = 1 x semana
 SENTINEL = Seguridad y eficacia de natalizumab en combinación con Interferon Beta-1a en pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente; STRATA = Seguridad de re-dosificación y tratamiento de TYSABRI®; ROW = resto del mundo; cada día = 4 x día; cada semana = 1 x semana. *Tratamiento tanto antes como concurrente con natalizumab.

- Los datos longitudinales de otros sujetos que toman un inmunomodulador fueron también evaluados (es decir, múltiples muestras recogidas en diferentes momentos de un único individuo). Los datos longitudinales indicaron que, a diferencia de evaluar la pérdida intermitente de ADN urinario, el ensayo de HPVLP puede usarse de forma fiable para evaluar el nivel de anticuerpo anti-VJC, y que el nivel de anticuerpo contra VJC se mantiene relativamente estable (en ausencia de infección *de novo*).

Ejemplo 7: Procedimiento de purificación alternativo de VLP-VP1 de VJC

- 10 Este procedimiento es un ejemplo de una alternativa al procedimiento de ultracentrifugación/densidad de gradiente descrito anteriormente para la purificación de las VLP-VP1 de VJC a partir de células de insectos. Las etapas generales del protocolo son lisis, tratamiento con benzonasa, precipitación con desoxicolato, precipitación con sulfato de amonio y concentración/diafiltración, con una etapa final de intercambio iónico usando Fractogel TMAE.
- 15 Las células Sf9 infectadas con baculovirus de VP1-VJC se lisaron en PBS, 0,1 mM de CaCl₂ pasando dos veces a través de un disruptor microfluidizador de células a 5.000 psi. El resto celular se eliminó por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante se trató con 40 unidades/ml de Benzonasa (EMD Biosciences 71206-3) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la etapa de precipitación con desoxicolato, un décimo de volumen desoxicolato al 2,5 % fue añadido al lisado (desoxicolato final al 0,25 %), y el lisado se incubó a 37 °C durante 1 hora con agitación suave. Un volumen igual de 4 M de NaCl, 0,1 mM de NaCl fue añadido al lisado y el lisado se incubó en hielo durante 1 hora. El precipitado se eliminó por centrifugación a baja velocidad. El sobrenadante se precipitó después con sulfato de amonio al 40 % para eliminar las proteínas contaminantes. El 40 % final se logró por el uso de 232 g de sulfato de amonio sólido por litro de solución. Al mezclar la solución suavemente a 4 °C, el sulfato de amonio fue añadido en un quinto cada vez, permitiendo disolver cada adición durante 10 a 15 minutos antes de añadir la fracción siguiente. La solución se agitó suavemente durante toda la noche a 4 °C. El precipitado de sulfato de amonio se eliminó por centrifugación a baja velocidad y el sobrenadante que contiene VP1 se filtró usando un filtro de 0,45 µm y se siguió con la etapa siguiente. La solución se concentró de 5 a 10 veces usando una membrana TFF de 100 kDa NMWL TFF (Pellicon 2 Mini UF Mod Biomax-100 C 0,1m², P2B100C01) y se intercambió el tampón de ajuste (25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂, pH 7,5) diluyendo 5 veces y concentrando de nuevo dos veces el volumen de partida. La solución se almacenó a 4 °C durante >= 36 horas. La solución se diafiltró después, usando una membrana TFF de 500 kDa NMWL (Pellicon 2 Mini UF Mod Biomax-500 V, Millipore n.º de parte P2B500V01) usando 40 volúmenes de tampón de cromatografía TMA (25 mM de Tris, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 8,0). Para la cromatografía se requiere aproximadamente 1 ml de resina por 2 g de masa celular de partida. La proteína se cargó en la columna TMAE de tamaño apropiado (Fractogel® EMD TMAE HiCap (M) - EMD Biosciences catálogo 1.10316) y se lavó con 3 volúmenes de tampón de cromatografía. Las VLP se eluyeron con 25 mM de Tris, 600 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, pH 8,0. La pureza de VP1 se evaluó por SDS-PAGE y espectrometría de masas, la presencia de las VLP se confirmó por microscopía electrónica, y el porcentaje de proteína total en forma de VLP se determinó mediante ultracentrifugación analítica por velocidad de sedimentación. Este procedimiento resultó en preparaciones de HPVLP en aproximadamente el 80 % de las HPVLP.

40

OTRAS REALIZACIONES

Se han descrito varias formas de realización de la invención. En consecuencia, otras formas de realización están

dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento «in vitro» que comprende:
 - 5 (a) contactar la muestra con partículas similares a las virales altamente purificadas (HPVLP, siglas en inglés) que consisten principalmente en la proteína VP1 del virus JC (VJC), en solución bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP, de esta forma proporcionando una muestra preincubada;
 - (b) contactar la muestra preincubada con una HPVLP, que consiste principalmente en una proteína VP1 del VJC,
 - 10 inmovilizada en un sustrato sólido bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP;
 - (c) detectar el nivel de anticuerpo contra VJC en la unión de muestra preincubada con las HPVLP inmovilizadas; y
 - (d) comparar el nivel detectado anticuerpo contra VJC en la muestra biológica preincubada con el nivel de anticuerpo contra VJC detectado en la muestra biológica obtenida del sujeto que fue preincubada en una solución sin HPVLP, y
 - 15 que entró en contacto con la HPVLP inmovilizada en un sustrato sólido bajo condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo contra VJC en la muestra con una HPVLP, donde las HPVLP están compuestas de más de 5 y al menos 50, 150 o 360 polipéptidos de VP1.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde una disminución por encima de un porcentaje
 - 20 especificado en el nivel detectado de anticuerpo contra VJC en la muestra biológica pre-incubada en comparación con la muestra biológica obtenida del sujeto que fue pre-incubada en una solución sin HPVLP indica que la muestra es positiva para anticuerpo contra VJC, y un cambio en el nivel detectado de anticuerpo contra VJC por debajo de un porcentaje especificado indica que no hay presencia de anticuerpo específico a VJC en la muestra.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el contacto de la muestra biológica con las HPVLP en una solución es durante un período de tiempo seleccionado de 30 minutos, una hora, o durante toda la noche.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, donde el porcentaje especificado es del 40 %.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 2 donde el porcentaje especificado es seleccionado para proporcionar una tasa de falso negativo del 3 % o menos para la detección de anticuerpos contra VJC en la muestra obtenida del sujeto.
6. El procedimiento de la reivindicación 2 donde el porcentaje especificado es seleccionado para
 - 35 proporcionar una tasa de falso negativo del 1% o menos para la detección de anticuerpos contra VJC en la muestra obtenida del sujeto.
7. El procedimiento de la reivindicación 2, donde la muestra biológica obtenida del sujeto es clasificada
 - 40 como negativa para anticuerpo contra VJC cuando el nivel de anticuerpo contra VJC en la muestra biológica pre-incubada unida a las HPVLP inmovilizadas es aproximadamente el mismo que el nivel de anticuerpo contra VJC detectado en la muestra biológica obtenida del sujeto que fue pre-incubada en una solución sin HPVLP.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde las HPVLP contienen más de 1, al menos 5, 10, 20, 30,
 - 45 40, 50, 60, 70 o 72 pentámeros de VP1.
9. El método según la reivindicación 1, donde:
 - (i) una HPVLP comprende además al menos una VP2 de VJC o una VP3 de VJC; o
 - (ii) la VP1 en una HPVLP es una VP1 recombinante; o
 - 50 (iii) al menos una VP1 en la HPVLP es una VP1 mutante.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la muestra biológica es suero.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la muestra es de un sujeto con un inmunomodulador
 - 55 prescrito, un sujeto que está considerando tomar un inmunomodulador, o un sujeto sospechoso de tener leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), donde el inmunomodulador se selecciona de una terapia anti-VLA-4, y una terapia anti-CD20, una terapia anti-CD11a, o micofenolato de mofetilo.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde el sujeto con un inmunomodulador prescrito o que está
 - 60 considerando tomar un inmunomodulador, no ha recibido anteriormente el inmunomodulador.

13. El procedimiento de la reivindicación 11, donde el sujeto ha recibido previamente una o más dosis del inmunomodulador.
- 5 14. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde la detección de la unión del anticuerpo contra VJC a las HPVLP indica que el sujeto:
- (i) se expone a un riesgo aumentado de LMP si la muestra biológica es positiva para anticuerpo contra VJC; o
(ii) no es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador si la muestra biológica es positiva para anticuerpo contra VJC; o
10 (iii) es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador y seguimiento reforzado para síntomas adversos tras el tratamiento con el inmunomodulador, opcionalmente donde los síntomas adversos indican el desarrollo de LMP.
- 15 15. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 donde el fallo para detectar los anticuerpos contra VJC que se unen a las HPVLP indica que el sujeto es un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador.
16. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 donde un sujeto que tiene una muestra biológica que indica no tener anticuerpos contra VJC en una prueba inicial es evaluado nuevamente al menos anualmente para la
20 presencia de anticuerpos contra VJC después de la prueba inicial.
17. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2 donde el sujeto que en una primera fecha ha sido determinado por el procedimiento de la reivindicación 1 o 2 a tener anticuerpos contra VJC es nuevamente evaluado en una fecha posterior para determinar si el sujeto no tiene anticuerpos contra VJC.
25
18. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde el inmunomodulador es natalizumab.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el sujeto tiene esclerosis múltiple (EM) o enfermedad de
30 Crohn (EC).

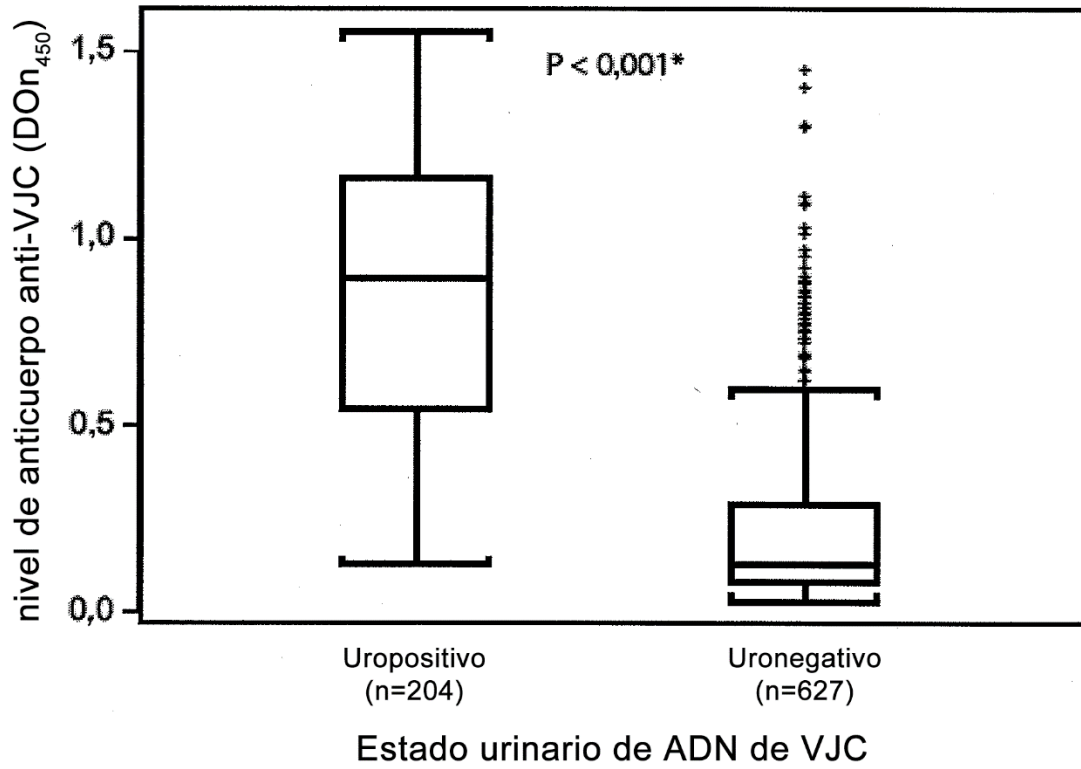


FIG. 1

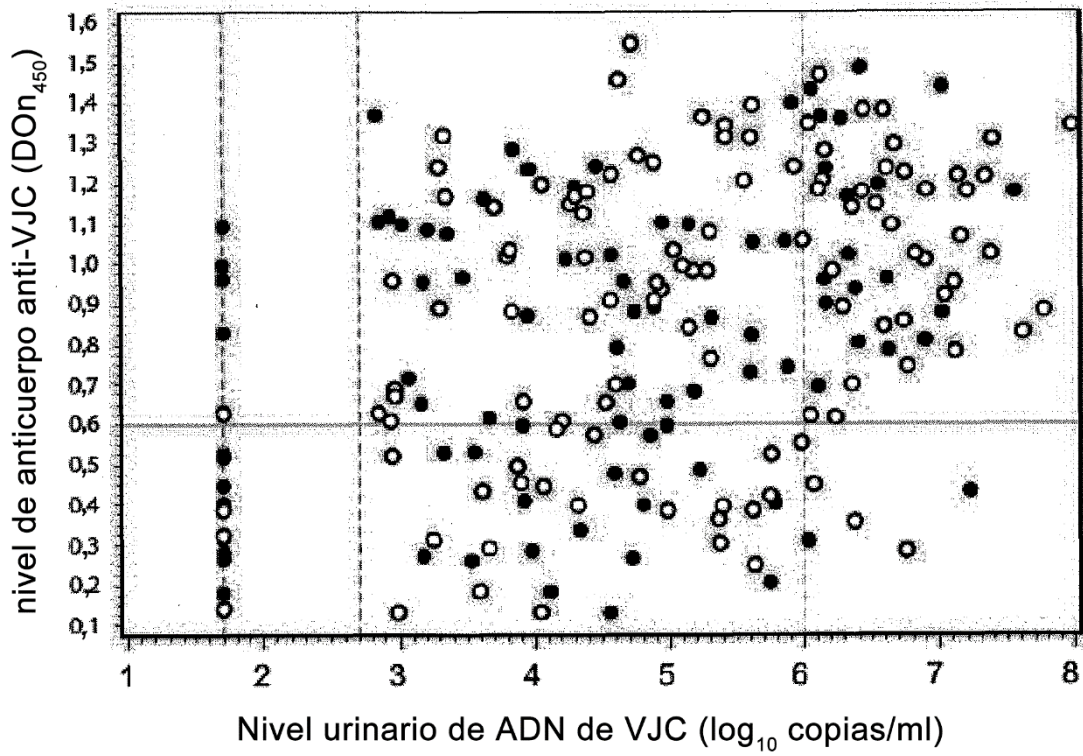


FIG. 2

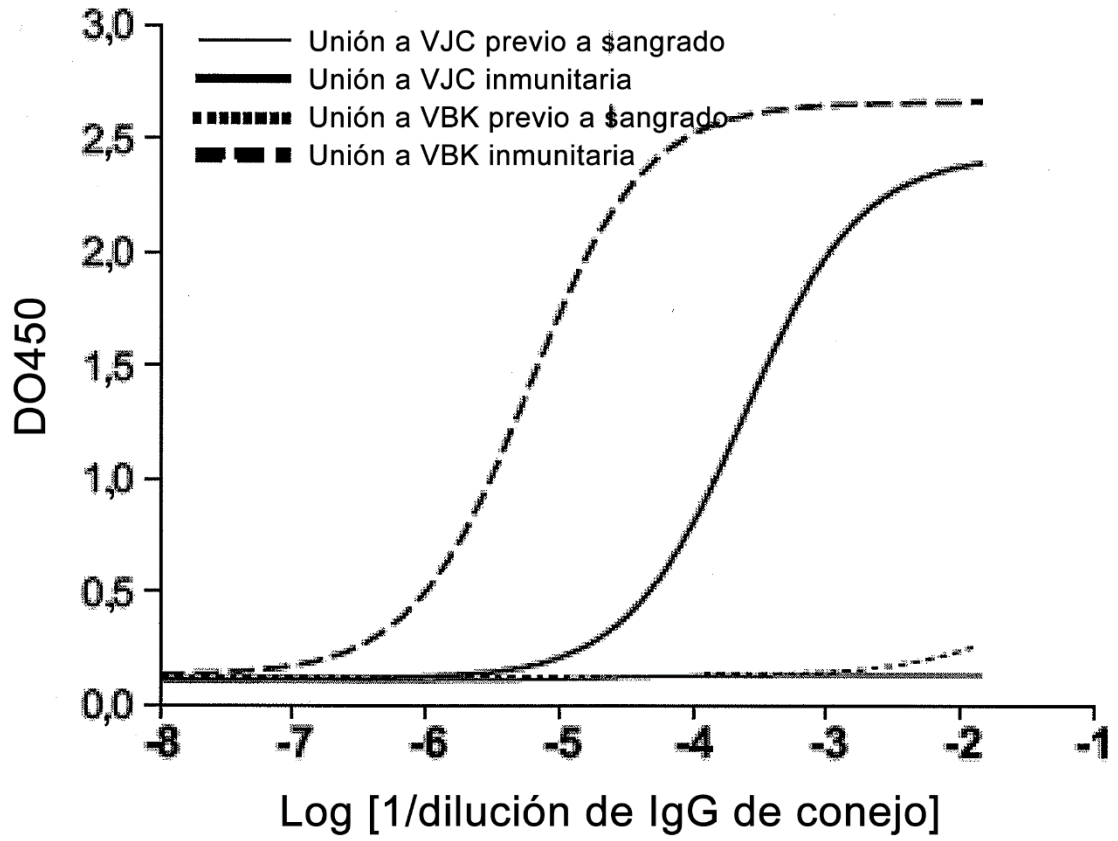


FIG. 3

FIG. 4A

Uronegativo (n=311)

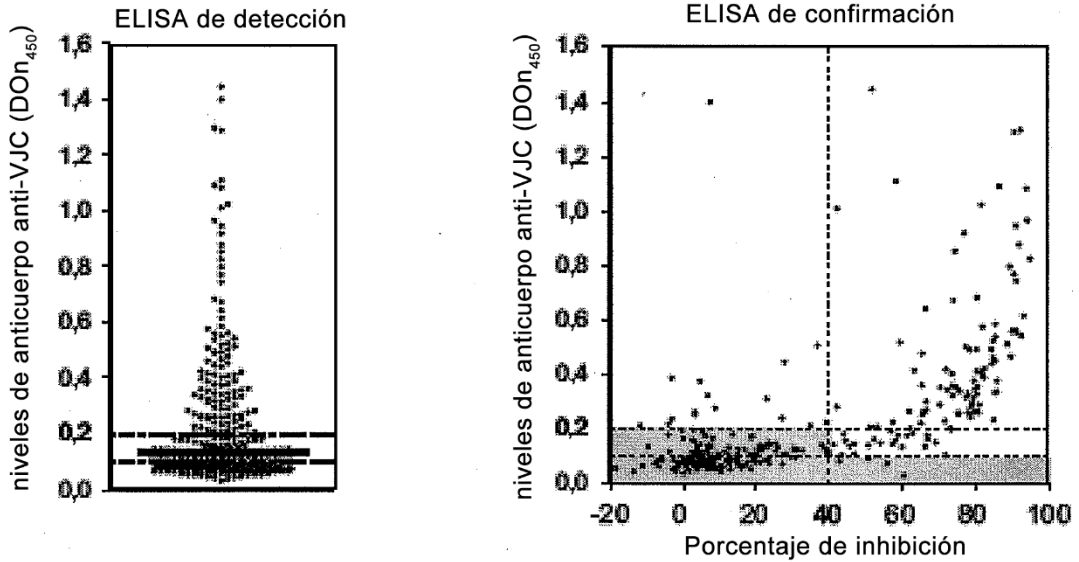


FIG. 4B

Uropositivo (n=204)

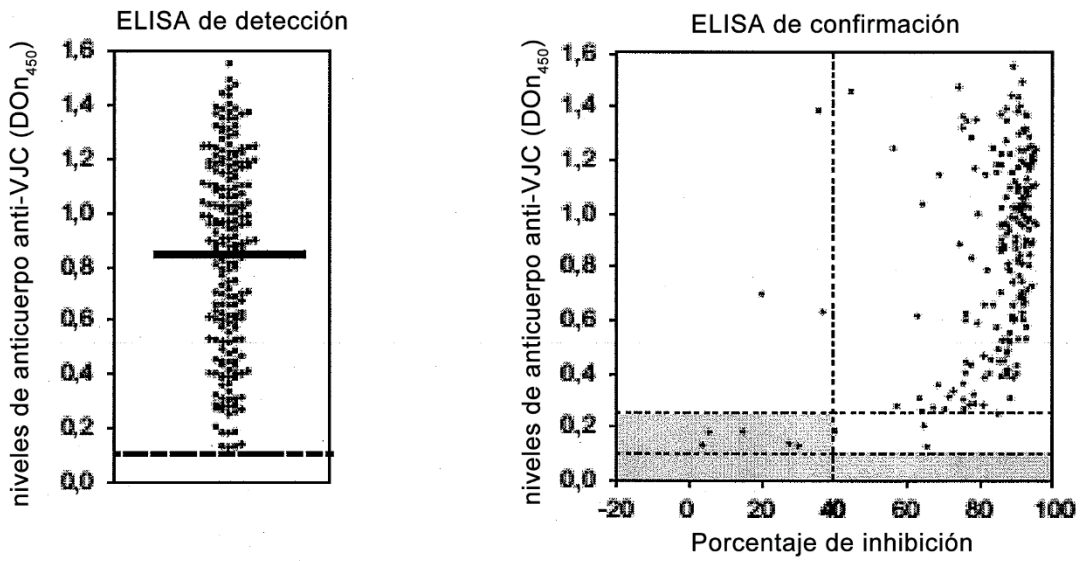


FIG. 5A.

Uropositivo y uronegativo

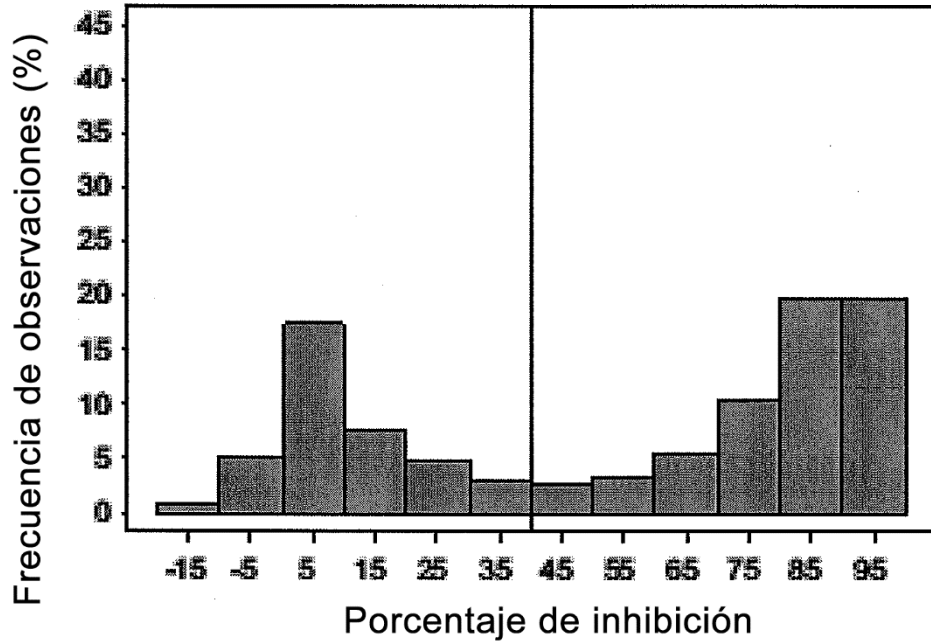


FIG. 5B.

Uropositivo

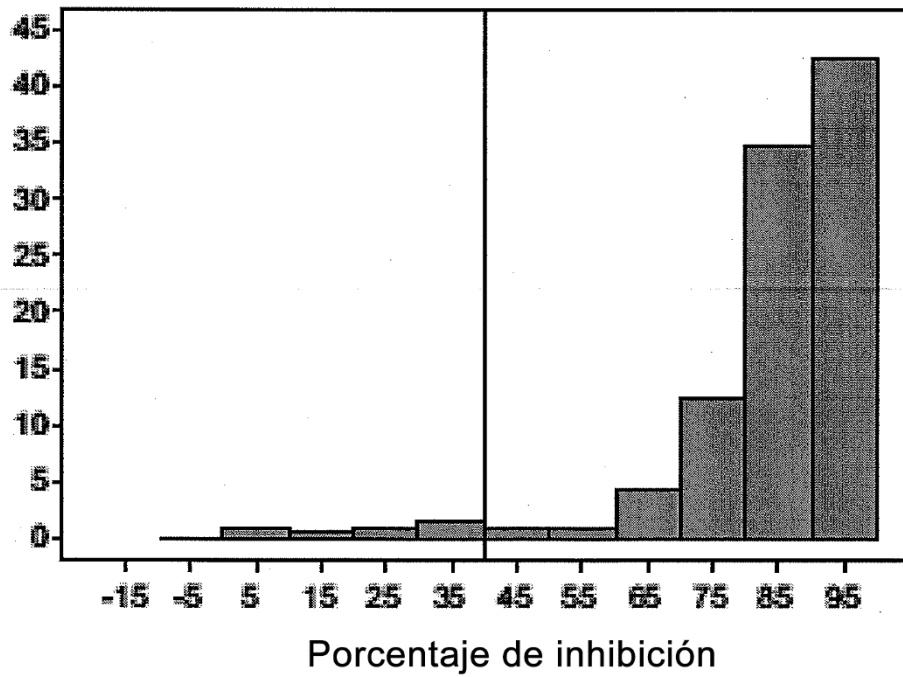


FIG. 6A.

ELISA de detección

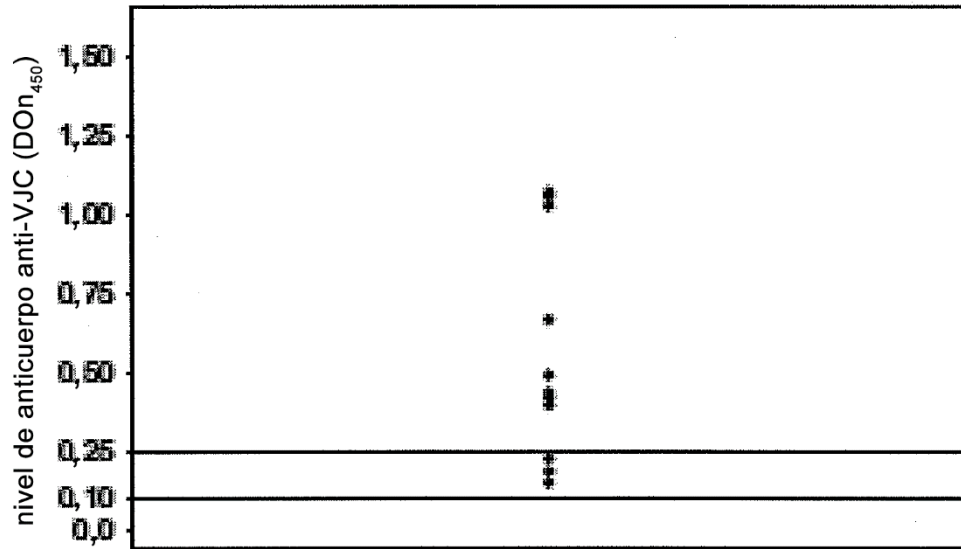


FIG. 6B.

ELISA de confirmación

