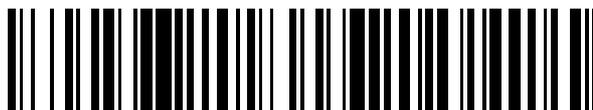


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 372**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2010 PCT/US2010/052172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2011 WO11044553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2010 E 10822820 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2485762**

54 Título: **Ensayos relacionados con anti-VLA-4**

30 Prioridad:

**11.10.2009 US 250553 P**

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

**04.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PLAVINA, TATIANA;  
HOCHMAN, PAULA S. y  
LERNER, MICHAELA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 666 372 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

Ensayos relacionados con anti-VLA-4

### 5 REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos nº. 61/250,553, presentada el 11 de octubre de 2009.

### 10 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a ensayos asociados con terapias inmunomoduladoras

### RESUMEN DE LA INVENCION

15

La invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de una prueba para analizar el nivel de un anticuerpo anti-integrina y el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-integrina), por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, en una muestra.

En base a la divulgación que se engloba en el presente documento, la presente invención proporciona un procedimiento para analizar el nivel de un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4, el procedimiento comprende:

20

a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto con un agente de captura asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir a un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en la muestra para formar un complejo y donde el sustrato es una porción de un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral; y

25

b) detectar la unión del agente de captura al anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 con un agente secundario que se une a dicho complejo en el sistema inmunocromatográfico de flujo lateral y determinar si el nivel del anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 está por encima o por debajo de un nivel predeterminado basado en la detección;

30 donde el agente de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión del antígeno del mismo y el agente secundario se selecciona de entre (i) un anticuerpo anti-IgG4 o (ii) un anticuerpo anti-anti-VLA-4.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un aparato para analizar el nivel de un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en una muestra biológica, donde el aparato es un aparato de flujo lateral que comprende:

35

una zona de recepción de la muestra, una zona de marcaje y una zona de pruebas, donde la zona de pruebas está más abajo de la zona de recepción de la muestra y contiene un agente de captura asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir a un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en la muestra biológica para formar un complejo, y

40

la zona de marcaje está más arriba de la zona de recepción de la muestra y contiene uno o más agentes secundarios, donde dichos uno o más agentes secundarios son capaces de unirse al complejo que comprende el agente de captura y el anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4, y

donde el agente de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente secundario se selecciona de entre (i) un anticuerpo anti-IgG4 o (ii) un anticuerpo anti-anti-VLA-4.

45 En un aspecto de la divulgación, un procedimiento para disminuir el nivel de un anticuerpo anti-integrina en un sujeto incluye la puesta en contacto de una muestra biológica de un sujeto con un agente de captura detectable asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir a un anticuerpo anti-integrina en la muestra, la detección de la unión del agente de captura con un nivel del anticuerpo anti-integrina en la muestra y el tratamiento del sujeto con intercambio de plasma hasta que el nivel del anticuerpo anti-integrina en la muestra alcance un nivel

50

predeterminado. El procedimiento puede incluir a un sujeto que haya sido tratado con natalizumab y al que se ha diagnosticado o se sospecha que presenta una infección por virus JC.

Algunos casos pueden incluir una o más de las siguientes características. El contacto de la muestra biológica con un agente de captura detectable y la detección de la unión del agente de captura puede incluir el análisis en un sistema

55

de flujo lateral. La unión del agente de captura con el anticuerpo en la muestra puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura con el anticuerpo puede ser detectada mediante un agente secundario. El nivel predeterminado del anticuerpo puede ser de aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml,

7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, o 20 µg/ml. La puesta en contacto de una muestra biológica de un sujeto con un agente de captura detectable asociado con un sustrato y la detección de la unión del agente de

60

captura al anticuerpo puede tener lugar un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días seis días, una semana,

dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después del tratamiento de intercambio de plasma. El tratamiento de intercambio de plasma se puede repetir una vez al día, o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-integrina o un anticuerpo de cadena anti-alfa4 integrina. El agente de captura puede ser un anticuerpo o una integrina.

10 En otro aspecto de la divulgación, un aparato para analizar el nivel de un anticuerpo anti-integrina en una muestra biológica incluye un sustrato, un agente de captura detectable asociado con un sustrato, donde el agente de captura puede unir un anticuerpo anti-integrina en la muestra biológica.

Algunos casos pueden incluir una o más de las siguientes características. El aparato puede incluir un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura con el anticuerpo anti-integrina puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura con el anticuerpo anti-integrina se puede detectar mediante un agente secundario. El agente de captura puede ser un anticuerpo o una integrina. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-integrina. El anticuerpo recombinante anti-integrina es un anticuerpo de cadena anti-alfa4 integrina. El sustrato puede ser nitrocelulosa, acetato de celulosa, papel de filtro, tela o papel de fibra de vidrio. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. La unión del agente de captura con el anticuerpo se puede detectar en aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos o más después de la unión.

25 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento para un ensayo del nivel de un anticuerpo anti-integrina en una muestra biológica incluye la obtención de una muestra biológica de un sujeto, la puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir un anticuerpo anti-integrina en la muestra y la detección y correlación de la unión del agente de captura al nivel del anticuerpo anti-integrina. El procedimiento puede incluir a un sujeto que haya sido tratado con natalizumab y al que se ha diagnosticado o se sospecha que presenta una infección por virus JC.

Algunos casos pueden incluir una o más de las siguientes características. La puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable y la detección de la unión del agente de captura puede incluir el análisis en un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura al anticuerpo puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura al anticuerpo se puede detectar mediante un agente secundario. El procedimiento de la divulgación puede incluir la administración de un tratamiento al sujeto para reducir el nivel del anticuerpo anti-integrina en el sujeto. El tratamiento puede ser el intercambio de plasma. El nivel del anticuerpo anti-integrina se puede medir un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de la administración del tratamiento. La administración del tratamiento y la medición del nivel del anticuerpo anti-integrina se puede repetir hasta que el nivel del anticuerpo anti-integrina en la muestra alcance un nivel predeterminado. El nivel predeterminado puede ser de aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, o 20 µg/ml. Los tratamientos se pueden administrar una vez al día o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-integrina. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo de cadena anti-alfa4 integrina. El agente de captura puede ser un anticuerpo o una integrina. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento para el ensayo de la eficacia de un tratamiento puede ser la obtención de una muestra biológica de un sujeto sometido a un tratamiento para disminuir el nivel de anticuerpo anti-integrina en el sujeto, la puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir a un anticuerpo anti-integrina en la muestra y la detección y la correlación de la unión del agente de captura al nivel del anticuerpo anti-integrina, donde un nivel de anticuerpo anti-integrina en la muestra inferior al nivel predeterminado es indicativo de la eficacia del tratamiento. El procedimiento puede incluir a un sujeto que haya sido tratado con natalizumab y al que se ha diagnosticado o se sospecha que presenta una infección por virus JC.

60

Algunos casos pueden incluir una o más de las siguientes características. La puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable y detección y correlación de la unión del agente de captura puede incluir un ensayo en un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura al anticuerpo puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura al anticuerpo se puede detectar mediante un agente secundario. El nivel predeterminado puede ser de aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, o 20 µg/ml. La muestra biológica se puede obtener del sujeto un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después del tratamiento. El tratamiento se puede repetir una vez al día o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas. El tratamiento puede incluir el intercambio de plasma. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-integrina. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo anti-alfa4. El agente de captura puede ser un anticuerpo o una integrina.

En otro aspecto de la divulgación, un kit para analizar el nivel de un anticuerpo anti-integrina en una muestra biológica para su uso en el tratamiento con medición del nivel de un anticuerpo anti-integrina en un sujeto y monitorización de la eficacia del tratamiento incluye una comprobación que incluye un sustrato y un agente de captura detectable asociado con el sustrato. El agente de captura puede unirse a un anticuerpo anti-integrina en la muestra biológica y un tampón de detección. El sujeto puede incluir un sujeto que haya sido tratado con natalizumab y al que se ha diagnosticado o se sospecha que presenta una infección por virus JC. El kit puede incluir además instrucciones para interpretar el nivel del anticuerpo anti-integrina. El kit también se puede usar para monitorizar la eficacia del tratamiento en el sujeto.

Algunos ejemplos del kit pueden incluir una o más de las siguientes características. El sustrato puede ser una porción de un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura al anticuerpo puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura al anticuerpo se puede detectar mediante un agente secundario. El agente de captura puede ser un anticuerpo o una integrina. El anticuerpo anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-integrina. El anticuerpo recombinante anti-integrina puede ser un anticuerpo anti-alfa4. El sustrato puede ser nitrocelulosa, acetato de celulosa, papel de filtro, tela o papel de fibra de vidrio. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. La unión del agente de captura con el anticuerpo se puede detectar en aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos o más después de la unión.

En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento para el ensayo de la eficacia de un tratamiento puede ser la obtención de una muestra biológica de un sujeto sometido a un tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, la puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable asociado a un sustrato, donde el agente de captura puede unir un anticuerpo anti-integrina en la muestra y la detección y la correlación de la unión del agente de captura al nivel del anticuerpo anti-integrina para determinar la eficacia del tratamiento.

Algunos casos pueden incluir una o más de las siguientes características. La puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable y detección y correlación de la unión del agente de captura puede incluir un ensayo en un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura al anticuerpo puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura al anticuerpo se puede detectar mediante un agente secundario. La muestra biológica se puede obtener del sujeto antes del tratamiento o un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después del tratamiento. La obtención de la muestra biológica se puede repetir una vez al día o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. El anticuerpo anti-anti-integrina puede ser un anticuerpo recombinante anti-anti-integrina. El anticuerpo anti-anti-integrina puede ser un anticuerpo de cadena anti-anti-alfa4 integrina. El agente de captura puede ser un anticuerpo.

En otro aspecto de la divulgación, un aparato para analizar el nivel de un anticuerpo anti-anti-VLA4 en una muestra biológica y monitorizar la eficacia del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 en un sujeto incluye una prueba que incluye un sustrato y un agente de captura detectable asociado al sustrato, donde el agente de captura puede unirse

a un anticuerpo anti-anti-VLA4 en la muestra biológica y un tampón de detección. El kit puede incluir además instrucciones para interpretar el nivel del anticuerpo anti-anti-VLA4. El kit también se puede usar para monitorizar la eficacia del tratamiento en el sujeto.

5 En algunos casos, el kit puede incluir una o más de las siguientes características. El sustrato puede ser una porción de un sistema de flujo lateral. La unión del agente de captura al anticuerpo puede producir una señal detectable. La unión del agente de captura al anticuerpo se puede detectar mediante un agente secundario. El agente de captura puede ser un anticuerpo. El sustrato puede ser nitrocelulosa, acetato de celulosa, papel de filtro, tela o papel de fibra de vidrio. La muestra biológica puede ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo,  
10 líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico. La unión del agente de captura con el anticuerpo se puede detectar en aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 60 minutos o más después de la unión.

15 En otro aspecto de la divulgación, un procedimiento para detectar anticuerpos anti-fármaco en una muestra biológica puede ser la obtención de una muestra biológica de un sujeto sometido a un tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, la puesta en contacto de la muestra con un agente de captura detectable asociado con un sustrato, donde el agente de captura puede unirse a un anticuerpo anti-integrina en la muestra y la detección y la correlación de la unión del agente de captura al nivel del anticuerpo anti-integrina para determinar la eficacia del tratamiento.

20 En otro aspecto de la divulgación, un kit para detectar el anticuerpo anti-anti-VLA4 en una muestra biológica incluye una prueba que incluye un sustrato y un agente de captura detectable asociado al sustrato, donde el agente de captura puede unirse a un anticuerpo anti-anti-VLA4 en la muestra biológica y un tampón de detección. La presente invención y sus realizaciones se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

## 25 **Definiciones**

Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a un o más de un (es decir, por lo menos uno) objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

30 El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para referirse a un valor  $\pm 20\%$  de un valor numérico determinado. Por consiguiente, "aproximadamente un 60%" significa un valor entre  $60 \pm (20\% \text{ de } 60)$  (es decir, entre 48 y 70).

35 El término "o" se usa en el presente documento y se usa de manera intercambiable con, para referirse al término "y/o," a no ser que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, el término "purificar," "purificado/a," o "purificación" significa la extracción o el aislamiento de una molécula de su entorno mediante, por ejemplo, aislamiento o separación. Las  
40 moléculas "sustancialmente purificadas" están por lo menos aproximadamente un 60% libres, por ejemplo, por lo menos aproximadamente un 75% libres, o por lo menos aproximadamente un 90% libres de otros componentes a los que están asociadas. En algunos casos, una molécula sustancialmente purificada está por lo menos un 60% libre, un 75% libre, un 90% libre, o un 95% libre de otros componentes. Tal como se usan en el presente documento, estos términos también se refieren a la extracción de contaminantes de una muestra.

45 Tal como se usa en el presente documento, "muestra" se refiere a cualquier compuesto que pueda contener un analito para el que se busca un ensayo de analito. La muestra puede ser una muestra biológica, como un líquido biológico o un tejido biológico. Ejemplos de líquidos biológicos incluyen sangre, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal,  
50 exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son agregados de células, normalmente de un tipo en particular junto con su sustancia intercelular que forman uno de los materiales estructurales de humanos, animales, plantas, bacterias, hongos o estructuras víricas, incluyendo los tejidos conectores, epiteliales musculares y nerviosos. Los ejemplos de tejidos biológicos también incluyen órganos,  
55 tumores, nódulos linfáticos, arterias y células individuales.

Tal como se usa en el presente documento, "muestra líquida" se refiere a un material que se sospecha contiene un analito(s) de interés y cuyo material presenta una fluidez suficiente para fluir a través de un dispositivo o ensayo descrito en el presente documento. Una muestra líquida se puede obtener de su fuente y ser usada directamente en  
60 un ensayo descrito en el presente documento o se puede tratar previamente para modificar sus características.

Estas muestras pueden incluir humanos, animales o muestras artificiales. La muestra se puede preparar en cualquier medio que no interfiera con un ensayo descrito en el presente documento. Normalmente, la muestra es una solución acuosa o un líquido biológico descrito en el presente documento.

- 5 Una muestra líquida puede ser un derivado de cualquier fuente, como un líquido fisiológico, que incluyen sangre, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreciones uretrales o líquido amniótico y similares. Homogenizados líquidos de tejidos celulares como, por ejemplo, raspados de pelo, piel y uñas. Además, se puede
- 10 usar un material sólido para ser analizado sobre la presencia de un analito como muestra de prueba después de haber sido modificado para formar un medio líquido, por ejemplo, un extracto, o para liberar un analito.

Tal como se usa en el presente documento, "antígeno" se refiere a cualquier compuesto capaz de unirse a un anticuerpo, o frente a cuyos anticuerpos puede aparecer.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, "anticuerpo" se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de la inmunoglobulina o genes de la inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas. Los genes reconocidos por la inmunoglobulina incluyen las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon y mu, así como innumerables genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o
- 20 lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gama, mu, alfa, delta o epsilon, que definen a su vez las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Normalmente, un anticuerpo es una inmunoglobulina que presenta un área en su superficie o en una cavidad que se une específicamente a, y por ello se define como complementaria con una organización espacial y polar particular de otra molécula. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmentos de la misma. Sus
- 25 fragmentos pueden incluir, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, cadena simple Fv(scFv) y similares. Los anticuerpos también pueden incluir anticuerpos quiméricos o fragmentos de los mismos producidos mediante procedimientos de recombinación. En algunos casos de la divulgación el anticuerpo detectado es un anticuerpo IgG4. En un ensayo descrito en el presente documento se detecta un monómero de anticuerpos IgG4, se detectan anticuerpos IgG4 completos o se detectan tanto un monómero de anticuerpo IgG4 como anticuerpos IgG4 completos.

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "analito" se refiere a un componente conocido o desconocido de una muestra, que se unirá específicamente a un agente de captura si el analito y el agente de captura son miembros de un par de unión específico. Por lo general, los analitos son biopolímeros, por ejemplo, un oligómero o un polímero como un oligonucleótido, un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo) o similares. En algunos casos, un
- 35 analito puede existir en una fase móvil (como un líquido) que es detectado por un agente de captura.

- Tal como se usa en el presente documento, el término "reactivo marcado" se refiere a una sustancia que comprende un marcador detectable unido a un agente de unión específico. La unión puede ser una unión covalente o no-covalente, pero el método de unión no es importante. El marcador permite que el reactivo marcado produzca una
- 40 señal detectable que está relacionada con la presencia de un analito en una muestra descrita en el presente documento. El componente del agente de unión específico del reactivo marcado se selecciona para unirse directa o indirectamente a un analito. El reactivo marcado se puede asociar con un sustrato descrito en el presente documento, se puede combinar con una muestra líquida para formar una solución líquida, se puede añadir a un sustrato separadamente de una muestra o se puede depositar previamente o inmovilizar de forma reversible en el
- 45 sustrato. Además, el agente de unión específico se puede marcar antes o durante la realización del ensayo descrito en el presente documento mediante cualquier método de unión adecuado conocido en la técnica. El marcador detectable puede ser un marcador detectable directamente o un marcador que se detecta usando métodos indirectos.

- 50 Tal como se usa en el presente documento, el término "señal detectable" se refiere a una señal producida por la unión del agente de captura con un analito. En algunas formas de realización, una señal detectable es detectable mediante una inspección visual. Sin limitación, el tipo de señal producida depende del marcador usado. Generalmente, las señales detectables que indican la presencia o ausencia de un analito en una muestra pueden ser evidentes por su propia cuenta, por ejemplo, detectables como líneas, signos de más o menos, o símbolos con
- 55 formas en particular, o pueden ser evidentes mediante comparación con una referencia, como un indicador de color de referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente de captura" se refiere a un agente que se une a un analito mediante una interacción que es suficiente para permitir que el agente se una específicamente a un analito.

- 60 Por ejemplo, el agente de captura se puede unir específicamente a un analito con una disociación constante ( $K_d$ )

inferior a aproximadamente  $10^{-6}$ M sin que se una a otras dianas. La interacción de la unión se puede mediar mediante un sitio de unión del agente de captura. Los agentes de captura incluyen, por ejemplo, cualquier polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo. Los agentes de captura se pueden unir a un sustrato o pueden estar presentes en una solución.

5

Tal como se usa en el presente documento, el término "unión específica" se refiere a la unión preferente de un agente a un analito particular que está presente en una mezcla de diferentes analitos. Normalmente, la unión específica diferencia entre analitos deseados o no deseados en una muestra. Un agente de unión específica diferencia normalmente entre un analito deseado o no deseado mediante la unión de más de aproximadamente 10 a 100 veces o más a un analito deseado con preferencia a otros analitos. En algunos casos, dicha unión preferente puede ser de por lo menos 1.000 a 10.000 veces. Por ejemplo, la afinidad entre un agente de captura y un analito cuando están unidos específicamente en un complejo agente de captura/analito es de por lo menos aproximadamente  $10^{-7}$ M, por lo menos aproximadamente  $10^{-8}$ M, por lo menos aproximadamente  $10^{-9}$ M, por lo menos aproximadamente  $10^{-10}$ M o por lo menos aproximadamente  $10^{-11}$ , por ejemplo, por lo menos  $10^{-7}$ M, por lo menos  $10^{-8}$ M, por lo menos  $10^{-9}$ M, por lo menos  $10^{-10}$ M o por lo menos  $10^{-11}$ .

Tal como se usa en el presente documento, el término "complejo agente de captura/analito" es un complejo que resulta de la unión específica de un agente de captura con un analito.

20 Tal como se usa en el presente documento, "agentes de unión" se refiere a pares de moléculas que se pueden encontrar en un complejo agente de captura/analito, es decir, presentan una unión específica el uno con el otro.

Tal como se usa en el presente documento, el término "valoración" se refiere a cualquier forma de medida, e incluye la determinación de si un elemento está presente o no. Los términos "determinación", "medición", "evaluación", 25 "valoración" y "análisis" se usan de forma intercambiable e incluyen determinaciones cuantitativas y cualitativas.

Tal como se usa en el presente documento, un "marcador detectable" se refiere a un átomo (por ejemplo, un radionucleótido), una molécula (por ejemplo, fluoresceína) o un complejo que se detecta o que se puede usar para detectar (por ejemplo, debido a una propiedad física o química) la presencia de un analito o para permitir la unión de 30 otra molécula a la que está unido covalentemente o asociado de otra forma. El término también se refiere a moléculas unidas covalentemente o asociadas de otra forma (por ejemplo, una biomolécula como una enzima) que actúa en un sustrato para producir un átomo, molécula o complejo detectable. Los marcadores detectables incluyen cualquier composición detectable mediante mecanismos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Por ejemplo, los marcadores incluyen biotina para la tinción con 35 conjugado de estreptavidina marcada, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™.), tintes fluorescentes (por ejemplo, Texas rojo rodamina, proteína fluorescente verde y similares), marcadores radioactivos (por ejemplo,  $H^3$ ,  $I^{125}$ ,  $S^{35}$ ,  $C^{14}$ , o  $P^{32}$ ), enzimas (por ejemplo, hidrolasas, especialmente fosfatasa como la fosfatasa alcalina, esterases y glicosidasas u oxidoreductasas, especialmente peroxidasas como peroxidasa de rábano picante y otras usadas habitualmente en ensayos ELISA), sustratos, cofactores, inhibidores, grupos quimioluminiscentes, agentes 40 cromogénicos y marcadores colorimétricos como partículas coloidales metálicas (como el oro), partículas coloidales no metálicas (como selenio o telurio) o perlas de cristal coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los ejemplos no limitantes de patentes que dan a conocer dichos marcadores incluyen las patentes de Estados Unidos, nº 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Los medios para detectar dichos marcadores son conocidos por los expertos en la técnica.

45

Tal como se usa en el presente documento, los términos "sándwich", "sándwich ELISA", "diagnóstico por sándwich" y "captura ELISA" se refieren al concepto de detección de un analito con dos o más agentes de prueba diferentes. Por ejemplo, un agente de captura puede unirse directa o indirectamente a un sustrato y se puede pasar una muestra de prueba sobre la superficie del sustrato para permitir que el agente de captura se una específicamente a 50 su analito cognado. Un reactivo marcado, por ejemplo, un anticuerpo marcado o un reactivo de detección alternativo (que se puede unir al analito), puede ser usado entonces para determinar si un agente de captura se une específicamente a un analito.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sustrato" significa cualquier soporte capaz de unirse o de 55 asociarse con un agente de captura. Los sustratos conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales o modificadas, poli(acrilamidas), agarosa y magnetita. La naturaleza del sustrato puede ser soluble hasta cierto punto o insoluble. La estructura del sustrato no es limitante, y el sustrato puede presentar cualquier configuración estructural siempre y cuando el agente de captura sea capaz de unirse a un analito. Por consiguiente, la configuración estructural puede ser esférica, como en una perla, o cilíndricos, como el 60 interior de la superficie de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie

puede ser plana, como en una lámina, una placa de cultivo, una tira de prueba, etc. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros sustratos adecuados para unirse o asociar un agente de captura, o pueden determinarlos de igual forma mediante experimentación rutinaria.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal, por ejemplo, un mamífero, humano o no humano. Los sujetos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates no humanos, ratones, ratas, cobayas, ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, perros, gatos, pájaros, ciervos, alce, conejo, reno, ciervo y caballos.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "medición del nivel de" se refiere tanto a la detección cuantitativa como cualitativa.

Los siguientes dibujos se presentan únicamente con el propósito de ilustrar y no son limitantes.

### 15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es un esquema del aparato de flujo lateral y los resultados de una prueba correspondiente al Ejemplo 1 tras la carga de varios componentes.

- 20 La Figura 2 es un esquema del aparato de flujo lateral y los resultados de una prueba correspondiente al Ejemplo 2 tras la carga de varios componentes.

La Figura 3 es un esquema del aparato de flujo lateral y los resultados de una prueba correspondiente al Ejemplo 3 tras la carga de varios componentes.

25

La Figura 4 es un esquema del aparato de flujo lateral y los resultados de una prueba correspondiente al Ejemplo 4 tras la carga de varios componentes.

- 30 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

- 35 A no ser que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado conocido habitualmente por los expertos en la técnica a los que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos 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 métodos 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.

40

Los pacientes que reciben terapias con fármacos que son inmunomoduladores son vulnerables a algunas enfermedades como la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). Por ejemplo, la LMP se ha descrito en pacientes tratados con natalizumab. Se ha descubierto que un método para tratar a dichos sujetos es reducir la cantidad (por ejemplo, la concentración plasmática) del agente terapéutico inmunomodulador (por ejemplo, natalizumab) en el paciente. Debido a la rápida progresión de la enfermedad y a la gran distribución geográfica de los pacientes, así como otras cuestiones, existe la necesidad de una prueba rápida y fiable que se pueda usar para determinar el nivel de fármaco en el paciente. Para la prueba, es una ventaja que se presente de forma que se pueda administrar e interpretar de forma precisa en poco tiempo. Esta es una cuestión especial en una terapia inmunomoduladora, que puede ser difícil de diferenciar de los propios anticuerpos del paciente. Por consiguiente, este problema se ha resuelto usando un diseño de prueba rápida que los médicos pueden usar de forma precisa y fácil para determinar si el nivel de una terapia inmunomoduladora se ha modulado suficientemente para aumentar la probabilidad de mitigar la progresión de un caso activo de LMP. Variando la dosis de la terapia inmunomoduladora se puede paliar la progresión de la fase de la enfermedad en un paciente. Debido a que la variación de la dosis de la terapia inmunomoduladora es importante para el tratamiento, ensayos descritos en el presente documento también se pueden usar para monitorizar rápidamente el nivel del fármaco en un paciente, por ejemplo, en pacientes con esclerosis múltiples incluyendo pacientes pediátricos. En otro ejemplo, los ensayos descritos en el presente documento pueden detectar anticuerpos anti-integrina en un sujeto que fue tratado con natalizumab y al que se ha diagnosticado, o se sospecha que presenta, una infección con virus JC. El virus JC es un tipo de papilomavirus humano que puede provocar LMP y otras enfermedades en pacientes con inmunodeficiencia o en pacientes tratados con un fármaco destinado a inducir un estado de inmunosupresión (por ejemplo, pacientes con trasplantes de

60

órganos).

Además, en el presente documento se describen los ensayos para detectar anticuerpos anti-fármacos. La presencia de estos anticuerpos en un sujeto puede afectar la exposición al fármaco y/o tener como resultado eventos adversos relacionados con la infusión, por ejemplo, como se ha descrito en tratamientos con el anticuerpo humanizado anti-VLA-4. Por consiguiente, ensayos para la detección de anticuerpos anti-fármaco (por ejemplo, el fármaco es un anticuerpo anti-VLA-4; los anticuerpos anti-fármaco son anticuerpos anti-anti-VLA-4) pueden ser útiles para el tratamiento usando el fármaco de interés (por ejemplo, un fármaco anti-VLA-4 como el natalizumab).

- 10 Por lo general, el aparato es un sustrato sólido asociado con un agente captura que se puede usar para detectar específicamente un agente terapéutico inmuno-modulador (por ejemplo, el natalizumab) o anticuerpos contra el agente inmuno-modulador (por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco como los anticuerpos contra el natalizumab). En algunos casos, la detección se calibra para proporcionar un método para determinar si la cantidad de agente terapéutico inmunomodulador o de anticuerpo anti-fármaco está por encima o por debajo de una concentración o título específicos. Esta información se puede relacionar con si la terapia adicional (por ejemplo, plasmaféresis) es necesaria para reducir más la cantidad de agente terapéutico inmuno-modulador en el paciente y mitigar, de este modo, el riesgo asociado a la LMP.

- 20 En el presente documento también se describe un kit para probar la presencia de un agente terapéutico inmunomodulador como el natalizumab o anticuerpos contra dicho agente terapéutico inmunomodulador. Generalmente, un kit incluye por lo menos un reactivo o aparato como el descrito en el presente documento para detectar el agente terapéutico inmunomodulador o anticuerpos contra un agente inmunomodulador. El kit también puede incluir instrucciones para usar los reactivos y/o el aparato. Estas instrucciones también pueden incluir el uso del kit para determinar la cantidad de un analito e interpretar los resultados del ensayo. Por ejemplo, las instrucciones pueden proporcionar una guía sobre si la detección de un nivel específico de un natalizumab es suficiente para tratar a un sujeto que presenta, o se sospecha que presenta, LMP.

#### **Aparato para el análisis de los analitos**

- 30 Los expertos en la técnica conocen diversos dispositivos de análisis y dichos dispositivos de análisis se pueden adaptar para usar uno o más agentes de captura, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, para analizar uno o más analitos, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina como el anti-VLA-4 (por ejemplo, un natalizumab), por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, (por ejemplo, anti-natalizumab), descrito en el presente documento. Los ejemplos no limitantes incluyen varilla de medición o probador, flujo lateral, flujo dual y dispositivos mediante flujo, particularmente los que son inmunoensayos. Ejemplos no limitantes de dispositivos de flujo lateral incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.818.677,4.943.522,5.096.837(RE 35.306),5.096.837,5.118.428,5.118.630,5.221.616,5.223.220,5.225.328,5.415.994,5.434.057,5.521.102,5.536.646,5.541.069,5.686.315,5.763.262,5.766.961,5.770.460,5.773.234,5.786.220,5.804.452,5.814.455,5.939.331,6.306.642. Otros ejemplos no limitantes de dispositivos de flujo lateral incluyen las patentes de Estados Unidos Nos. 4.703.017,6,187.598,6.352.862,6.485.982,6.534.320y6.767.714. Los ejemplos no limitantes de dispositivos de varillas de medición incluyen aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos, n°: 4,235,601,5,559,041,5,712,172y6,790,611.

- 45 Un aparato para analizar el nivel de un analito puede incluir un sustrato, por ejemplo, un sustrato con el que se asocia un agente de captura. Los ejemplos no limitantes de sustratos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosa y magnetita. El sustrato puede presentar cualquier configuración estructural siempre y cuando el agente de captura sea capaz de unirse a un analito.

- 50 En algunos casos, el sustrato está contenido en un soporte, por ejemplo, un soporte que es esférico, como en una perla, o cilíndrico, como en la superficie interior de un tubo de ensayo o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, el sustrato o soporte puede ser plano, como en una lámina, una placa de cultivo, una tira de prueba y similares.

- 55 En un ejemplo, el aparato es un aparato de flujo lateral que incluye una zona de recepción de la muestra, una zona de marcaje, una zona de prueba y una zona de control. En algunos casos, una región de prueba comprende las zonas de prueba y de control. En algunos casos, una región de prueba, que comprende las zonas de prueba y de control, es observable.

- 60 En algunos ejemplos, la zona de recepción de la muestra acepta una muestra líquida que puede contener uno o más

analitos de interés. En otro ejemplo, la zona de recepción de la muestra está sumergida en una muestra líquida. Una zona de marcaje está localizada por debajo de la zona de recepción de la muestra y contiene uno o más reactivos móviles marcados que reconocen, o son capaces de unir, uno o más analitos de interés. Además, una región de prueba está dispuesta por debajo de la zona de marcaje y contiene las zonas de prueba y de control. La/las zona(s) de prueba contienen generalmente un agente de captura asociado con el sustrato en la zona de prueba. En algunos casos, el agente de captura está inmovilizado en el sustrato en la zona de prueba. Generalmente, el agente de captura inmovilizado se une específicamente al analito de interés.

Mientras la muestra líquida fluye a través del sustrato, el analito de interés se unirá primero con un reactivo marcado que se mueve en la zona de marcaje y después se queda retenido en la zona de prueba. En algunos ejemplos, la región de prueba comprende un material que es opaco en estado seco y transparente en estado húmedo. Por consiguiente, cuando se usa una zona de control que comprende una marca en el dispositivo, esta marca se sitúa aproximadamente en la región de prueba de forma que se vuelve visible en la región de prueba cuando la región de prueba está en un estado húmedo.

En otro ejemplo, la muestra líquida fluye a través de una vía de flujo que va desde la zona de recepción de la muestra (por encima), a través de la zona de marcaje, y después a las zonas de prueba y de control (comprendidas conjuntamente en una región de prueba) (más debajo). Opcionalmente, la muestra líquida puede continuar después hacia a zona absorbente.

En otro ejemplo, la zona de recepción de la muestra está compuesta por una almohadilla de aplicación absorbente. Los materiales adecuados para la fabricación de almohadillas de aplicación absorbentes incluyen, pero no se limitan, a materiales o almohadillas de polietileno hidrofílico, fibra acrílica, fibra de vidrio, papel de filtro o almohadillas, papel deshidratado, pulpa de celulosa, tela, y similares. Por ejemplo, la zona de recepción de la muestra puede estar compuesta por un material como una fibra acrílica hidroligada no tejida (por ejemplo, disponible en Dupont Nonwovens) o material HDK (disponible en HDK Industries, Inc., Rogersville, TN). En otro ejemplo, la zona de recepción de la muestra se construye a partir de cualquier material que sea capaz de absorber agua.

En otros ejemplos, el dispositivo de prueba se configura para realizar un ensayo inmunológico. En algunos casos, el transporte líquido a través del sustrato se basa en la acción capilar. En otra situación, el transporte líquido a través del sustrato se basa en un flujo lateral no-bibuloso, donde todos los componentes disueltos o dispersados de la muestra líquida se transportan a tasas sustancialmente equivalentes y con un flujo lateral relativamente sin complicaciones a través del sustrato, al contrario de la retención preferente de uno o más componentes que tendrían lugar, por ejemplo, en materiales que interactúan, química, física o iónicamente o de otro modo con uno o más componentes (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos, nº. 4.943.522).

La zona de marcaje de los dispositivos del ensayo inmunológico puede inducir a reactivos de tipo control. Estos reactivos de control marcados comprenden frecuentemente partes detectables que no se verán restringidas en las zonas de pruebas y que se transportan a la región de prueba y a la/las zona(s) de control mediante el flujo de la muestra líquida a través del dispositivo. En algunos casos, estas partes detectadas se emparejan a un miembro de un par de unión específico para formar un conjugado de control que puede después verse restringido en una zona de control separada de la región de prueba por un miembro correspondiente del par de unión específico para verificar que el flujo del líquido es como se espera. Las partes visibles usadas en los reactivos de control marcados pueden ser del mismo color o de color diferente, o del mismo tipo o de tipo diferente, a los usados en el analito de los reactivos marcados específicos de interés.

La región de prueba generalmente incluye una zona de control que es útil para verificar que la muestra líquida es como se espera. Cada una de las zonas de control puede comprender una región espacialmente distinta que puede incluir un miembro inmovilizado de un par de unión específico que reacciona con un reactivo de control marcado. En algunos ejemplos, la zona de control procedimental contiene una muestra auténtica del analito de interés o un fragmento del mismo. En este caso, se puede usar un tipo de reactivo marcado, donde la muestra líquida transporta el reactivo marcado a las zonas de prueba y de control; y el reactivo marcado que no está unido a un analito de interés se unirá a la muestra auténtica del analito de interés situado en la zona de control. En otro ejemplo, la línea de control contiene un anticuerpo que es específico para, o proporciona, la inmovilización del reactivo marcado. En el procedimiento, un reactivo marcado está restringido en cada una de la o las zonas de control, incluso cuando ninguno o todos los analitos de interés no están presentes en la muestra de prueba.

#### **Agentes de captura**

Se pueden usar varios agentes de captura en los métodos y el aparato descritos en el presente documento, siempre

y cuando el agente de captura específico se une a un analito de interés para formar un complejo agente de captura/analito. En algunos casos, el agente de captura es un antígeno, por ejemplo, una integrina, y el analito de interés es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina o un anticuerpo de unión de una integrina alfa-4 (por ejemplo, natalizumab) o un anticuerpo anti-fármaco, por ejemplo, un anticuerpo de cadena anti-anti-VLA4 integrina.

En algunos casos, el agente de captura es un polipéptido, por ejemplo un anticuerpo que se une a un analito de interés. Se puede usar cualquier anticuerpo que se une específicamente a un analito como agente de captura. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del antígeno del mismo; un anticuerpo modificado como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de forma modificada, un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>); o un anticuerpo biosintético, por ejemplo un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo de dominio simple (DAB), Fv, cadena simple Fv (scFv), o similares.

Los procedimientos para la elaboración y el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales se describen, por ejemplo, en Harlow et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol I. Cold Spring Harbor Laboratory (1 de diciembre de 1998). Los métodos para preparar anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de forma modificada, anticuerpos humanizados, o fragmentos de los mismos, por ejemplo fragmentos de Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>); o anticuerpos biosintéticos (por ejemplo, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominio simple (DABs), Fv, cadena simple Fv (scFv), y similares), son conocidos en la técnica y se pueden encontrar en Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Springer Verlag (December 15, 2000; 1st edition).

En casos particulares, el agente de captura es un anticuerpo que puede unirse específicamente a un anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, un anticuerpo anti anti-VLA-4 como un anti-natalizumab), como el anticuerpo de rata 12C2, anticuerpo murino 12C4, o un anticuerpo de conejo adecuado. En otro ejemplo, el agente de captura es un anticuerpo anti-VLA-4, como la natalizumab, que se puede unir específicamente a un anticuerpo anti-(anti-VLA-4).

### **Analitos**

Los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento se pueden usar para analizar el nivel de un analito de interés, por ejemplo, en una muestra biológica de un sujeto. Los ejemplos de analitos incluyen, sin limitación, toxinas, compuestos orgánicos, polipéptidos, microorganismos, bacteria, virus, aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, hormonas, esteroides, vitaminas, fármacos (incluyendo los administrados con fines terapéuticos así como los administrados con fin ilícito), contaminantes, pesticidas y metabolitos de, o anticuerpos para cualquiera de las sustancias anteriores. Cualquier sustancia, hapteno, anticuerpo, macromolécula antigénica y las combinaciones de los mismos, pueden ser un analito analizado usando el procedimiento o un aparato descrito en el presente documento. En casos particulares, el analito es un anticuerpo, como un anticuerpo anti-integrina.

Las integrinas son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Takeda et al., Genome Biol. 8:215 2007)) y el nivel de cualquier anticuerpo anti-integrina se puede analizar usando el procedimiento o el aparato descrito en el presente documento. Cualquier anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal; un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo; un anticuerpo modificado como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de forma modificada, un anticuerpo humanizado, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>); o un anticuerpo biosintético, por ejemplo un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo de dominio simple (DAB), Fv, cadena simple Fv (scFv), o similares. El anticuerpo se puede producir de forma natural por el sujeto o ser administrado al sujeto.

En algunos casos, el analito es un anticuerpo anti-VLA-4, por ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-4, por ejemplo una natalizumab. TYSABRI® y otros análogos, variantes o derivados de TYSABRI® biológicamente activos, incluyendo biosimilares y biológicos sustancialmente similares al mismo, se consideran como natalizumab. En situaciones particulares, el analito es un anticuerpo anti-VLA-4 administrado previamente a un sujeto, por ejemplo, como un anticuerpo terapéutico. El analito puede ser, por ejemplo, un natalizumab. En otra circunstancia, el analito es un anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4). El analito puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-natalizumab.

### **Muestras biológicas**

Las muestras biológicas que se pueden analizar para la presencia de un analito usando los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento se pueden obtener de cualquier sujeto, por ejemplo, un humano o un sujeto no humano. En algunos casos, la muestra biológica se obtiene de un sujeto humano vivo.

- En algunos casos, el sujeto del que se obtiene la muestra presenta aparentemente sano, donde el ensayo se realiza como parte de un cribado de rutina. En otros casos, al sujeto se le ha diagnosticado previamente una enfermedad o trastorno y se ha sometido a tratamiento, por ejemplo, con un anticuerpo anti-integrina, por ejemplo un anticuerpo anti-VLA-4. La muestra biológica puede ser de un sujeto que ha sido tratado para disminuir la cantidad de analito. En algunos casos, se analiza la muestra de un sujeto usando un procedimiento descrito en el presente documento antes de que el sujeto se someta a un tratamiento, por ejemplo, para modular la cantidad de analito en el sujeto o para establecer el nivel basal de analito en el sujeto o para establecer la idoneidad del tratamiento, y después de que el sujeto haya sido tratado, por ejemplo, para monitorizar y/o modular la cantidad de analito en el sujeto.
- La muestra biológica puede ser un derivado de cualquier tejido, órgano o grupo de células del sujeto. En algunos casos, la muestra biológica es un raspado cervical, una biopsia o un lavado obtenido de un sujeto. En otros casos, la muestra es una muestra de sangre, plasma, suero u orina.
- En algunas circunstancias, la muestra biológica se puede procesar, por ejemplo, para extraer algunos componentes que pueden interferir con el procedimiento descrito en el presente documento, usando procedimientos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la muestra biológica se puede procesar para ser enriquecida con proteínas, por ejemplo, mediante precipitación de sal, y similares.
- En algunos métodos descritos en el presente documento, el nivel de un analito en una muestra se puede cuantificar y/o comparar con controles. Las muestras control adecuadas pueden ser, por ejemplo, de individuos que no han recibido tratamiento, por ejemplo, un tratamiento de anticuerpo anti-integrina, por ejemplo, un tratamiento con anticuerpo anti-VLA-4. Las muestras de control pueden ser de individuos genéticamente emparentado con el sujeto que se ha de analizar, pero también pueden ser de individuos genéticamente no emparentados. En algunos casos, el control es una referencia establecida. En otros casos, el nivel de un analito, por ejemplo un anticuerpo anti-integrina, se cuantifica usando métodos conocidos. En otras situaciones, la presencia o ausencia de una analito, por ejemplo un anticuerpo anti-integrina, dentro de una muestra se determina por inspección visual de la prueba.
- En algunas formas de realización, una muestra contacta con un agente de captura unido a un soporte sólido bajo condiciones adecuadas para la unión del agente de captura a analitos en la muestra, y, después de la separación de los analitos de muestra no unidos de los analitos unidos, los analitos unidos se detectan tal como se describe en el presente documento.

### **Métodos de análisis**

- En algunos casos, un analito, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina, por ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-4, o por ejemplo, un anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4), se puede analizar usando un método seleccionado de entre varios métodos de inmunoterapia, cualitativa y cuantitativamente. Los procedimientos inmunológicos e inmunoensayos son conocidos y se describen en, por ejemplo, Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA. Los inmunoensayos se pueden realizar con cualquiera de las diversas configuraciones conocidas en la técnica y descritas en, por ejemplo, Maggio Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1980); Tijssen, "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon and van Knippenberg Eds., Elsevier (1985), pp 9-20; y Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, NY (1988).

### ***Ensayos de unión inmunológica***

- En algunos casos, un analito, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, se detecta y/o cuantifica usando cualquiera o varios ensayos de unión inmunológica (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos, Nos. 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; 4.837.168; y Asai, Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology, Academic Press, Inc. NY (1993).

- Los inmunoensayos también pueden usar un reactivo marcado para unirse específicamente y marcar el complejo agente de captura/analito. El reactivo marcado puede ser él mismo una de las partes que comprenden el complejo agente de captura/analito. Alternativamente, el reactivo marcado puede ser una tercera parte, como un anticuerpo, que se une específicamente al analito a al complejo agente de captura/analito.

- En algunos casos, el analito es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, y el reactivo marcado es un segundo anticuerpo que presenta un marcador. Alternativamente, al segundo anticuerpo le puede faltar un marcador, pero puede, en su lugar, unirse mediante un reactivo marcado que

incluye un tercer anticuerpo específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con una parte detectable, como biotina, a la que puede unirse específicamente un reactivo marcado, como estreptavidina marcada con enzima.

- 5 También se pueden usar como reactivo marcado otras proteínas que pueden unirse específicamente a regiones constantes de la inmunoglobulina, como la proteína A o la proteína G. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de las bacterias estreptocócicas. Presentan una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de la inmunoglobulina de diversas especies (ver, por ejemplo, Kronval et al., J. Immunol. 111:1401-1406 (1973) y Akerstrom et al., J. Immunol. 135:2589-2542 (1985).

10 Durante los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento, pueden ser necesarias unas etapas de incubación y/o lavado después de la combinación de uno o más reactivos. Las incubaciones realizadas durante el ensayo pueden variar entre aproximadamente 5 segundos a varias horas, por lo general, desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. El tiempo de incubación dependerá del formato del ensayo, del analito, del  
15 volumen de solución, de las concentraciones y similares. Por lo general, un ensayo se realiza a temperatura ambiente, aunque se puede realizar un ensayo a varias temperaturas, como a aproximadamente 4°C a aproximadamente 40°C, por ejemplo, 4°C-10°C ó 4°C-25°C.

### 1. Formatos de ensayos no competitivos

20 Los inmunoensayos para la detección de un analito de interés, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, en las muestras pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de analito en un complejo agente de captura/analito se mide directamente. En un ensayo "sándwich", por ejemplo, el agente de captura se puede unir  
25 directamente a un sustrato sólido donde está inmovilizado. Estos agentes de captura inmovilizados se pueden unir después específicamente a un analito presente en una muestra de prueba. El analito, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, inmovilizado de este modo se une después mediante un reactivo marcado, como un segundo anticuerpo que presenta un marcador. Alternativamente, al segundo anticuerpo le puede faltar un marcador, pero puede, en su lugar, unirse mediante un reactivo marcado que es un tercer  
30 anticuerpo específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con una parte detectable, como biotina, a la que se puede unir específicamente un reactivo marcado, como estreptavidina marcada con enzima.

### 2. Formatos de ensayos competitivos

35 En los ensayos competitivos, la cantidad de analito (como un anticuerpo anti-integrina o un anticuerpo anti-fármaco) presente en una muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de analito añadido (exógeno) desplazado (o desplazado por competición) del agente de captura (por ejemplo, un anticuerpo específico para el analito) por el analito presente en la muestra. En un ensayo competitivo, una cantidad conocida de un analito, por ejemplo, un  
40 anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo, un anticuerpo anti-fármaco, se añade a la muestra y la muestra se pone después en contacto con el agente de captura, por ejemplo un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo anti-integrina: La cantidad de analito unido al agente de captura, por ejemplo, un anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra. En un ejemplo particular, el agente de captura, por ejemplo un anticuerpo que se une a un anticuerpo anti-integrina está inmovilizado en un sustrato  
45 sólido. Por ejemplo, la cantidad de analito, por ejemplo, anticuerpo anti-integrina, o por ejemplo un anticuerpo anti-fármaco, unido al agente de captura, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un anticuerpo anti-integrina o por ejemplo, un fármaco al que se une un anticuerpo anti-fármaco, se puede determinar midiendo la cantidad de analito presente en un complejo agente de captura/analito, o, alternativamente, midiendo la cantidad de analito no acompañado restante. La cantidad de analito puede ser detectada mediante un reactivo marcado.

50

### 3. Otros formatos de ensayo

En otros ejemplos, cuando el analito es un polipéptido, se puede usar un análisis por western blot (immunoblot) para detectar y cuantificar la presencia del polipéptido en una muestra. La técnica comprende generalmente la separación  
55 de las proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel en base al peso molecular, transferencia de las proteínas separadas en un soporte sólido adecuado (tales como, por ejemplo un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro derivado de nailon), y la incubación de la muestra con anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de interés. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente al polipéptido de interés en el soporte sólido. Estos anticuerpos se pueden marcar directamente o alternativamente se pueden detectar posteriormente  
60 usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente

a los anticuerpos contra el polipéptido de interés.

Otros formatos de ensayo incluyen unos inmunoensayos de liposoma (LIA), que usa liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos son detectados después de acuerdo con las técnicas estándar (ver, por ejemplo, Monroe et al., Amer. Clin. Prod. Rev. 5:34-41(1986)).

#### 4. Reactivos marcados

10 El marcador detectable usado en un procedimiento o aparato descrito en el presente documento no es limitante siempre y cuando no interfiera significativamente con la unión específica del reactivo marcado usado en el procedimiento o aparato. El marcador detectable puede ser cualquier material que presenta una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables se han desarrollado en el campo de los inmunoensayos y, en general, la mayoría de los marcadores útiles en dichos procedimientos se pueden usar en los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento. Un marcador puede ser, por ejemplo, cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, perlas magnéticas (por ejemplo Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas Rojo, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo,  $H^3$ ,  $I^{125}$ ,  $S^{35}$ ,  $C^{14}$ , o  $P^{32}$ ), enzimas (por ejemplo peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros que se pueden usar en un ELISA), y marcadores colorimétricos o en partículas como el oro coloidal o perlas de vidrio coloreado o plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Tal como se ha descrito en el presente documento, se puede usar una amplia variedad de marcadores, y la elección del marcador dependerá de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requisitos de estabilidad, los instrumentos disponibles y los suministros disponibles.

Los marcadores no radioactivos se pueden unir por medios indirectos. Las moléculas también se pueden conjugar directamente para señalar la generación de compuestos, por ejemplo, mediante la conjugación con una enzima o un compuesto fluorescente. Se pueden usar varios compuestos enzimáticos y fluorescentes con los procedimientos y aparatos descritos en el presente documento y son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos, N° 4.391.904).

Los medios para detectar marcadores son conocidos por los expertos en la técnica. Por consiguiente, por ejemplo, donde el marcador es un marcador radioactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en una autoradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar mediante excitación del fluorocromo con la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante una película fotográfica, el uso de detectores electrónicos como dispositivos de carga acoplada (por sus siglas en inglés, CCD) o fotomultiplicadores y similares. De modo similar, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos simples se pueden detectar directamente observando el color asociado con el marcador. Por consiguiente, en varios ensayos con varilla de medición, el oro conjugado aparece frecuentemente de color rosado, mientras que varias perlas conjugadas aparecen con el color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de reactivos marcados. Por ejemplo, los ensayos de aglutinación se pueden usar para detectar la presencia de anticuerpos diana. En este caso, las partículas cubiertas de antígeno se aglutinan por muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, no es necesario que ninguno de los componentes del ensayo esté marcado, y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante una sencilla inspección visual.

Después de la detección de una señal detectable, la señal se puede comparar con una referencia y/o relacionarlo con un nivel predeterminado que corresponde a las recomendaciones del tratamiento. Por ejemplo, en un ensayo para detectar el nivel de un anticuerpo anti-VLA-4 en un sujeto que está siendo tratado con plasmaféresis para reducir la cantidad del anticuerpo, un nivel de la señal inferior al nivel predeterminado puede estar correlacionado con la recomendación de que no es necesario realizar más plasmaféresis. Una señal correlacionada con un nivel más elevado puede indicar que es recomendable realizar una plasmaféresis adicional.

La detección de una señal en un ensayo descrito en el presente documento puede ser visual, pero también se

puede realizar usando un lector para detectar la señal. Dichos lectores incluyen, por ejemplo, lectores de placa automáticos, lectores EIA y similares. Los lectores se pueden usar para la determinación semi-cuantitativa o cuantitativa de la concentración de los analitos probados. La determinación semi-cuantitativa o cuantitativa de la concentración se puede representar usando un sistema colorimétrico.

5

## 5. Agentes secundarios

Los agentes secundarios usados en procedimiento o aparato descritos en el presente documento se pueden usar para detectar la unión del agente de captura al anticuerpo. El agente secundario puede ser un anticuerpo que presenta un marcador detectable unido, covalentemente o no covalentemente. El marcador detectable unido al agente secundario puede ser un marcador detectable descrito anteriormente. El agente secundario puede ser un anticuerpo no específico, o unos anticuerpos que reconocen el analito o fragmentos del mismo o polipéptidos que reconocen el analito. El agente secundario puede incluir una anticuerpo anti-IgG4, por ejemplo, un IgG4 anti-humano o un IgG4 anti-humano que reacciona con la porción Fc de la cadena pesada de la IgG4 humana.

15

## 6. Tiempo

La unión del agente de captura al anticuerpo puede ser detectable en aproximadamente 30 segundos, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, o 10 horas después de la unión.

20

## 7. Tampón

Se puede usar cualquier tampón adecuado para los ensayos inmunológicos como tampón de detección que sea determinado por un experto en la técnica. El tampón de detección puede incluir un agente tensioactivo. Se puede usar cualquier tensioactivo adecuado. Un agente tensioactivo puede ser un tensioactivo polisorbato como TWEEN 20®, TWEEN 40®, TWEEN 60®, TWEEN 80®, SPAN 20®, SPAN 40®, SPAN 60®, SPAN 65®, y SPAN 80®. El tampón puede incluir una solución salina tamponada, como la solución salina tamponada con Tris (TBS) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El tampón puede incluir también un agente bloqueante, por ejemplo una proteína como la albúmina sérica bovina (BSA), leche o gelatina.

30

## Tratamientos

Los ensayos descritos en el presente documento se pueden realizar antes y/o después de la administración de un tratamiento al sujeto. En algunos casos, el tratamiento es un tratamiento para extraer un analito o componente del sujeto, como por ejemplo, de la sangre de un sujeto. En situaciones especiales, el tratamiento es aféresis sanguínea, como un intercambio de plasma, para extraer uno o más anticuerpos del sujeto.

35

La aféresis sanguínea es un uso médico habitual de separación continua de fluidos. La aféresis presenta muchas utilidades clínicas, incluyendo muchas terapias que implican la extracción de sangre del cuerpo del sujeto, la separación de la sangre en componentes, la alteración de uno o más de los componentes y la introducción de alguna mezcla o selección del líquido extraído y/o alterado de nuevo en el cuerpo del sujeto. Algunos ejemplos de procedimientos con aféresis terapéutica incluyen el intercambio terapéutica de plasma (TPE o PLEX) (un procedimiento mediante el cual el plasma sin células se extrae y se sustituye con una solución de coloide/solución salina); citoreducción (un proceso mediante el cual se extraen las plaquetas y leucocitos); fotoféresis (un procedimiento mediante el cual las células mononucleares recolectadas mediante aféresis terapéutica se exponen a una luz ultravioleta-A y psolareno y se vuelven a inyectar en el sujeto) y adsorción selectiva (un proceso mediante el cual se adsorbe el plasma en una columna y se devuelve al sujeto).

45

En un ejemplo de un procedimiento de aféresis, la sangre se extrae de un sujeto mediante una aguja insertada en la vena del sujeto. La aguja está unida a un extremo de un tubo de plástico que proporciona una vía de flujo para la sangre. El otro extremo del tubo conduce a un separador, como una centrífuga, para separar la sangre en sus componentes. Las centrífugas de flujo continuo que permiten la entrada y salida de flujo continuado de materiales hacia y desde la centrífuga son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.425.112).

55

La sangre que se separa en plasma y células se puede volver a inyectar en el sujeto a través de otro sustituto de plasma A o un plasma alterado se puede recombinar con los elementos sanguíneos que se van a volver a inyectar al sujeto. Ya que la tasa de sangre que se va extrayendo del sujeto y la sangre que se vuelve a inyectar en el sujeto pueden ser la misma tasa, sólo una pequeña cantidad de la sangre del sujeto puede encontrarse fuera del cuerpo en

60

cualquier momento.

Otro procedimiento de aféresis utiliza un sistema automatizado que usa circuitos líquidos desechables pre-esterilizados a través del cual la sangre fluye. Los circuitos de fluidos se montan en máquinas reutilizables que pueden presentar bombas, válvulas, sensores y similares. Estos sistemas automatizados incluyen además un ordenador interno y software asociado que controlan muchas de las funciones de procesamiento. Un ejemplo de sistema automatizado se describe en la patente de Estados Unidos, No. 6.706.008. Otros procedimientos y aparatos para realizar una aféresis se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos, Nos. 7.267.771, 6.849.183, 5.200.090 y 4.954.128).

En algunos casos, el nivel de un anticuerpo anti-integrina o un anticuerpo anti-fármaco descrito en el presente documento se analiza antes de administrar un tratamiento a un sujeto. En otros casos, el nivel de un anticuerpo anti-integrina o un anticuerpo anti-fármaco se analiza después de administrar un tratamiento a un sujeto. Por ejemplo, el nivel de un anticuerpo anti-integrina o un anticuerpo anti-fármaco se analiza un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de la administración del tratamiento. Estos ensayos se pueden administrar como parte de un régimen de tratamiento, por ejemplo para monitorizar periódicamente los niveles de fármaco o los niveles de anticuerpos anti-fármaco. En algunos casos, se administra el tratamiento y se analiza el nivel de anticuerpo anti-integrina o anticuerpo anti-fármaco en ciclos repetidos de tratamiento y ensayo, por ejemplo, hasta que el nivel del anticuerpo anti-integrina en la muestra alcance el nivel predeterminado. Por ejemplo el nivel predeterminado puede ser aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, o aproximadamente 20 µg/ml. En algunos casos, el nivel predeterminado es 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, o 20 µg/ml. Los tratamientos se pueden administrar, por ejemplo, una vez al día o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses o anualmente.

La invención se ilustra con más detalle mediante los ejemplos siguientes. Los ejemplos se proporcionan sólo con fines ilustrativos. En ningún sentido, deben ser interpretados como limitantes del alcance o contenido de la invención

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

**Desarrollo de una prueba para analizar un anticuerpo anti-VLA-4 en un tampón usando un Acm de rata 12C2 o Acm de ratón 12C4 y conjugados anti- IgG4 humana-Oro**

Se usó un sistema de prueba inmunocromatográfica de flujo lateral para desarrollar un ensayo específico anti-VLA-4. Haciendo referencia a la FIG. 1, el sistema de prueba de flujo lateral está compuesto por un casete con dos partes en plástico (parte superior (100) y parte inferior (101)). La parte superior contenía dos aberturas- una abertura (102) para la aplicación de muestras (110) y tampón de detección (118) y una ventana (103) para la detección visual de los resultados. La parte inferior albergaba una tira de prueba de nitrocelulosa (104) en la cual el Acm 12C2 de rata o Acm 12C4 de ratón (105) se inmovilizó en un "sitio de prueba" ("T") (106) y un reactivo de captura de oro universal (107) en un "sitio control" ("C") (108).

Situados por encima de los sitios de prueba y control, se encuentra una "almohadilla de oro" (109) de un material fibroso donde uno de ratón anti- IgG4 humana se conjugó con partículas de oro, el complejo es (112). Más arriba de la almohadilla de conjugado de oro se encuentra otra almohadilla de fibra (111) que recibió la muestra del anticuerpo humanizado anti-VLA-4 en el tampón (110) y el tampón de detección (118) a través de una abertura (102). La almohadilla de la muestra (111), la almohadilla de oro (109) y la membrana de nitrocelulosa (104) se encontraban en un orden secuencial de modo que la muestra migró por capilaridad desde la almohadilla de la muestra (111) hasta la almohadilla de oro (109) para formar el "primer complejo" de la muestra 110 y el conjugado de ratón anti IgG-4 - humana/oro (112). Después el complejo se desplazó a través de la nitrocelulosa (104) donde se encontró con el Acm 12C4 de ratón o Acm 12C2 de rata (105) en el sitio de prueba (106). La muestra (110) reaccionó con el Acm 12C4 de ratón o Acm 12C2 de rata (105), formando un complejo de (112) y (110) que quedó atrapado en el sitio de prueba (106) y se visualizó como una línea roja (114.) En otra realización, la muestra (110) se puede añadir más abajo del conjugado de oro.

El exceso de anticuerpo libre marcado con oro (de ratón anti-IgG4 humana) se desplazó más al sitio de control

donde un reactivo de captura de oro universal (107) capturó el anticuerpo libre marcado con oro (de ratón anti-IgG4 humana) provocando la aparición de una línea roja visible adicional (115) en el sitio control (108). Cualquier exceso de material, oro y tampón de detección fue absorbido en el extremo distal de la tira de nitrocelulosa por una almohadilla de filtro absorbente (116).

5

La especificidad de la prueba se debió al hecho de que el complejo en el sitio de prueba sólo se formó cuando la molécula muestra contiene una parte IgG4 humana o humanizada para capturar el conjugado de ratón anti-IgG4 humana oro y forman el primer complejo y la parte anti-VLA-4 para reaccionar con el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) en el sitio de prueba. En una representación simple, la molécula anti-VLA-4 se colocó en sándwich entre el anticuerpo de ratón anti-IgG4 humana marcado con oro y anticuerpo anti-(anti-anticuerpo VLA-4) inmovilizado en la membrana.

### **Materiales**

15 Acm12C4 de ratón anti-(anticuerpo anti-VLA-4) (Elan), 2,1 mg/mL

Acm 12C2 de rata anti--(anticuerpo anti-VLA-4) (Biogen Idec), 1,76 mg/mL

Acm de ratón anti-IgG4 humana (Southern Biotech), 0,5 mg/mL

20

Ac humanizado anti-VLA-4 (Biogen Idec), 20 mg/mL

Ac Anti-VLA-1 (Biogen Idec), IgG4 humana (CalBiochem), 1 mg/mL

25 Tampón de formulación Ac humanizado Anti-VLA-4 (Biogen Idec)

Tampón de detección (PBS con BSA al 1% p/v y Tween 20 al 1% p/v)

Conjugado de oro (40 nm)

30

### **Desarrollo de la prueba**

El enfoque para el desarrollo de la prueba del anticuerpo anti-VLA-4 era dirigirse al sitio de unión del antígeno con un anticuerpo específico de captura para el anticuerpo anti-VLA-4 (Acm 12C4 o 12C2) inmovilizado en la membrana, y un anticuerpo detector marcado con oro (anti- IgG4 humana) dirigido contra la región constante del anticuerpo anti-VLA-4, que comprende la molécula IgG4 humana.

Si el anticuerpo monoclonal 12C4 ó 12C2 es altamente específico, no se captura ninguna otra molécula en la membrana y así la prueba es negativa. El anti-VLA-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado frente a VLA-1. La región constante del anticuerpo es igG1 humana, mientras que la región de unión variable del antígeno es de origen murino. Ya que VLA-1 y VLA-4 están estrechamente relacionado, se puede usar anti-VLA-1 como control adicional del sistema de prueba. Esta inclusión se puede usar para confirmar la especificidad del sistema de prueba.

Basándose en esto supuestos, se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral con los Acm 12C4 o 12C2 dirigidos contra el anticuerpo humanizado anti-VLA-4. Para determinar la concentración adecuada del anticuerpo de captura, se usó 12C4 o 12C2, el cuál se tituló entre 0,25 y 1,0 mg/mL en tiras de prueba separadas y se probó contra el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a 80 µg/mL. Después el anticuerpo 12C4 ó 12C2 se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana a 1,0 mg/mL. Un anticuerpo monoclonal de ratón anti- IgG4 humana (cadena gamma específico) a 30 µg/mL se conjugó con partículas de oro. El conjugado inmunooro de ratón anti-IgG4 humana se liofilizó después en la almohadilla del conjugado y se usó como molécula detectora. En el sitio de control de la membrana, se usó un reactivo de oro universal a 3,0 mg/mL.

### **Resultados**

55 Durante la titulación del anticuerpo monoclonal 12C4 ó 12C2, una reacción positiva fue identificada por la presencia de una banda en la porción superior de cada tira. Se seleccionó una concentración de anticuerpo de 1,0 mg/mL, puesto que dio como resultado una señal intensa con el mínimo ruido de fondo, y se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana.

60 El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 ,el humanizado anti-VLA-1 , IgG1 (mieloma), IgG4 (mieloma), anti-IgG1 y el

tampón de formulación se probaron en un sistema de flujo con 12C4 ó 12C2 inmovilizado. El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 se ensayó a un intervalo de concentración de 0,015 y 500 µg/mL. El anticuerpo 12C4 ó 12C2 fue capaz de detectar el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a una concentración de 0,08 µg/mL.

- 5 Después el anticuerpo 12C2 se usó para fabricar unos casetes de prueba. La Figura 1 ilustra la especificidad de la prueba usando los casetes de prueba. Todas las pruebas mostraron una banda única (115), que indica una prueba válida, pero sólo el casete para la prueba del anticuerpo humanizado anti-VLA-4 mostró una segunda banda (114) que indica una prueba positiva.

## 10 EJEMPLO 2

### **Desarrollo de una prueba para analizar un anticuerpo Anti-VLA-4 en el suero usando un Acm 12C2 de rata o Acm 12C4 de ratón y unos conjugados anti- IgG4 humana-oro**

- 15 Para probar la viabilidad de la prueba usando un fluido biológico, se probó un ensayo usando suero reforzado con anti-VLA-4. El casete con dos partes de plástico de este sistema de prueba de flujo lateral es el mismo que el del Ejemplo 1, con algunas modificaciones. En referencia a la FIG. 2, la parte superior (200) contenía tres aberturas- una abertura (202) es para la aplicación de muestras (210), abertura (217) para un tampón de detección (218) y una ventana (203) para la detección visual de los resultados. En otras realizaciones (no se muestran), el tampón de  
20 detección se puede añadir más arriba de la muestra o se puede añadir en la misma abertura para la aplicación de muestras. La parte inferior (201) aloja una tira de prueba de nitrocelulosa (204) en la cual el Acm 12C4 de ratón o Acm12C2 de ratón (205) se inmovilizó en un "sitio de prueba" ("T") 206 y un anticuerpo de cabra anti-ratón (207) en un "sitio control" ("C") (208). En otras formas de realización, se puede usar como anticuerpo control un anticuerpo frente a analitos específicos del suero (por ejemplo, albúmina sérica).

- 25 Más arriba de los sitios prueba y control, se encuentra una almohadilla fibrosa («almohadilla de muestra») (209) que recibe la muestra (210). Situados por encima de los sitios de prueba y control, se encuentra una "almohadilla de oro" (211) de un material fibroso donde uno de ratón anti-IgG4 humana se conjugó con partículas de oro, el complejo es el (212). Se usó una prueba en dos etapas. En la primera etapa, la muestra de suero (210) se aplica en la abertura  
30 de la muestra (202) y migra hacia la zona de captura (205) delante del conjugado de oro para formar un complejo de una muestra (210) (anti-VLA4) con 12C4 de ratón o 12C2 de rata en la línea de prueba (205). En la segunda etapa, el tampón de detección (218) se aplicó en el puerto del tampón de detección (217) rehidrató el conjugado monoclonal anti-IgG4 humana -oro (212). Después el conjugado (212) se desplazó hacia la línea de captura de la prueba (205) para formar un complejo con el anti-VLA-4 unido a la línea de captura (205) y la reacción en el sitio  
35 (206) se visualizó como una línea roja (214).

- El exceso de anticuerpo libre marcado con oro (de ratón anti-IgG4 humana) se desplazó más al sitio de control (208) donde un anticuerpo de cabra anti-ratón (207) capturó el anticuerpo libre marcado con oro (de ratón anti-IgG4 humana) provocando la aparición de una línea roja visible adicional (215). Cualquier exceso de material, oro y  
40 tampón de detección fue absorbido en el extremo distal de la tira de nitrocelulosa por una almohadilla de filtro absorbente (216).

- La especificidad de la prueba se debió al hecho de que el complejo en el sitio de prueba sólo se formó cuando la muestra contiene una parte anti-VLA-4 para reaccionar con el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) en el sitio de  
45 prueba, y ser detectada por una parte de ratón anti-IgG4 humana conjugado con oro. En una representación simple, la molécula anti-VLA-4 se colocó en sándwich entre el anticuerpo de ratón anti-IgG4 humana marcado con oro y anticuerpo anti-(anti-anticuerpo VLA-4) inmovilizado en la membrana. El éxito de este formato depende de cualquier grupo endógeno que interfiera (por ejemplo, IgG4) en la muestra que se desplaza delante del conjugado oro anti-IgG4 reduciendo su interferencia con la detección del anti-VLA-4 en la línea de prueba.

- 50 Se puede usar un lector para la determinación semi-cuantitativa de la concentración de los analitos probados. Para registrar los resultados en el sistema de flujo lateral, se usó un lector basado en una puntuación visual positiva/negativa. El umbral visual del lector corresponde a valores que están en un intervalo de 20-40 unidades. Si la señal se registró como positiva visualmente dentro de este intervalo entonces se debe considerar una línea rosa  
55 muy débil que podría no ser visible para todos los operadores.

#### **Materiales**

- Acm 12C4 de ratón anti-(anticuerpo anti-VLA-4) (Elan), 2,1 mg/mL

60

Acm de ratón anti-IgG4 humana (Southern Biotech), 0,5 mg/mL

Ac humanizado anti-VLA-4 (Biogen Idec), 21 mg/mL

5 IgG4 humana (The Binding Site, San Diego, CA), 13,7 mg/mL

Tampón de formulación Ac humanizado Anti-VLA-4 (Biogen Idec)

Anticuerpo de cabra anti-ratón, 3,0 mg/ml

10

Tampón de detección (PBS con BSA al 1 % p/v y Tween 20 al 1 % p/v)

Conjugado de oro (40 nm)

15 **Desarrollo de la prueba**

El enfoque para el desarrollo de la prueba era dirigirse al sitio de unión del antígeno con un anticuerpo de captura (Acm 12C4 o Acm 12C2) inmovilizado en la membrana, y un anticuerpo anti-VLA-4 detector marcado con oro (ratón anti-IgG4 humana) dirigida contra la región constante del anticuerpo anti-VLA-4, que comprende la molécula IgG4 humana.

20

Si el anticuerpo monoclonal usado en la prueba como 12C4 ó 12C2 es altamente específico, no se captura ningún otro analito en la membrana y por consiguiente la prueba es negativa.

25 Basándose en esto supuestos, se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral con los Acm 12C4 o 12C2 dirigidos contra el anticuerpo humanizado anti-VLA-4. Para determinar la concentración adecuada de anticuerpo de captura, se uso 12C4 que se tituló en tiras de prueba separadas y se probó frente al anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a diferentes concentraciones que varían desde 100 µg/mL hasta 0,25 µg/mL. Después el anticuerpo 12C4 se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana a 2,1 mg/mL. Un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG4 humana (cadena gamma específico) se conjugó con partículas de oro de 40 nm. El conjugado inmunooro ratón anti-IgG4 humana se liofilizó después en la almohadilla del conjugado y se usó como molécula detectora. En el sitio de control de la membrana, se usó un anticuerpo de cabra anti-ratón al a 3,0 mg/mL.

30

### Resultados

35

Durante la titulación del anticuerpo monoclonal 12C4 ó 12C2, una reacción positiva fue identificada por la presencia de una banda en la porción superior de cada tira. Se seleccionó una concentración de anticuerpo de 2,1 mg/mL, puesto que dio como resultado una señal intensa con el mínimo ruido de fondo, y se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana. El protocolo consistió en la adición de 20 µL de suero (pre-diluido 1:10 en tampón de detección o limpio) en el puerto (202) seguido inmediatamente (< 1 minuto) por 150 µL de tampón de detección (218) en el puerto (217). La muestra se dejó incubando en el dispositivo durante 30 minutos a temperatura ambiente y humedad ambiente.

40

El anticuerpo humanizado anti-VLA-4, en una matriz de muestra, IgG4 (mieloma), anti-VLA-4 junto con IgG4 y el tampón de formulación se probaron en un sistema de flujo con 12C4 inmovilizado. El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 se probó a un intervalo de concentración de 0,25 y 100 µg/mL. El anticuerpo 12C4 fue capaz de detectar el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a una concentración de 0,25 µg/mL.

45

Después el anticuerpo 12C4 se usó para fabricar unos casetes de prueba. La Figura 2 ilustra la especificidad de la prueba usando los casetes de prueba. Todas las pruebas mostraron una banda única (215), que indica una prueba válida, pero sólo los casetes para la prueba del anticuerpo humanizado anti-VLA-4 mostraron una segunda banda (214) que indica una prueba positiva.

50

En algunas formas de realización, la prueba incluye unos componentes adicionales. El anti-VLA-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado frente a VLA-1. La región constante de algunos anticuerpos anti-VLA-1 es igG1, mientras que la región de unión variable del antígeno es de origen murino. En algunas realizaciones, el anti-VLA-1 se usa como un control adicional para evaluar la especificidad del sistema de prueba. Los controles adicionales que se pueden incluir en el sistema de prueba incluyen la evaluación de la tolerancia de la prueba a niveles en exceso de analitos que pueden encontrarse en el suero, por ejemplo, IgG4, fármaco, o anticuerpos anti-fármaco. Se puede usar un lector para la determinación semi-cuantitativa o cuantitativa de las concentraciones del anti-VLA4.

55

60

**EJEMPLO 3****Desarrollo de una prueba para analizar el anticuerpo-anti-VLA-4 usando los conjugados Acm anti-anti-VLA-oro**

Los experimentos se realizaron para probar la capacidad de un formato diferente para detectar eficazmente el anticuerpo anti-VLA-4 en el suero. El casete con dos partes de plástico del sistema de flujo lateral es el mismo del Ejemplo 2 con algunas modificaciones. En referencia a la FIG.3, la parte superior (300) contenía tres aberturas- una (302) es para la aplicación de las muestras (310), abertura (317)-para la aplicación del tampón de detección (318) y una ventana (303) para la detección visual de los resultados. La parte inferior (301) albergaba una tira de prueba de nitrocelulosa (304) en la que se inmovilizó el Acm de ratón 12C4 (305) en el «sitio de prueba» (T) (306) y un anticuerpo de cabra anti-ratón (307), en el «sitio control» (C) (308).

Más arriba de los sitios prueba y control, se encuentra una almohadilla fibrosa («almohadilla de muestra») (309) que recibe la muestra (310). Más arriba de los sitios de prueba y control había una «almohadilla de oro» (311) de material fibroso donde un anticuerpo anti-anti-VLA4 de ratón, 12C4 se conjugó con las partículas de oro, el complejo es (312). Se usó una prueba en dos etapas. En la primera etapa, la muestra (310) se aplicó en la abertura de la muestra (302) y migró hacia la zona de captura (305) delante del conjugado de oro para formar un complejo de una muestra (310) (anti-VLA4) con el 12C4 de ratón o 12C2 de rata en la línea de prueba (305). En la segunda etapa, el tampón de detección (318) se aplicó en el puerto del tampón de detección (317) y rehidrató el conjugado de oro-anticuerpo monoclonal de ratón 12C4 anti-anti-VLA4 (312). Después el conjugado (312) se desplazó hacia la línea de captura de la prueba (305) para formar un complejo con el anti-VLA-4 unido a la línea de captura (305) y la reacción en el sitio (306) se visualizó como una línea roja (314).

El exceso de anticuerpo marcado con oro libre (Acm 12C4 de ratón) se desplazó más al sitio de control donde un anticuerpo de cabra anti-ratón (307) capturó el Acm provocando la aparición de una línea roja visible adicional (315). Cualquier exceso de material, oro y tampón de detección fue absorbido en el extremo distal de la tira de nitrocelulosa por una almohadilla de filtro absorbente (316).

Cuando se usan muestras enriquecidas con natalizumab, este formato de prueba presenta un intervalo de detección más restrictivo que el ensayo realizado con el conjugado anti IgG4 -humana oro porque el complejo en el sitio control sólo se formó cuando la molécula de la muestra puede reaccionar tanto con el conjugado anti-(anticuerpo anti-VLA-4)/oro y el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) en el sitio de prueba. En una representación simple, la molécula anti-VLA-4 se extiende entre el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) marcado con oro y el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) inmovilizado en la membrana. Por lo tanto, la prueba es menos sensible para la detección global del anticuerpo anti-VLA-4 cuando se usan muestras reales de pacientes. Este formato da como resultado una prueba más restringida en la que se detecta sólo natalizumab intacto, que es un anticuerpo a base de IgG4. Este formato no detecta moléculas intercambiadas un solo monómero, que se observa en pacientes tratados con natalizumab y otros anticuerpos IgG4. Por lo tanto, los usos de este formato se restringen generalmente a la detección de fármaco intacto.

***Materiales***

- 45 Acm 12C4 de ratón anti-(anticuerpo anti-VLA-4) (Elan), 2,1 mg/mL
- Ac humanizado anti-VLA-4 (Biogen Idec), 21 mg/mL
- Tampón de formulación Ac humanizado Anti-VLA-4 (Biogen Idec)
- Anticuerpo de cabra anti-ratón, 3,0 mg/mL
- Tampón de detección (PBS con BSA al 1 % p/v y Tween 20 al 1 % p/v)
- 50 Conjugado de oro (40 nm)

***Desarrollo de la prueba***

Se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral con Acm 12C4 dirigido contra el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 . Para determinar la concentración adecuada del anticuerpo de captura, 12C4 se tituló en tiras de prueba separadas y se probó frente al anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a diferentes concentraciones que varían desde 0,25 hasta 100 µg/mL. Después el anticuerpo 12C4 se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana a 2,1 mg/mL. También, el anticuerpo 12C4 se conjugó con partículas de oro de 40 nm, liofilizadas en la almohadilla del conjugado y se usó como molécula detector. En el sitio de control de la membrana, se usó un anticuerpo de cabra anti-ratón al a 3,0 mg/mL.

**Resultados**

5 Durante la titulación del anticuerpo monoclonal 12C4, se indicó una reacción positiva por la presencia de una banda en la parte superior de cada tira. Se seleccionó una concentración de anticuerpo de 2,1 mg/mL, puesto que dio como resultado una señal intensa con el mínimo ruido de fondo, y se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana. El protocolo consistió en la adición de 20 µL de suero (pre-diluido 1:10 en tampón de detección o limpio) en el puerto (302) seguido inmediatamente (< 1 minuto) por 150 µL de tampón de detección (318) en el puerto (317). La muestra se dejó incubando en el dispositivo durante 30 minutos a temperatura ambiente y humedad ambiente.

10 El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 en una matriz, el anticuerpo anti-VLA-4 con IgG4 adicional añadido y el tampón de formulación se probaron en un sistema de flujo con 12C4 inmovilizado. El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 se probó a un intervalo de concentración de 1 y 100 µg/mL. El anticuerpo 12C4 fue capaz de detectar el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 a una concentración de 1 µg/mL.

15 Después el anticuerpo 12C4 se usó para fabricar unos casetes de prueba. La Figura 3 ilustra la especificidad de la prueba usando los casetes de prueba. Todas las pruebas mostraron una banda única (315), que indica una prueba válida, pero sólo el casete para la prueba del anticuerpo humanizado anti-VLA-4 mostró una segunda banda (314) que indica una prueba positiva.

**EJEMPLO 4****Desarrollo de una prueba para ensayar el anticuerpo anti-fármaco usando un fármaco anti-VLA-4 y un conjugado oro- fármaco anti-VLA-4**

25 Los ensayos y procedimientos para detectar anticuerpos dirigidos contra un fármaco, por ejemplo natalizumab se describen en el presente documento. Para probar este ensayo, el casete con dos partes de plástico de este sistema de flujo lateral fue el mismo del Ejemplo 1 -3 con algunas modificaciones. En referencia a la FIG.4, la parte superior (400) contenía tres aberturas- una (402) para la aplicación de las muestras (410), abertura (417) - para la aplicación del tampón de detección (418) y una ventana (403) para la detección visual de los resultados. La parte inferior (401) albergaba una tira de prueba de nitrocelulosa (404) en la que se inmovilizó el anticuerpo anti-VLA-4 (405) en el «sitio de prueba» (T) (406) y un anticuerpo de control (407), en el «sitio control» (C) (408).

35 Más arriba de los sitios prueba y control, se encuentra una almohadilla fibrosa («almohadilla de muestra») (409) que recibe la muestra (410). Más arriba de los sitios de prueba y control había una «almohadilla de oro» (411) de material fibroso donde un anti-VLA-4 se conjugó con las partículas de oro, el complejo es (412). Se usó una prueba en dos etapas. En la primera etapa, la muestra (410) se aplicó en la abertura de la muestra (402) y migró hacia la zona de captura (405) delante del conjugado de oro para formar un complejo de una muestra (410) (anti-anti-VLA4) con el anti-VLA-4 en la línea de prueba (405). En la segunda etapa, el tampón de detección (418) se aplicó en el puerto del tampón de detección (417) y rehidrató el conjugado de oro anti-VLA-4 (412). Después, el conjugado (412) se desplazó hacia la línea de captura de la prueba (405) para formar un complejo con el anti-(anti-VLA-4) unido a la línea de captura (405) y la reacción en el sitio de prueba (406) se visualizó como una línea roja (414).

45 Cualquier exceso de material, oro y tampón de detección fue absorbido en el extremo distal de la tira de nitrocelulosa por una almohadilla de filtro absorbente (416).

La especificidad de la prueba fue debida al hecho de que el complejo en el sitio de la prueba sólo se formó cuando la molécula de muestra se unió al anticuerpo anti-VLA en la línea de la prueba y al conjugado de oro anti-VLA-4. En una representación simple, el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) se extiende entre el anticuerpo de oro marcado anti-VLA-4 y la membrana inmovilizada del anticuerpo anti-VLA-4, y por consiguiente, en algunos casos, este tipo de ensayo se denomina "ensayo de puente".

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-VLA-4 marcado con oro en exceso y el libre pueden desplazarse más hacia el sitio control (408) donde un anticuerpo control (407) está disponible para capturar los componentes de la matriz, haciendo aparecer una línea roja adicional visible (415).

Se puede usar un lector para la determinación semi-cuantitativa de la concentración de los analitos probados. Para registrar los resultados en el sistema de flujo lateral, se usó un lector basado en una puntuación visual positiva/negativa. El umbral visual del lector corresponde a valores que están en un intervalo de 20-40 unidades. Si la señal se registró como positiva visualmente dentro de este intervalo entonces se debe considerar una línea rosa

60

muy débil que podría no ser visible para todos los operadores.

### **Materiales**

- 5 Acm12C4 de ratón anti-(anticuerpo anti-VLA-4) (Elan), 2,1 mg/mL  
 Acm de conejo anti--(anticuerpo anti-VLA-4) (Biogen Idec), 1,1 mg/mL  
 Acm 12C2 de rata anti--(anticuerpo anti-VLA-4) (Biogen Idec), 1,76 mg/mL  
 10 Ac humanizado anti-VLA-4 (Biogen Idec), 21 mg/mL  
 Tampón de formulación Ac humanizado Anti-VLA-4 (Biogen Idec)  
 15 Anticuerpo control  
 Tampón de detección (PBS con BSA al 1% p/v y Tween 20 al 1% p/v)

Conjugado de oro (40 nm)

20

### **Desarrollo de la prueba**

Se desarrolló un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral con el anticuerpo anti-VLA-4 dirigido contra el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4). Para determinar la concentración adecuada del anticuerpo de captura, se usó un anticuerpo anti-VLA-4, que se tituló en tiras de prueba separadas y se probó frente al anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) a diferentes concentraciones que varían desde 25 µg/mL hasta 0,5 µg/mL. Después, el anticuerpo anti-VLA-4 se inmovilizó en el sitio de prueba de la membrana a 0,5 mg/mL. Se conjugó un anti-VLA-4 con partículas de oro de 40 nm . El conjugado inmuno-oro anti-VLA-4 se liofilizó después en la almohadilla del conjugado y se usó como molécula detectora. En el sitio de control de la membrana, se usó un anticuerpo de control.

30

### **Resultados**

La concentración de 0,5 mg/mL del anticuerpo se seleccionó para la inmovilización basándose en los experimentos de titulación, que dio como resultado una señal intensa con el mínimo ruido de fondo. El protocolo consistió en la adición de 20 µL de suero (pre-diluido 1:10 en tampón de detección o limpio) en el puerto (402) seguido inmediatamente (< 1 minuto) por 150 µL de tampón de detección (418) en el puerto (417). La muestra se dejó incubando en el dispositivo durante 30 minutos a temperatura ambiente y humedad ambiente.

35

El anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) de ratón y de conejo, el anticuerpo anti-VLA-4, la combinación de los anteriores y el tampón de formulación se ensayaron en un sistema de flujo con un anticuerpo anti-VLA-4 inmovilizado. El anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) se ensayó a un intervalo de concentración de 25 µg/mL a 0,5 µg/mL. El anticuerpo humanizado anti-VLA-4 fue capaz de detectar el anticuerpo anti-(anticuerpo anti-VLA-4) humano a una concentración de 0,5 µg/mL.

40

Después, el anticuerpo humanizado anti-VLA-4 se usó para fabricar los casetes de prueba. La Figura 4 ilustra la especificidad de la prueba usando los casetes de prueba. Todas las pruebas mostraron una banda única (415), que indica una prueba válida, pero sólo el casete para la prueba del anticuerpo anti-fármaco mostró una segunda banda (414) que indica una prueba positiva.

45

Se puede usar una línea de control o una línea de normalización adicional con el propósito de normalizar los datos en el ensayo de flujo lateral. Esta línea de normalización puede ser un anticuerpo inmovilizado contra uno de los componentes de la matriz (por ejemplo, suero) que presentan concentraciones similares en las muestras de la matriz individual. Alternativamente, una línea de normalización puede ser un anticuerpo inmovilizado contra una proteína de una especie irrelevante que no está presente en la matriz del ensayo, pero añadida a las mismas concentraciones para cada muestra de la matriz antes de colocarla en un dispositivo de flujo lateral. Esta proteína se puede añadir a cada muestra directamente o, en el caso de que las muestras se diluyan en un tampón de detección, puede ser un componente del tampón de detección. Se puede usar un lector para la determinación semi-cuantitativa o cuantitativa de las concentraciones del anti anti-VLA4.

50

55

60

OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las 5 reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para analizar el nivel de un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 , el procedimiento comprende:
- 5 a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un sujeto con un agente de captura asociado con un sustrato, donde el agente de captura puede unirse a un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en la muestra para formar un complejo y donde el sustrato es una porción de un sistema inmunocromatográfico de flujo lateral; y
- 10 b) detectar la unión del agente de captura al anticuerpo IgG4 anti-VLA-4 con un agente secundario que se une a dicho complejo en el sistema inmunocromatográfico de flujo lateral y determinar si el nivel de anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 es superior o inferior a un nivel predeterminado en base a la detección;
- donde el agente de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente secundario se selecciona de entre (i) un anticuerpo anti-IgG4 o (ii) un anticuerpo anti-anti-VLA-4.
- 15 2. Procedimiento de la reivindicación 1, donde el sujeto se somete a un tratamiento para disminuir el nivel del anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en el sujeto si el nivel del anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 es superior al nivel predeterminado.
- 20 3. Procedimiento de la reivindicación 1, donde el nivel del anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 se analiza un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas después de la administración de un tratamiento.
4. Procedimiento de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde el tratamiento es una aféresis terapéutica seleccionada de entre intercambio de plasma, citoreducción, fotoféresis y adsorción selectiva, opcionalmente donde el tratamiento es un intercambio de plasma terapéutico.
- 25 5. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el nivel predeterminado es aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 30 o 20 µg/ml.
6. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 ó 5, donde el tratamiento se administra una vez por día o una vez cada dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas.
- 35 7. Aparato para analizar el nivel de un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en una muestra biológica, donde el aparato es un aparato de flujo lateral que comprende:
- 40 una zona de recepción de la muestra, una zona de marcaje y una zona de pruebas, donde la zona de pruebas está más abajo de la zona de recepción de la muestra y contiene un agente de captura asociado con un sustrato, donde el agente de captura se puede unir a un anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 en la muestra biológica para formar un complejo, y
- 45 la zona de marcaje está más arriba de la zona de recepción de la muestra y contiene uno o más agentes secundarios, donde dichos uno o más agentes secundarios son capaces de unirse al complejo que comprende el agente de captura y el anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4, y
- donde el agente de captura es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y el agente secundario se selecciona de entre (i) un anticuerpo anti-IgG4 o (ii) un anticuerpo anti-anti-VLA-4.
- 50 8. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o el aparato de la reivindicación 7, donde la unión del agente de captura al anticuerpo produce una señal detectable.
- 55 9. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 8, o el aparato de la reivindicación 7, donde la muestra biológica es sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido del cristalino, sudor, leche, ascitis, mucosidad, líquido sinovial, líquido peritoneal, exudados transdérmicos, exudados faríngeos, lavado broncoalveolar, aspiraciones traqueales, semen, mucosidad cervical, secreción vaginal, secreción uretral o líquido amniótico.
- 60

10. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 8-9, o el aparato de la reivindicación 7, donde el anticuerpo IgG4 humanizado anti-VLA-4 es natalizumab.
11. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 ó 8-10, donde el sujeto se trató con 5 natalizumab y se ha diagnosticado, o se sospecha que presenta, una infección de virus JC.
12. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 -6 ó 8-11, donde la unión del agente de captura es detectable en 30 minutos.



FIGURA 2

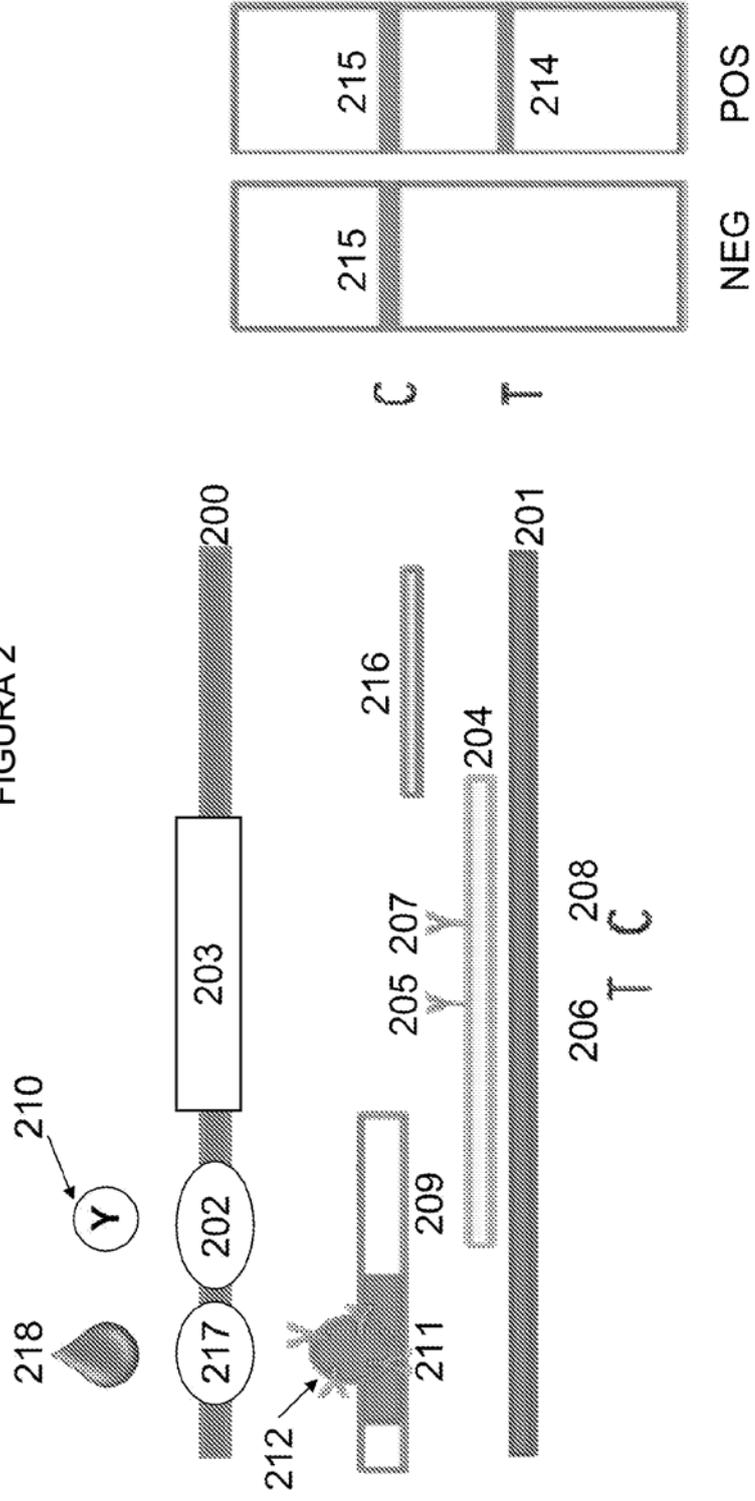


FIGURA 3

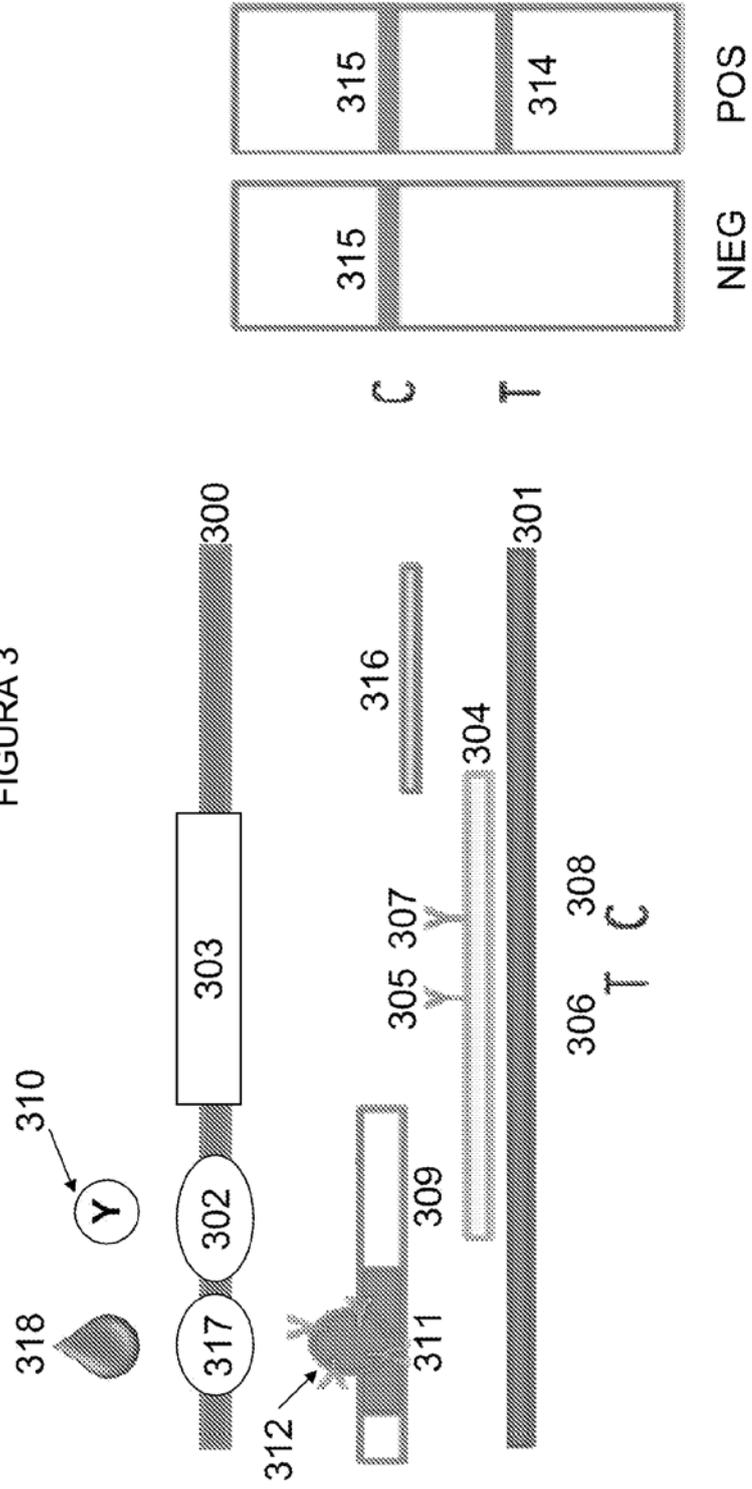


FIGURA 4

