

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 945**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012** **PCT/US2012/040283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012** **WO12166971**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012** **E 12792375 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2715352**

54 Título: **Procedimiento para valorar el riesgo de LMP**

30 Prioridad:

31.05.2011 US 201161491810 P
15.07.2011 US 201161508584 P
21.10.2011 US 201161550257 P
20.04.2012 US 201261636588 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SUBRAMANYAM, MEENA;
PLAVINA, TATIANA;
BLOOMGREN, GARY, LEWIS;
BOZIC, CARMEN y
LEE, SOPHIA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 729 945 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

Procedimiento para valorar el riesgo de LMP

5 Campo de la invención

La invención se refiere a procedimientos para valorar el riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

10 Antecedentes de la invención

El anticuerpo anti-VLA-4 (antígeno muy tardío 4) natalizumab terapéutico se prescribe para tratar formas recurrentes de Esclerosis Múltiple (EM) y enfermedad de Crohn moderada-grave. No obstante, el tratamiento con natalizumab está asociado a un mayor riesgo de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP), una infección cerebral oportunista provocada por el virus JC (VJC). La LMP se produce principalmente en individuos inmunocomprometidos y en pacientes que reciben ciertas terapias inmunomoduladoras, incluida natalizumab. Se cree que la LMP es el resultado de una interacción compleja entre huésped y factores virales, que producen la reactivación y mutación del arquetipo latente VJC a una forma neurotrófica que puede infectar los oligodendrocitos del sistema nervioso central. Sandroock y col., 2011. *Neurology*, 76 (9, supl. 4), A248) trata sobre la estratificación del riesgo de desarrollar LMP en pacientes de EM y sobre el papel del uso previo de inmunosupresores, sobre la duración del tratamiento con natalizumab y sobre el estado del anticuerpo anti-VJC. Gorelik y col., 2010. *Ann Neurol*, 68(3), 295-303 trata sobre anticuerpos anti-VJC y sobre las implicaciones para la estratificación del riesgo de desarrollar LMP. Subramanyam y col., 2011. *Neurology*, 76(9, supl. 4), A636-A637 trata sobre la detección de anticuerpos anti-VJC antes y después del diagnóstico de LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab. Warnke y col., 2010. *March Neurol*, (6788), 923-930 trata sobre los factores causales de natalizumab y LMP.

Resumen de la invención

En su sentido más amplio, la invención se refiere al tema tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La descripción se refiere, *inter alia*, a un ensayo optimizado, validado analíticamente y sensible para detectar la presencia de anticuerpos de VJC en un fluido biológico, p. ej., suero o plasma y a diversos procedimientos diferentes, incluidos los procedimientos para evaluar y/o tratar pacientes.

Por consiguiente, en un aspecto, la descripción describe un procedimiento para evaluar el nivel de anticuerpos anti-VJC en una muestra. El procedimiento comprende una o más o todas las siguientes etapas:

- (a) formar una primera mezcla de reacción que comprende una primera alícuota de muestra y un sustrato sobre el que se disponen HPVLP (partícula similar a virus altamente purificada, p. ej., partícula de VP1 altamente purificada), p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada;
- (b) detectar el nivel de anticuerpos anti-VJC unido a dicho sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada, p. ej., detectando un reactivo de detección marcado, p. ej., un anticuerpo anti-IgG marcado con enzimas, unido a un anticuerpo anti-VJC unido a dicho sustrato; evaluando de este modo el nivel de anticuerpos anti-VJC en una muestra (como se describe en el presente documento, el procedimiento puede comprender clasificar la muestra con, o asignar a la muestra, un valor indicativo del nivel de anticuerpos anti-VJC, y dicho valor a veces se denomina en el presente documento valor de índice. El valor se puede utilizar para evaluar la muestra o un paciente y, en algunos casos, para determinar si se ha de proceder con una etapa adicional del procedimiento, p. ej., la etapa (c) que se describe a continuación; y
- (c) formar una segunda mezcla de reacción que contiene una segunda alícuota de muestra y HPVLP en fase de disolución, y detectar el nivel de anticuerpos anti-VJC no unido en dicha segunda mezcla de reacción, tal como detectando un anticuerpo anti-VJC capaz de unirse a un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada (como se describe en el presente documento, el procedimiento puede comprender clasificar la muestra con, o asignar a la muestra, un valor indicativo del grado con el cual la incubación con HPVLP en fase soluble reduce el nivel de anticuerpos anti-VJC no unido en la segunda mezcla de reacción, y dicho valor a veces se denomina en el presente documento inhibición, % de inhibición, o similar. Este valor se puede utilizar para evaluar la muestra o un paciente), evaluando de este modo el nivel de anticuerpos anti-VJC en una muestra.

En un caso el procedimiento además comprende:

(d) formar una tercera mezcla de reacción que contiene una tercera alícuota en condiciones en las cuales los anticuerpos anti-VJC en la muestra no están unidos mediante HPVLP u otro antígeno, y detectar el nivel de anticuerpos anti-VJC en la tercera mezcla de reacción, tal como detectando un anticuerpo anti-VJC capaz de unirse a un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada.

5 La inhibición o % de inhibición se puede calcular como una función del grado en que la incubación con HPVLP en fase soluble (etapa (c)) reduce la cantidad de anticuerpo anti-VJC no unido, en comparación con el resultado de la etapa (d).

En un caso, el procedimiento comprende las etapas (a) y (b) y, opcionalmente, proporcionar los resultados a otra entidad, p. ej., un profesional sanitario.

10

En un caso, el procedimiento comprende las etapas (a), (b) y (c) y, opcionalmente, proporcionar los resultados a otra entidad, p. ej., un profesional sanitario.

15 En un caso, el procedimiento comprende las etapas (a), (b), (c) y (d) y, opcionalmente, proporcionar los resultados a otra entidad, p. ej., un profesional sanitario.

En un caso, el procedimiento comprende la etapa (c) y, opcionalmente, proporcionar los resultados a otra entidad, p. ej., un profesional sanitario.

20

En un caso, el procedimiento comprende las etapas (c) y (d) y, opcionalmente, proporcionar los resultados a otra entidad, p. ej., un profesional sanitario.

Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan niveles y cantidades de reactivos optimizados, lo cual hace posible un rendimiento mejorado. Por lo tanto, en un caso, para la primera mezcla de reacción, se disponen de 20 ng a 60 ng, de 30 ng a 50 ng, de 20 ng a 40 ng, de 35 ng a 45 ng de HPVLP en dicho sustrato. En un caso, se disponen alrededor de 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng o 60 ng de HPVLP en dicho sustrato. Normalmente, un dispositivo de múltiples sustratos, p. ej., una placa de múltiples pocillos, p. ej., una placa de múltiples pocillos de poliestireno, tendrá una cantidad de HPVLP determinada en el presente documento sobre cada uno de los múltiples sustratos. Un sustrato típico es el interior de un pocillo sobre una placa de múltiples pocillos.

25

30

Los procedimientos descritos en el presente documento utilizan relaciones de reactivos y muestra optimizados, lo cual hace posible un rendimiento mejorado. En un caso la relación de µl de muestra (esto se refiere a muestra no diluida, o a la cantidad de muestra en una dilución, por lo que 100 µl de una dilución 1 µl:100 µl sería 1 µl de muestra), p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato en la primera reacción es: entre 1: 100 y 1:20; 1:80 y 1:30; 1:60 y 1:20; 1:20 y 1: 60; 1:30 y 1:50. En un caso, la relación de µl de muestra, p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato es alrededor de: 1:30, 1:40, o 1:50. En un caso, la relación de µl de muestra, p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato es alrededor de: (0,08 a 1,2): 30, (0,08 a 1,2): 40, o (0,08 a 1,2): 50.

35

40

En un caso, la muestra, p. ej., suero, para la primera reacción se diluye, tal como aproximadamente 100 veces, en tampón, por ejemplo, antes de entrar en contacto con el sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada. En un caso, la detección es con un anticuerpo marcado con enzimas, p. ej., una IgG marcada con enzimas, tal como una IgG con HRP (peroxidasa de rábano picante). En otro caso, se añade el reactivo de detección, p. ej., una IgG marcada con HRP, con una concentración de al menos 0,01 µg/mL, 0,02 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,04 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,06 µg/mL, o 0,08 µg/mL. En un caso, el reactivo de detección se proporciona con un exceso de 10x a 100x respecto del anticuerpo unido al sustrato. En un caso, el reactivo de detección se proporciona en una cantidad que proporciona un exceso igual o superior a 10x, 20x, 50x, 75x o 100x) en comparación con el anticuerpo unido al sustrato.

45

50

En un caso, la HPVLP en fase de disolución en (c) está presente con 2x a 100x partículas de exceso respecto del anticuerpo anti-VJC en la segunda mezcla de reacción o muestra. En un caso, el exceso de partículas respecto del anticuerpo anti-VJC en la segunda mezcla de reacción o muestra es igual o mayor que 2x, 4x, 5x, 10x, 15x, 20x, 40x, 50x, 70x, 80x, 100x o 110x.

55

En un caso, para la segunda mezcla de reacción, se disponen de 20 ng a 60 ng, de 30 ng a 50 ng, de 20 ng a 40 ng, de 35 ng a 45 ng de HPVLP en dicho sustrato. En un caso, se disponen alrededor de 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng o 60 ng de HPVLP en dicho sustrato. Normalmente, un dispositivo de múltiples sustratos, p. ej., una placa de múltiples pocillos, p. ej., una placa de múltiples pocillos de poliestireno, tendrá una cantidad de HPVLP determinada en el presente documento sobre cada uno de los múltiples sustratos. Un sustrato típico es el interior de un pocillo sobre

60

una placa de múltiples pocillos.

En un caso, para la segunda mezcla de reacción, la muestra se pone en contacto con la HPVLP en fase soluble y, a continuación, se permite que el anticuerpo anti-VJC no unido se una a una HPVLP dispuesta sobre un sustrato. En un caso, para la segunda mezcla de reacción, la muestra está simultáneamente en contacto con la HPVLP en fase soluble y con la HPVLP dispuesta sobre un sustrato.

En un caso la relación de μl de muestra (esto se refiere a muestra no diluida, o a la cantidad de muestra en una dilución, por lo que 100 μl de una dilución 1 μl :100 μl sería 1 μl de muestra), p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato es: entre 1: 100 y 1:20; 1:80 y 1:30; 1:60 y 1:20; 1:20 y 1: 60; 1:30 y 1:50. En un caso, la relación de μl de muestra, p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato es alrededor de: 1:30, 1:40, o 1:50. En un caso, la relación de μl de muestra, p. ej., suero o plasma, respecto de ng de HPVLP dispuestas sobre el sustrato es alrededor de: (0,08 a 1,2): 30, (0,08 a 1,2): 40, o (0,08 a 1,2): 50.

En un caso, la muestra, p. ej., suero, se diluye, tal como alrededor de 100 veces en, por ejemplo, tampón, antes de entrar en contacto con el sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada. En un caso, la detección es con un anticuerpo marcado con enzimas, p. ej., una IgG marcada con enzimas, tal como una IgG con HRP. En otro caso, se añade el reactivo de detección, p. ej., una IgG marcada con HRP, con una concentración de al menos 0,01 $\mu\text{g/mL}$, 0,02 $\mu\text{g/mL}$, 0,03 $\mu\text{g/mL}$, 0,04 $\mu\text{g/mL}$, 0,05 $\mu\text{g/mL}$, 0,06 $\mu\text{g/mL}$, o 0,08 $\mu\text{g/mL}$. En un caso, el reactivo de detección se proporciona con un exceso de 10x a 100x respecto del anticuerpo unido al sustrato. En un caso, el reactivo de detección se proporciona en una cantidad que proporciona un exceso igual o superior a 10x, 20x, 50x, 75x o 100x en comparación con el anticuerpo unido al sustrato.

En un caso, se llevan a cabo las etapas (c) y/o (d) en respuesta al nivel de anticuerpos anti-VJC detectado en la etapa (b).

En un caso, en respuesta al nivel de anticuerpos anti-VJC detectado en la etapa (b), p. ej., el nivel de índice (DON) es $>0,2$ y es $<0,4$, a continuación se llevan a cabo las etapas (c) y (d).

En un caso, la muestra, p. ej., suero o plasma, se diluye, tal como en una cantidad igual o mayor que alrededor de 50, 100 o 150 veces en, p. ej., tampón, antes de formar dicha segunda mezcla de reacción. En otro caso, la muestra, p. ej., suero o plasma, se diluye, tal como en una cantidad igual o mayor que alrededor de 50 veces, 100 veces o 150 veces en, p. ej., tampón antes de formar dicha tercera mezcla de reacción. En otro caso, la detección de una o las dos mezclas de reacción segunda y tercera es con un anticuerpo marcado con enzimas, p. ej., una IgG marcada con enzimas, p. ej., una IgG marcada con HRP.

La detección de una o las dos mezclas de reacción segunda y tercera puede ser mediante una IgG marcada con HRP, añadida con una concentración de al menos 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, o 0,08 $\mu\text{g/mL}$. En un caso, el reactivo de detección se proporciona con un exceso de 10x a 100x (p. ej., 10x, 20x, 50x, 75x o 100 x) en comparación con el anticuerpo unido al sustrato.

En un caso, evaluar el nivel de anticuerpos anti-VJC en una muestra además incluye evaluar un estándar, tal como un calibrador de corte que tiene, p. ej., un índice de alrededor de 1 (p. ej., una densidad óptica de 1, donde un control positivo tiene una densidad óptica de 1,3 y un control negativo tiene una densidad óptica de 0,1) y una relación señal a ruido igual o mayor que 15x a 20x (p. ej., igual o mayor que 16x, 17x, 18x, o 19x), en la etapa b. Otro caso incluye evaluar un estándar, p. ej., un control positivo, que tiene, por ejemplo, una puntuación de alrededor de 1,3, en la etapa b. En otros casos, el procedimiento además incluye evaluar un estándar, tal como un control negativo, que tiene, p. ej., una puntuación de alrededor de 0,1, en la etapa b.

En un caso, el procedimiento incluye determinar la cantidad con la cual la unión a dichas partículas HPVLP en fase soluble inhibe o reduce la unión a las partículas HPVLP dispuestas sobre sustrato en comparación con la unión a partículas HPVLP dispuestas sobre sustrato en dicha primera alícuota. Los resultados de la primera etapa del ensayo de dos etapas (etapas (a) y (b) mencionadas) normalmente se expresan como un valor de DO normalizada (DON, o «índice»). Los resultados de la segunda etapa del ensayo de dos etapas (etapas (c) y opcionalmente (d) mencionadas) normalmente se expresan como «porcentaje de inhibición». En un caso, la DON es DO_{450} . En un caso, dicha inhibición es menor o igual que un valor predeterminado, p. ej., 45 %, y dicha muestra se clasifica como negativa.

En un caso, dicha inhibición es mayor que un valor predeterminado, p. ej., 45 %, y dicha muestra se clasifica como positiva.

En un caso, se ajusta un librador de corte (CO, por su sigla en inglés) para tener un índice de reactividad (DON) de alrededor de 1,0, y se ajusta un control positivo (CP) para tener un índice de reactividad de alrededor de 1,3. Las disoluciones de CO y CP se consiguen mezclando un suero positivo para anticuerpos de VJC con un suero que es negativo para anticuerpos de VJC. Para el control negativo (CN), que puede ser, por ejemplo, un frasco de sueros negativos para anticuerpos anti-VJC, el índice (DON) meta es alrededor de 0,1.

En un caso, el antígeno de VJC es una partícula VLP, tal como una HPVLP que está purificada cromatográficamente antes de su uso en un ensayo descrito en la descripción.

En ciertos casos, la muestra es una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de plasma, una muestra de sangre o una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR). En un caso, la muestra es una muestra de suero diluido 1:101 antes de formar la primera mezcla de reacción que comprende una primera alícuota de la muestra y el sustrato sobre el cual se disponen las HPVLP.

En otro caso, el reactivo de detección secundario (p. ej., una IgG anti-humana) se conjuga con un agente detectable, tal como una peroxidasa, tal como HRP. En un caso, el reactivo de detección secundario puede ser IgG anti-humana, donde la IgG anti-humana se conjuga con HRP. En otro caso, la disolución de reactivo de detección que contiene IgG-HRP se utiliza a 0,04 µg/mL. Por ejemplo, una disolución madre de 0,8 mg/mL de IgG-HRP se diluye 1:15.000, 1:20.000, 1:30.000 o más, antes de su uso en el ensayo para detectar el nivel de anticuerpo anti-VJC unido a HPVLP. En otro caso, se ajusta la concentración del reactivo de detección secundario para que la señal de los lotes nuevos coincida con la del lote previo y el tiempo de incubación con el conjugado es solo de 30 minutos. En un caso, se incuban TMB (tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno en tampón con la mezcla de reacción que contiene la mezcla de IgG-HRP unida al anticuerpo anti-VJC durante 20 minutos, $\pm$ 2 minutos.

En un caso, una disminución en el nivel detectado en la muestra del ensayo secundario en comparación con la muestra que no fue preincubada indica que la muestra es positiva para anticuerpo anti-VJC, y un cambio en el nivel detectado por debajo de un porcentaje determinado indica que no hay anticuerpo específico de VJC presente en la muestra.

En un caso, se determina que la muestra tiene un valor de índice (es decir, valor DON) $>0,2$ y $<0,4$ (la «zona no determinante») después de la primera etapa del ensayo, que es la formación de una primera mezcla de reacción que comprende una primera alícuota de muestra y un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada, y detectar el nivel de anticuerpo anti-VJC unido a dicho sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada. A continuación, se puede analizar una segunda alícuota de la muestra en la segunda etapa del ensayo, que comprende la formación de una segunda mezcla entre la segunda alícuota y una HPVLP en fase de disolución antes de detectar un anticuerpo anti-VJC no unido en la segunda mezcla poniendo en contacto la segunda mezcla con un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada.

En otro caso, si se determina que la muestra tiene un valor de índice $<0,2$ después de la primera etapa del ensayo, entonces se determina que la muestra es negativa para anticuerpos anti-VJC. En un caso, una muestra determinada como negativa para anticuerpos anti-VJC no se evalúa utilizando la segunda etapa del ensayo.

En otro caso, si se determina que la muestra tiene un valor de índice $>0,4$ después de la primera etapa del ensayo, entonces se determina que la muestra es positiva para anticuerpos anti-VJC. En un caso, una muestra determinada como positiva para anticuerpos anti-VJC no se evalúa utilizando la segunda etapa del ensayo.

En un caso, la descripción comprende obtener una muestra biológica de un sujeto (p. ej., plasma, suero, sangre, orina o líquido cefalorraquídeo (LCR)); y correlacionar el nivel detectado con una referencia, de modo que la referencia sea seleccionada para indicar una tasa de falsos negativos no superior a 3 % y reactividad cruzada mínima a otros virus de polio, p. ej., virus BK (VBK). En algunos casos, la referencia, derivada de una muestra de control o conjunto de muestras se procesa con la muestra del sujeto. En algunos casos, la referencia se selecciona de modo que la tasa de falsos negativos del ensayo no sea superior a 1 %. El ensayo se puede llevar a cabo de modo que la HPVLP se disponga sobre un sustrato sólido tal como una placa de microtitulación o portaobjetos. En algunos casos, la HPVLP consiste esencialmente en una proteína viral VP1. La HPVLP puede incluir además otras proteínas virales, por ejemplo, al menos una de VP2 o VP3. La(s) proteína(s) viral(es) en la HPVLP se pueden derivar por vía recombinante (p. ej., una VP1 de la cepa MAD1) o pueden ser una o más proteínas virales de origen natural (p. ej., derivadas de una fuente de origen natural). El procedimiento puede realizarse mediante el uso, por ejemplo, de una muestra biológica obtenida de un sujeto que está siendo tratado con un fármaco inmunomodulador,

un sujeto que está considerando iniciar un tratamiento con un fármaco inmunomodulador, o un sujeto sospechoso de sufrir Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

En otro aspecto, la descripción describe un kit que contiene un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada. El sustrato puede incluir una placa de múltiples paredes tal como una placa de 96 pocillos. En un caso, el kit incluye uno o más o todos los siguientes: un sustrato, tal como una placa con pocillos revestidos con sustrato de antígeno de VJC, p. ej., HPVLP; un antígeno de VJC, p. ej., HPVLP, liofilizado o en disolución; un calibrador de corte de VJC, un control positivo para anticuerpo anti-VJC y un control negativo de VJC, que sean muestras de suero, tal como suero humano. En un caso, el kit incluye, o además incluye uno de más reactivos para detectar un complejo que contiene anticuerpos anti-VJC unidos a antígeno, y los reactivos incluyen, por ejemplo, un conjugado de VJC, una muestra de caseína, un reactivo detectable, tal como TMB (tetrametilbencidina), un tampón de lavado y un reactivo de detención.

En otro aspecto, la descripción describe un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, p. ej., un sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada.

En otro aspecto, la descripción describe un kit que comprende una HPVLP y al menos un reactivo para llevar a cabo un ensayo con el objeto de identificar un nivel de anticuerpo anti-VJC en una muestra, tal como una muestra biológica.

En otros aspectos, la descripción se refiere a una disolución que comprende partículas HPVLP, que consisten esencialmente en partículas que contienen VP1 que tienen mayor tamaño que un pentámero VP1 (capsómero), p. ej., que contienen alrededor de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 o 72 pentámeros o que contienen alrededor de 360 moléculas de VP1.

Otro aspecto de la descripción es un procedimiento para preparar una solución de HPVLP, el procedimiento comprende eliminar las partículas que contienen VP1 de la solución que sean del tamaño de un pentámero VP1 o menores.

Los procedimientos descritos en el presente documento están basados, al menos en parte, en el descubrimiento de que la titulación de anticuerpos anti-VJC y otras características tales como afinidad/avidez pueden ser indicadores del riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción describe un procedimiento para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP, que comprende averiguar una titulación de anticuerpos de virus JC (VJC) (p. ej., determinada como se describe en el presente documento y expresada como densidad óptica normalizada (DON) o índice) o afinidad/avidez (p. ej., conforme se determina como se describe en el presente documento y expresada como porcentaje de inhibición en la etapa de confirmación del ensayo) en una muestra del paciente y, opcionalmente, comparar el valor o valores averiguados con una referencia descrita en el presente documento para, de este modo, evaluar el riesgo.

En un caso, una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC se determina en una muestra biológica de un paciente, tal como sangre (suero o plasma), o muestra de LCR.

Si se determina que la titulación y/o porcentaje de inhibición, o una función de ambos valores está por debajo de un nivel predeterminado, se determina que el paciente tiene menor riesgo de desarrollar LMP, y si se determina que la titulación y/o porcentaje de inhibición, o una función de ambos valores, está en o por encima del nivel predeterminado se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP.

El procedimiento además puede indicar que determinar la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC en una muestra del paciente requiere extraer una muestra biológica del cuerpo del paciente o analizar una muestra del paciente, o que si se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP, se administre una terapia tal como una terapia inmunosupresora al paciente.

En un caso, una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC se determina en más de una muestra biológica de un paciente, tal como una o más de una muestra de sangre (suero o plasma), o muestra de LCR.

En un caso, el sujeto padece esclerosis múltiple, p. ej., un paciente con esclerosis múltiple que ya está recibiendo terapia con un anticuerpo anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

En un caso, se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP, y al paciente también se le

administra una terapia anti-VLA-4, tal como un anticuerpo anti-VLA-4, tal como natalizumab, o un fragmento del mismo (tal como un fragmento de unión a antígeno del mismo).

En un caso, se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, y se identifica al paciente como un paciente que debería recibir una terapia alternativa, p. ej., el paciente debería dejar de recibir terapia con anticuerpo anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, y, p. ej., recibir una terapia alternativa, p. ej., una terapia alternativa para esclerosis múltiple (EM) aprobada tal como Avonex®. En otro caso, se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, y se le administra al paciente una terapia de anticuerpos anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

- 10 En un caso, se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP de acuerdo con la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC, y se identifica al paciente como candidato a someterse a pruebas adicionales para determinar el riesgo de desarrollar LMP.

En un caso, se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $<0,5$, o (ii) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y $<3,0$, y se determina que el porcentaje de inhibición es inferior o igual a 70 % o 60 %. Se determina que el paciente presenta un riesgo intermedio de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y $<1,5$, y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %. Se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %, o (ii) el paciente mostró un aumento de índice, DON o titulación de dos veces respecto de una prueba previa. El porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC se puede medir, por ejemplo, como se indica a continuación: (i) poniendo en contacto una muestra biológica del sujeto con HPVLP en una disolución en condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo anti-VJC en la muestra a una HPVLP; (ii) separando los anticuerpos de VJC unidos a HPVLP de la disolución para crear una muestra secundaria; (iii) poniendo en contacto la muestra secundaria con HPVLP en las mismas condiciones que (i); y (iv) detectando el nivel de anticuerpo anti-VJC que se une a HPVLP en la muestra secundaria.

- 30 En un caso, la titulación de anticuerpos anti-VJC se mide, p. ej., (i) poniendo en contacto la muestra biológica con HPVLP en condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo anti-VJC en la muestra con una HPVLP; (ii) detectando el nivel de anticuerpo anti-VJC que se une en la muestra a HPVLP; y (iii) correlacionando el nivel detectado con un conjunto de referencia. El conjunto de referencia se puede seleccionar para indicar una tasa de falsos negativos no mayor que una cantidad predeterminada, tal como 3 %. En otro caso, la titulación de anticuerpos anti-VJC se mide mediante una plataforma comercial, tal como un ensayo VIDAS® (bioMérieux), u otra plataforma alternativa, tal como un procedimiento en fase de disolución o un procedimiento de flujo lateral.

En un caso, el ensayo indica que la muestra biológica no contiene anticuerpos de VJC, y el ensayo además incluye: (iv) poner en contacto una porción de la muestra biológica del sujeto con HPVLP en una disolución antes de la etapa (i) y donde la HPVLP de la etapa (i) se fija en un sustrato sólido, tal como para proporcionar una muestra secundaria; (v) poner en contacto la muestra secundaria con HPVLP en las mismas condiciones que (i); (vi) detectar el nivel de unión de anticuerpo anti-VJC a HPVLP en la muestra secundaria; y (vii) comparar el nivel detectado de anticuerpo anti-VJC en la muestra secundaria con el nivel de unión en la muestra biológica cuando se incubaba con la disolución sin HPVLP. Una disminución en el nivel detectado en la muestra preincubada con HPVLP en comparación con la muestra incubada en disolución indica que la muestra es positiva para un anticuerpo anti-VJC, y la no variación en el nivel detectado indica que el anticuerpo anti-VJC no está presente por encima de los niveles de fondo en la muestra.

En un caso, el ensayo indica que la muestra biológica contiene anticuerpos de VJC, y se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP.

- 50 Incluso en otro caso, se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $<0,5$, o (ii) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y $<3,0$, y se determina que el porcentaje de inhibición es inferior o igual a 70 %. Se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es >3 y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %, o (ii) el paciente mostró un aumento de índice, DON o titulación de dos veces respecto de una prueba previa.

En un caso, únicamente el valor de índice (DON) o el porcentaje de inhibición se utiliza para determinar el riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, en un caso, se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP si

se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DOn es $<0,5$, se determina que el paciente presenta mayor riesgo si la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DOn es $>0,5$ y $<1,5$, o se determina que el paciente presenta un riesgo incluso mayor si la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DOn es $>1,5$.

5

En un caso, el ensayo indica que la muestra biológica no contiene anticuerpos de VJC por encima de un nivel de fondo, y se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para evaluar o analizar un procedimiento de ensayo.

- 10 Un ensayo de anticuerpos anti-VJC se puede volver a evaluar para determinar su eficacia en un intervalo predeterminado, tal como cada 6 meses o una vez al año. En un ensayo de competencias ejemplar, se proporciona un conjunto de muestras, p. ej., 30, 40 o 50 muestras de suero y 30, 40 o 50 muestras de plasma para ser evaluadas mediante el procedimiento optimizado actual y mediante un procedimiento previo de generación anterior. Se valora la coincidencia de los resultados y si se observa que la coincidencia es superior a, p. ej., 90 % o 95 %, se puede
- 15 determinar que el rendimiento del ensayo es aceptable. En un caso, se utiliza un panel de muestras que contiene, p. ej., 90, 100, 150 o más muestras, con estado de anticuerpo anti-VJC conocido para valorar la coherencia en el rendimiento de los ensayos en el tiempo. Se valora la coincidencia de los resultados y si se observa que la coincidencia es superior, por ejemplo, a 90 % o 95 %, se puede determinar que el rendimiento del ensayo es aceptable. El panel de muestras consiste en sueros de pacientes disponibles en volúmenes suficientes como para
- 20 crear un banco de muestras.

En un aspecto, una entidad, p. ej., un profesional sanitario, averigua información que proviene de un ensayo de anticuerpos anti-VJC descrito en el presente documento y, en respuesta a la información, administra un tratamiento descrito en el presente documento al paciente, p. ej., un paciente de EM.

25

En otro aspecto, un ensayo de VJC descrito en el presente documento se lleva a cabo en un paciente y, a continuación, se trata al paciente, p. ej., se trata al paciente de EM de acuerdo con los resultados del ensayo.

- La titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC en un paciente se puede volver a evaluar a intervalos regulares, tal como cada 3 meses, cada 6 meses o cada 12 meses, o a intervalos más prolongados o más breves.
- 30 Un aumento observado en titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos puede indicar un aumento en el riesgo del paciente de desarrollar LMP. Por ejemplo, un aumento de 2 o 3 veces en la titulación de anticuerpos (DOn o índice) puede indicar un mayor riesgo de desarrollar LMP. Un paciente que recibe una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, puede interrumpir la terapia con la terapia anti-VLA-4 y, opcionalmente, comenzar una terapia con un
- 35 agente alternativo, p. ej., una terapia inmunosupresora que no sea una terapia anti-VLA-4, o que no sea natalizumab. Un aumento en la titulación puede manifestarse de manera diferente en pacientes que tienen una titulación de referencia elevada (p. ej., con un margen más estrecho en intervalo de titulación) que en pacientes que tienen una titulación de referencia baja.

- 40 En un caso, un paciente que recibe un anticuerpo anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, puede ser monitorizado, p. ej., cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, quince, veinte, treinta, cuarenta meses para determinar la titulación y/o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC.

- En un caso, un paciente no se vuelve a evaluar para determinar la presencia de anticuerpos de VJC o para titulación
- 45 o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC en una o dos o tres semanas después de haber recibido plasmáferesis. En otro caso, un paciente no se vuelve a evaluar para determinar la presencia de anticuerpos de VJC o para titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC a la una o dos o tres semanas de haber recibido tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IGIV).

- 50 La medida de titulación de anticuerpos anti-VJC puede ser en términos de DOn o de un valor de índice.

La evaluación de un paciente como se describe en el presente documento se puede llevar a cabo antes de la administración de una terapia anti-VLA-4, o después de que el paciente haya iniciado una terapia anti-VLA-4.

- 55 En un caso, se determina que un paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP, tal como mediante un ensayo descrito en el presente documento, y se le administra al paciente una terapia anti-VLA-4. En otro caso, se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, y se le administra al paciente una terapia anti-VLA-4, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4 tal como natalizumab. Incluso en otro caso, se determina que el paciente presenta tiene mayor riesgo de desarrollar LMP y se le administra al paciente una terapia que no sea una terapia anti-VLA-4, tal
- 60 como un interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide.

En un caso, se determina que el paciente presenta un riesgo aumentado de desarrollar LMP, y el paciente, en consecuencia, deja de recibir una terapia anti-VLA-4.

- 5 Se puede monitorizar al paciente a intervalos regulares, p. ej., cada 3 meses, cada 6 meses, una vez al año o con mayor o menor frecuencia, para determinar una disminución en la titulación de anticuerpos anti-VJC o una disminución en porcentaje de inhibición de anticuerpos de VJC. Una disminución en la titulación de anticuerpos anti-VJC o una disminución en el porcentaje de inhibición de anticuerpos de VJC puede indicar que el paciente tiene un riesgo disminuido de desarrollar LMP.

10

- En un caso, se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC o el porcentaje de inhibición de anticuerpos de VJC ha disminuido por debajo de un nivel predeterminado, incluso después de haber aumentado, por lo que al paciente se le puede administrar un tratamiento con una terapia anti-VLA-4 o se puede determinar que el paciente es candidato a recibir dicho tratamiento. Si el paciente recibió previamente una terapia anti-VLA-4, entonces es posible restablecer dicha terapia del paciente. Después de restablecer la terapia anti-VLA-4, se puede evaluar al paciente cada 6 meses o una vez al año para determinar una disminución en la titulación de anticuerpos o una disminución en el porcentaje de inhibición de los anticuerpos de VJC.

- 20 En un caso, después de que se determinó que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, p. ej., se determinó que el paciente tiene una titulación de anticuerpos anti-VJC medida mediante DOn de $>0,5$, p. ej., $>1,0$ o $>1,5$, entonces no se vuelve a analizar el estado de VJC del paciente. Por ejemplo, el paciente puede interrumpir el tratamiento con una terapia anti-VLA-4 tal como natalizumab, y no se vuelve a analizar el estado de anticuerpo anti-VJC.

- 25 En un caso, un procedimiento para evaluar un paciente conforme se describe en el presente documento, tal como para determinar una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC, también puede incluir evaluar otras medidas de indicadores de riesgo. Por ejemplo, un procedimiento para evaluar un paciente además puede incluir: (a) determinar si el paciente ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 (p. ej., más de 24 meses); o (b) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada (p. ej., mitoxantrona u otras terapias en los últimos 2, 3, 5 años o alguna vez durante la vida del paciente). El riesgo relativo de desarrollar LMP para un paciente que tiene una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por encima de un nivel predeterminado pero que no ha usado previamente inmunosupresores determinados y no ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 es menor que el riesgo relativo de un paciente que tiene una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por debajo de un nivel predeterminado y que ha usado previamente inmunosupresores determinados o ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4, el cual es inferior al riesgo relativo de un paciente que tiene una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por encima de un nivel predeterminado y que ha usado previamente inmunosupresores determinados y ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4.

- 40 En un caso, el paciente recibió previamente una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, y en otro caso, al paciente se le administró una terapia anti-VLA-4 de acuerdo con una evaluación, p. ej., una evaluación de titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC. Por ejemplo, como resultado de la evaluación, el paciente puede ser clasificado como candidato para terapia anti-VLA-4. En un caso, a un paciente clasificado como candidato para terapia anti-VLA-4 además se le administra la terapia.

45

En algunos casos, los factores que se han de incluir en el modelo de estratificación son la edad y género del paciente.

- 50 El procedimiento descrito en el presente documento puede incorporar uno o más factores en la evaluación del paciente. Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción se refiere a un procedimiento para evaluar un paciente, p. ej., como candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4.

- El procedimiento incluye, por ejemplo, obtener o determinar una titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos de virus JC (VJC) en una muestra biológica del paciente, p. ej., mediante un procedimiento descrito en el presente documento. Si se determina que la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos está por debajo de un nivel predeterminado, entonces el paciente puede ser clasificado como adecuado para ser tratado con una primera categoría de terapia, tal como una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. Si se determina que la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos está en un nivel predeterminado o por encima de dicho nivel, se clasifica al paciente como adecuado para una segunda categoría de terapia, p. ej., interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide. Averiguar una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC en una muestra de un

60

paciente puede incluir extraer una muestra biológica del cuerpo del paciente o analizar una muestra del paciente. El procedimiento de evaluación también puede incluir administrar al paciente una terapia, tal como de la primera categoría (p. ej., natalizumab) o de la segunda categoría (p. ej., interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide).

5

Incluso en otro caso, se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $<0,5$, o (ii) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y $<3,0$, y se determina que el porcentaje de inhibición es inferior o igual a 70 %. Se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>1,5$ y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %, o (ii) el paciente mostró un aumento de índice, DON o titulación de dos veces respecto de una prueba previa. Se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es $>0,5$ y $<1,5$, y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %.

10

15

Como se explicó anteriormente, los procedimientos para evaluar un paciente pueden incorporar más de una consideración o factor. Por lo tanto, los procedimientos para evaluar un paciente además pueden incluir:

20 (aa) determinar si el paciente ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 (p. ej., durante más de 24 meses) y en algunos casos proporcionar una clasificación de exposición previa a la terapia anti-VLA-4; o

(bb) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada (p. ej., en los últimos 2, 3, 5 años o alguna vez durante la vida del paciente) y en algunos casos proporcionar una clasificación de exposición previa a inmunosupresores.

25

Normalmente, un paciente que tiene una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por encima de un nivel predeterminado pero que no ha usado previamente inmunosupresores determinados y no ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 es clasificado como de menor riesgo de desarrollar LMP que el riesgo relativo de un paciente que tiene una titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por debajo de un nivel predeterminado y que ha usado previamente inmunosupresores determinados o ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4, el cual es inferior al riesgo relativo de un paciente que tiene una titulación o un porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC por encima de un nivel predeterminado y que ha usado previamente inmunosupresores determinados y ha recibido tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4

30

35

En un caso, el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4. En otro caso, el procedimiento incluye administrar al paciente una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

40 En un caso, el paciente es clasificado como candidato para terapia anti-VLA-4 y además se le administra la terapia anti-VLA-4.

Los pacientes que han recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos, que no han recibido previamente una terapia inmunosupresora (distinta de terapia anti-VLA-4), y que hayan dado negativo para exposición a VJC (p. ej., negativo para anticuerpos de VJC) normalmente presentan el menor riesgo de desarrollar LMP. A la inversa, los pacientes que han recibido terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, que han recibido previamente una terapia inmunosupresora (distinta de terapia anti-VLA-4), y que hayan dado positivo para exposición a VJC (p. ej., positivo para anticuerpos de VJC) normalmente presentan el mayor riesgo de desarrollar LMP.

45

50

El nivel de riesgo de un paciente de desarrollar LMP se puede valorar evaluando uno o cualesquiera dos o los tres factores de riesgo identificados. Por ejemplo, se puede determinar que un paciente, p. ej., un paciente con esclerosis múltiple (EM) que da negativo para titulación de anticuerpos anti-VJC tiene menor riesgo de desarrollar LMP. Un paciente con menor riesgo de desarrollar LMP puede tener un riesgo de menos de alrededor de 0,2/1.000 pacientes, p. ej., $\leq 0,11/1.000$.

55

En un caso, se puede determinar que un paciente, p. ej., un paciente con EM, que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos (p. ej., durante 23 meses, 22 meses, 20 meses, 15 meses, 12 meses, 6 meses, 1 mes o menos), y que no ha recibido previamente una terapia inmunosupresora puede presentar menor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de

60

desarrollar LMP de alrededor de 0,54/1.000 pacientes. Por consiguiente, se puede determinar que el paciente es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante más de 24 meses, tal como durante alrededor de 25 a 48 meses o más (p. ej., 26, 28, 30, 36, 40 o 48 meses o más), y que no ha recibido previamente una terapia inmunosupresora presenta mayor riesgo de desarrollar LMP o se clasifica como con mayor riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Un paciente con mayor riesgo de desarrollar LMP puede tener un riesgo de $\geq$ alrededor de 3,7/1.000 pacientes, p. ej., alrededor de 1,37/1.000 pacientes. Por consiguiente, se puede determinar que el paciente es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos (p. ej., durante 24 meses, 22 meses, 20 meses, 15 meses, 12 meses, 6 meses, 1 mes o menos), y que se ha determinado negativo para anticuerpos anti-VJC, o ácido nucleico de VJC, presenta menor riesgo de desarrollar LMP o se clasifica como con menor riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de $\leq$ 0,2/1.000 pacientes. Por consiguiente, se puede determinar que el paciente es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab.

En un caso, se determina que un paciente que no ha recibido tratamiento previo con un inmunosupresor (distinto de una terapia anti-VLA-4), y que se ha determinado negativo para VJC, presenta menor riesgo de desarrollar LMP, p. ej., $\leq$ 0,2/1.000 pacientes. Por consiguiente, se puede determinar que el paciente es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante más de 24 meses (p. ej., durante 25 meses, 26 meses, 28 meses, 30 meses, 35 meses, 38 meses, 40 meses, 48 meses o más), y que ha recibido previamente una terapia inmunosupresora distinta de una terapia anti-VLA-4, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Un paciente con mayor riesgo de desarrollar LMP puede presentar un riesgo de alrededor de 0,37/1.000 pacientes o mayor, p. ej., alrededor de 4,3/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente. Por ejemplo, un paciente con mayor riesgo de desarrollar LMP que recibe terapia con una terapia anti-VLA-4 puede recibir monitorización más frecuente en términos de desarrollo de LMP que un paciente con menor riesgo de desarrollar LMP.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos (p. ej., durante 24 meses, 22 meses, 20 meses, 15 meses, 12 meses, 6 meses, 1 mes o menos), y que ha recibido previamente una terapia inmunosupresora distinta de una terapia anti-VLA-4, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de desarrollar LMP de 0,66/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente. Por ejemplo, un paciente con mayor riesgo de desarrollar LMP que recibe terapia con una terapia anti-VLA-4 puede recibir monitorización más frecuente en términos de desarrollo de LMP que un paciente con menor riesgo de desarrollar LMP.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante más de 24 meses (p. ej., durante 25 a 48 meses, tal como 26, 30, 36, 42 o 48 meses o más), y que se ha determinado positivo para VJC presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante más de 24 meses (p. ej., durante 25 a 48 meses, tal como 26, 30, 36, 42 o 48 meses o más), y que no ha recibido previamente un inmunosupresor (distinto de una terapia anti-VLA-4), y que se ha determinado positivo para VJC, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente tiene un riesgo de desarrollar LMP de 4/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

En un caso, se puede determinar que un paciente, p. ej., un paciente de EM, que ha recibido tratamiento previo con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4, y que se ha determinado positivo para anticuerpos anti-VJC, o ácido nucleico de VJC, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido tratamiento previo con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4, y que se ha determinado positivo para anticuerpos anti-VJC, o ácido nucleico de VJC, y que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante más de 24 meses (p. ej., durante 25 a 48 meses, tal como 26, 30, 36, 42 o 48 meses o más) presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de 9,8/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos (p. ej., durante 24 meses, 22 meses, 20 meses, 15 meses, 12 meses, 6 meses, 1 mes o menos), y que ha recibido tratamiento previo con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4, y que se ha determinado positivo para VJC, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de desarrollar LMP de 4,5/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

En un caso, se puede determinar que un paciente que ha recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos (p. ej., durante 24 meses, 22 meses, 20 meses, 15 meses, 12 meses, 6 meses, 1 mes o menos), y que no ha recibido tratamiento previo con un inmunosupresor (distinto de una terapia anti-VLA-4), y que se ha determinado positivo para VJC, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. Por ejemplo, se puede determinar que el paciente presenta un riesgo de desarrollar LMP de 0,35/1.000 pacientes. En consecuencia, se puede determinar que el paciente no es candidato a recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, o se puede determinar que es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 acompañada de monitorización más frecuente.

Se puede determinar que un paciente para quien se ha determinado un riesgo menor de desarrollar LMP presenta un riesgo de $\leq$ alrededor de 0,54/1.000 pacientes, p. ej., $\leq$ 0,25/1.000, $\leq$ 0,2/1.000, 0,19/1.000, $\leq$ 0,15/1.000, $\leq$ 0,11/1.000, $\leq$ 0,1/1.000, p. ej., 0,3/1.000, 0,25/1.000, 0,2/1.000, 0,19/1.000, 0,15/1.000, 0,11/1.000, o 0,1/1.000 o inferior. Se puede determinar que un paciente para quien se ha determinado un riesgo mayor de desarrollar LMP presenta un riesgo de alrededor de 0,54/1.000 o más, p. ej., alrededor de 0,55/1.000, alrededor de 0,60/1.000, alrededor de 0,66/1.000, alrededor de 1,2/1.000, alrededor de 1,37/1.000, alrededor de 2,0/1.000, alrededor de 2,5/1.000, alrededor de 3,0/1.000, alrededor de 4,3/1.000, alrededor de 5,0/1.000, alrededor de 7,8/1.000, alrededor de 8,0/1.000, o superior. Por ejemplo, se puede determinar que un paciente para quien se ha determinado un riesgo mayor de desarrollar LMP presenta un riesgo de 0,3/1.000, 0,35/1.000, 0,5/1.000, 0,66/1.000, 1,2/1.000, 1,37/1.000, 2,0/1.000, 2,5/1.000, 3,0/1.000, 4,3/1.000, 5,0/1.000, 7,8/1.000, 8,0/1.000 o superior.

En un caso, se determina que un paciente que ha recibido tratamiento previo con una terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, y que no ha recibido terapia previa con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4, y que se ha determinado negativo para VJC, presenta menor riesgo de desarrollar LMP y, por lo tanto, es un candidato adecuado para recibir tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab. No obstante, al haber recibido terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, la valoración del riesgo puede incluir una recomendación de monitorizar al paciente con mayor frecuencia en cuanto al desarrollo de síntomas adversos, tales como síntomas que puedan indicar el desarrollo de LMP.

La monitorización optimizada de los pacientes en cuanto al desarrollo de LMP puede incluir llevar a cabo pruebas con mayor frecuencia para identificar la presencia de VJC, p. ej., aumento de pruebas mediante ensayos de anticuerpos anti-VJC o ensayos basados en ácido nucleico. La monitorización optimizada también puede incluir RM para identificar lesiones cerebrales producidas por LMP.

En un caso, un paciente que tiene anticuerpos anti-VJC en menos de un criterio preseleccionado tiene un nivel detectable de anticuerpos anti-VJC.

En un caso, el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4 y, en otro caso, el paciente no ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4.

Incluso en otro caso, el paciente está clasificado como candidato a recibir terapia anti-VLA-4, y se le administra una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

- 5 En un caso, llevar a cabo una determinación, p. ej., determinar si el paciente es negativo para VJC, requiere proporcionar (p. ej., obtener o recibir) una muestra biológica del paciente, y llevar a cabo un inmunoensayo, tal como un ensayo ELISA, para detectar anticuerpos de VJC en la muestra. En otro caso, llevar a cabo una determinación, p. ej., determinar si el paciente es negativo para VJC, requiere proporcionar una muestra biológica del paciente y llevar a cabo un ensayo, tal como un ensayo basado en PCR, para detectar ácido nucleico de VJC en la muestra.

10

Si el paciente es clasificado como candidato para terapia anti-VLA-4, además se le puede administrar una terapia anti-VLA-4. Se determina que un paciente que ha sido clasificado como candidato a recibir terapia anti-VLA-4 presenta menor riesgo de desarrollar LMP, p. ej., un riesgo de menos de alrededor de 0,2/1.000 pacientes, p. ej., 0,3/1.000 pacientes, o 0,2/1.000 pacientes o 0,19/1.000 pacientes o 0,11/1.000 pacientes. Por ejemplo, un paciente
15 que presenta menor riesgo de desarrollar LMP puede presentar un riesgo de $\leq 0,2/1.000$.

Se determina que un paciente no clasificado como candidato para recibir terapia anti-VLA-4, o que ha sido determinado como candidato para recibir terapia anti-VLA-4 con monitorización optimizada en cuanto a desarrollo de LMP, presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, p. ej., un riesgo mayor o igual a alrededor de 0,3,7/1.000 pacientes.

- 20 Por ejemplo, un paciente para quien se ha determinado un riesgo mayor de desarrollar LMP puede presentar un riesgo de 0,37/1.000, 0,35/1.000, 0,66/1.000, 1,2/1.000, 1,37/1.000, 2,5/1.000, 4,3/1.000, o 7,8/1.000 pacientes.

En un caso, una clasificación de exposición previa a inmunosupresores, si se selecciona, es una de las siguientes:

- 25 una clasificación de exposición previa a inmunosupresores positiva que corresponde a haber recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 dentro de un período preseleccionado, p. ej., en 1, 3 o 5 años, o durante la vida del paciente; y

- 30 una clasificación de exposición previa a inmunosupresores negativa que corresponde a estar libre de una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 durante un período preseleccionado, p. ej., en 1, 3 o 5 años, o durante la vida del paciente.

En un caso, una clasificación de exposición previa a terapia de VLA-4, si se selecciona, es una de las siguientes:

- 35 una clasificación de exposición previa a terapia de VLA-4 positiva que corresponde a haber recibido una terapia anti-VLA-4 durante más de un período preseleccionado, p. ej., durante 1, 2, 3 o 5 años o más; y

una clasificación de exposición previa a terapia de VLA-4 negativa que corresponde a haber recibido una terapia anti-VLA-4 durante menos de un período preseleccionado, p. ej., menos de 6 meses, 1, 2, 3 o 5 años.

40

En un caso, el procedimiento comprende proporcionar una clasificación de idoneidad de tratamiento, que, p. ej., se puede seleccionar de entre:

- 45 una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva que se correlaciona con la idoneidad del paciente para recibir tratamiento anti-VLA-4 (la clasificación de idoneidad de tratamiento positiva además se puede subdividir en clasificaciones de idoneidad de tratamiento positivas que van acompañadas de diversas alertas o requerimientos de monitorización, tales como monitorización aumentada en cuanto al desarrollo de LMP); y

- 50 una clasificación de idoneidad de tratamiento negativa que se correlaciona con la no idoneidad del paciente para recibir tratamiento anti-VLA-4, o idoneidad del paciente para recibir tratamiento anti-VLA-4, acompañada de diversas alertas o requerimientos de monitorización aumentada, por ejemplo, en cuanto a desarrollo de LMP.

- Una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva se correlaciona con un menor riesgo de desarrollar LMP, y una clasificación de idoneidad de tratamiento negativa se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar LMP. Un
55 menor riesgo de desarrollar LMP normalmente corresponde a un riesgo inferior a 0,2/1.000 pacientes, y un mayor riesgo de desarrollar LMP corresponde a un riesgo de $\geq 0,37/1.000$.

- Si se le asigna al paciente una clasificación de exposición baja y una clasificación de estado de VJC negativa, se le asigna a dicho paciente una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva, p. ej., una clasificación de idoneidad
60 de tratamiento positiva modificada que aconseja o requiere monitorización en cuanto a desarrollo de LMP.

Si se le asigna al paciente una clasificación de exposición previa a inmunosupresores negativa, y una clasificación de estado de anticuerpo anti-VJC negativa, se le puede asignar a dicho paciente una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva, p. ej., una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva modificada que aconseja o requiere monitorización en cuanto a desarrollo de LMP.

Si al paciente se le asigna una clasificación de exposición baja, una clasificación de exposición previa a inmunosupresores negativa y una clasificación de anticuerpos de VJC negativa, se le asigna a dicho paciente una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva.

En un caso, al paciente se le asigna una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva, y además se le administra a dicho paciente una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

En un aspecto, también se describe un procedimiento para evaluar un paciente, p. ej., para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP. El procedimiento incluye:

(aaa) determinar si el paciente es negativo o positivo para VJC, por ejemplo, determinando si el nivel de anticuerpos anti-VJC es inferior o superior a un criterio preseleccionado, p. ej., conforme se determina mediante un procedimiento descrito en el presente documento;

(bbb) determinar si el paciente ha recibido una terapia anti-VLA-4 durante más de un período preseleccionado (p. ej., más de 24 meses) o menos de un período preseleccionado, p. ej., 24 meses o menos, o no ha recibido terapia anti-VLA-4 en un período preseleccionado, p. ej., en los últimos 2, 3, 5 años, o alguna vez durante su vida;

(ccc) determinar si el paciente no ha recibido terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 durante un período preseleccionado o ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 durante un período preseleccionado (un tiempo determinado) (p. ej., los últimos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 años, o alguna vez durante su vida); y, en respuesta a las determinaciones, evaluar el paciente.

En un caso, en respuesta a una determinación de que el paciente es negativo para VJC, determinar que un paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP.

En un caso, en respuesta a una determinación de que el paciente es positivo para VJC, determinar que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP.

En un caso, una determinación, p. ej., determinar que el paciente es negativo para VJC, comprende o requiere extraer una muestra del cuerpo del paciente o analizar una muestra del paciente, o el procedimiento además requiere administrar una terapia al paciente. La terapia puede, p. ej., en el caso de un paciente de menor riesgo, ser una terapia anti-VLA-4 (p. ej., anticuerpo anti-VLA-4) o, p. ej., en el caso de un paciente de menor riesgo, una terapia alternativa (no anti-VLA-4), p. ej., interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide.

En un aspecto, se describe un procedimiento para cumplir con instrucciones. Las instrucciones pueden, por ejemplo, aparecer en un prospecto exigido por el gobierno, p. ej., un envase obligatorio de acuerdo con la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos) o la EMA (Agencia Europea de Medicamentos), y pautar instrucciones de uso para una terapia anti-VLA-4. El procedimiento para cumplir con las instrucciones incluye, opcionalmente, recibir las instrucciones; obtener los resultados de un procedimiento de evaluación descrito en el presente documento y, en respuesta al resultado obtenido, proporcionar una recomendación de terapia a un paciente y, opcionalmente, administrar, además, una terapia al paciente. La instrucción puede especificar un procedimiento de evaluación que, conforme se describe en el presente documento, es esencial para administrar la terapia de forma segura. La terapia puede ser una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

Se describe un procedimiento para evaluar a un paciente, donde el procedimiento requiere proporcionar un kit para recoger una muestra del paciente o llevarla a un profesional sanitario; recibir una muestra del paciente del profesional sanitario; llevar a cabo un procedimiento conforme se reivindica en el presente documento.

También se describe un procedimiento para tratar a un paciente. El procedimiento requiere obtener el resultado de un procedimiento de evaluación de un paciente o muestra descrito en el presente documento y, en respuesta al resultado obtenido, administrar una terapia al paciente. La terapia puede ser una terapia anti-VLA-4, tal como, natalizumab. Por ejemplo, en respuesta a los resultados de las etapas (a) y (b), las etapas (a), (b) y (c), las etapas (a), (b), (c) y (d), la etapa (c) o las etapas (c) y (d) administrar al paciente una terapia, p. ej., una terapia descrita en

el presente documento.

También se describe un procedimiento computarizado de reembolso con autorización, por ejemplo para el coste de una terapia anti-VLA-4. La parte que ha de ser reembolsada puede ser una tercera entidad pagadora, tal como una compañía aseguradora o una entidad gubernamental. El procedimiento puede incluir (a) obtener el resultado de un procedimiento de evaluación de un paciente descrito en el presente documento, y grabar el resultado en un medio legible por ordenador; (b) obtener evidencia de administración de una terapia anti-VLA-4 al paciente y grabar la evidencia en un medio legible por ordenador; y (c) si el resultado coincide con la administración de la terapia anti-VLA-4, autorizar el reembolso, o reembolsar, a la entidad correspondiente.

En un aspecto, se describe un procedimiento para seleccionar o clasificar un paciente como candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir determinar que un paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, p. ej., durante 1 a 24 meses, 2 a 20 meses, 5 a 15 meses, o 10 a 12 meses, o que un paciente no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, y valorar las titulaciones o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC. En un caso, valorar implica analizar una muestra del paciente. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, plasma, suero, orina o líquido cefalorraquídeo. Si la valoración indica que el paciente es positivo para VJC, p. ej., positivo para anticuerpos anti-VJC o ácido nucleico de VJC, entonces el paciente no es seleccionado o clasificado como candidato para tratamiento con la terapia anti-VLA-4. Si la valoración indica que el paciente es negativo para VJC, p. ej., negativo para anticuerpos anti-VJC o ácido nucleico de VJC, entonces el paciente es seleccionado o clasificado como candidato para recibir tratamiento con la terapia anti-VLA-4.

Un ensayo para determinar la presencia de anticuerpos anti-VJC puede ser un inmunoensayo, tal como un ensayo ELISA. Un ensayo para determinar ácido nucleico de VJC puede ser, p. ej., un ensayo de PCR o un procedimiento de secuenciación de última generación (NGS, por su sigla en inglés).

A un paciente que se ha determinado con menor riesgo de desarrollar LMP se le puede administrar, además, una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab. A un paciente que se ha determinado con mayor riesgo de desarrollar LMP se le puede administrar una alternativa a una terapia anti-VLA-4, tal como un interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide o un agonista de TNF. En un caso, a un paciente que se ha determinado con mayor riesgo de desarrollar LMP además se le puede administrar una terapia anti-VLA-4, y se puede requerir que se someta a pruebas de LMP con mayor frecuencia, y cuando se determine inicialmente que el paciente es VJC negativo, también se puede requerir que se someta a pruebas de VJC con mayor frecuencia.

En un aspecto, se describe un procedimiento para determinar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP. El procedimiento incluye (a) determinar que un paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4 (p. ej., natalizumab) durante 24 meses o menos, o que un paciente no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor; y (b) valorar el estado de anticuerpo anti-VJC de un paciente, donde la etapa de valoración incluye analizar una muestra del paciente. Si la valoración indica que el paciente es VJC negativo, entonces se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP. Si la valoración indica que el paciente es VJC positivo, entonces se determina que el paciente tiene mayor riesgo de desarrollar LMP.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para tratar a un paciente. El procedimiento de tratamiento incluye, p. ej., determinar la exposición previa del paciente a una terapia anti-VLA-4, y determinar si el paciente recibió previamente tratamiento con un inmunosupresor. Opcionalmente, también se puede determinar el estado del paciente para VJC.

Si se determina que el paciente ha recibido una terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, y que no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP, y se le administra a dicho paciente la terapia anti-VLA-4. Si se determina que el paciente ha recibido natalizumab durante más de 24 meses (p. ej., 25 meses o más), y que no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP, y se le administra a dicho paciente una alternativa a la terapia anti-VLA-4, p. ej., un interferón, un corticosteroide, una estatina o un antagonista de TNF.

Determinar la exposición previa del paciente a una terapia anti-VLA-4 o a un inmunosupresor puede incluir consultar con el paciente o con un cuidador, p. ej., un médico, enfermera/o, padre/madre u otro cuidador/a. En algunos casos, determinar la exposición previa del paciente puede incluir acceder a la información en una base de datos, p. ej., una base de datos de historias clínicas.

También se describe un procedimiento para determinar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP. El procedimiento incluye determinar la exposición previa del paciente a una terapia anti-VLA-4, y determinar si el paciente recibió previamente tratamiento con un inmunosupresor. Opcionalmente, también se puede determinar el estado de anticuerpo anti-VJC del paciente. Si se determina que el paciente ha recibido una terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, y que no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP. Si se determina que el paciente ha recibido terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, y que no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP. A un paciente que se ha determinado con menor riesgo de desarrollar LMP se le puede administrar, además, una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. A la inversa, a un paciente que se ha determinado con mayor riesgo de desarrollar LMP se le puede administrar, además, una alternativa a una terapia anti-VLA-4, p. ej., un interferón, un corticosteroide, una estatina o un antagonista de TNF.

En un caso, también se determina el estado de VJC del paciente, y si se determina que el paciente es VJC negativo, entonces se determina que el paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP que si se determina que el paciente es VJC positivo.

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

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

De acuerdo con la descripción incluida en este documento, la presente invención proporciona un procedimiento para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP), comprendiendo el procedimiento:

determinar una titulación de anticuerpos de virus JC (VJC), expresada como índice en una muestra de suero o plasma del paciente donde se determina que el paciente presenta un riesgo elevado si se determina que la titulación de anticuerpos de VJC es $>1,5$;

donde se determina el índice normalizando un valor de DO de la muestra a un calibrador de corte, donde el calibrador de corte se ajusta para tener un valor de 1, donde el calibrador de corte comprende una mezcla de suero positivo para anticuerpos de VJC y de suero negativo para anticuerpos de VJC,

donde normalizar un valor de DO de un control negativo que comprende suero negativo para anticuerpos de VJC al calibrador de corte da como resultado un valor de 0,1, y donde la titulación de anticuerpos de VJC se determina mediante un ensayo ELISA para detectar anticuerpos de VJC en la muestra.

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

Breve descripción de los dibujos

Las Fig. 1A y 1B son gráficos que representan la incidencia de LMP asociada a natalizumab por duración de tratamiento acumulativo (Fig. 1A) y por duración de intervalos de tratamiento de 12 meses (Fig. 1B).

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que representa la incidencia aproximada de LMP estratificada por uso previo de inmunosupresores y duración del tratamiento con natalizumab.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático que representa la incidencia aproximada de LMP estratificada por estado serológico de anticuerpo anti-VJC, uso previo de inmunosupresores y duración del tratamiento con natalizumab.

Las Fig. 4A y 4B son gráficos que representan análisis de sensibilidad de estimaciones de incidencia de LMP en pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo, estratificada por uso previo de inmunosupresores (sí o no) y duración del tratamiento con natalizumab (1-24 meses (Fig. 4A) o 25-48 meses (Fig. 4B)). Base= escenario de caso base

Las Fig. 5A y 5B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 1.

Las Fig. 6A y 6B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 2.

Las Fig. 7A y 7B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 3.

Las Fig. 8A y 8B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 4.

Las Fig. 9A y 9B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 5.

Las Fig. 9C y 9D son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 6.

Las Fig. 10A y 10B son gráficos que representan DON y titulaciones, respectivamente, del paciente 7.

- 5 La Fig. 11 es un diagrama de dispersión que representa datos de índice (eje x) y porcentaje de inhibición (eje y) recogidos para un grupo de pacientes de EM.

La Fig. 12 es un diagrama de dispersión que representa datos de índice (eje x) y porcentaje de inhibición (eje y) recogidos para un grupo de pacientes de EM.

- 10 La Fig. 13 es un diagrama de dispersión que representa valores de índice determinados para un grupo de pacientes de EM.

Descripción detallada

- 15 La invención está basada, al menos en parte, en el descubrimiento de procedimientos nuevos y mejorados para valorar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP que incluyen valorar titulaciones o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC. La invención está basada, al menos en parte, en el descubrimiento de que la titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC pueden ser indicadores del riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

- 20 Los solicitantes también han desarrollado un ensayo optimizado para determinar niveles de titulación de anticuerpos anti-VJC en una muestra biológica, y un procedimiento para analizar los anticuerpos cualitativamente determinando valores de porcentaje de inhibición, y utilizando esta información para determinar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP. El ensayo incluye: (a) formar una primera mezcla de reacción que comprende una primera alícuota de una muestra y un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, donde las partículas VLP están presentes en una
25 cantidad de 0,04 µg, y con una concentración de 0,4 µg/mL; (b) detectar el nivel de anticuerpo anti-VJC unido a HPVLP dispuesto sobre el sustrato, por ejemplo, detectando un reactivo de detección secundario marcado, p. ej., un anticuerpo anti-IgG marcado con enzimas, unido a anticuerpo anti-VJC unido a dicho sustrato; (c) formar una segunda mezcla de reacción que comprende una segunda alícuota de muestra con HPVLP en fase de disolución proporcionada con una concentración de, p. ej., 0,4 µg/mL, y una segunda alícuota de muestra proporcionada, p. ej.,
30 en una dilución 1:100 o 1:101; (d) formar una tercera mezcla de reacción que comprende una disolución de control negativo que no contiene HPVLP, y una tercera alícuota de muestra diluida, p. ej., 1:100 o 1:101 o 1:110 en la disolución de control negativo; (e) detectar el nivel de anticuerpo anti-VJC no unido en la segunda y tercera mezcla de reacción, por ejemplo, detectando VJC capaz de unirse a un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP, donde dicha HPVLP está presente; (f) proporcionar un primer valor, que corresponde al nivel de anticuerpo anti-VJC que se
35 une a HPVLP dispuesta sobre el sustrato en la primera alícuota de muestra, y un segundo valor, que corresponde al nivel de anticuerpo anti-VJC no unido en la segunda mezcla de reacción, p. ej., el nivel de anticuerpo anti-VJC que se une a HPVLP dispuesta sobre un sustrato de dicha segunda mezcla de reacción; y (g) opcionalmente, comparar el primer y segundo nivel de anticuerpo.

- 40 Los solicitantes también han descubierto que un paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es <0,5, o (ii) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es >0,5 y <3,0, y se determina que el porcentaje de inhibición es inferior o igual a 70 %. El paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el
45 valor de índice o DON es >3 y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %, o (ii) el paciente mostró un aumento de índice, DON o titulación de dos veces respecto de una prueba previa.

- Un paciente puede ser monitorizado a intervalos regulares, tal como cada 6 meses o cada 12 meses para detectar cambios en la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC. Si los resultados de este ensayo
50 posterior indican que el paciente todavía tiene una titulación de anticuerpos anti-VJC de DON inferior a 0,5, y un porcentaje de inhibición <70 %, entonces se puede determinar que el paciente todavía presenta menor riesgo de desarrollar LMP. Si un ensayo posterior indica que la titulación de anticuerpos del paciente aumenta de 2 a 3 veces respecto del ensayo inicial, entonces se puede determinar que el paciente presenta un riesgo mayor o aumentado de desarrollar LMP. Los solicitantes observaron que los pacientes diagnosticados con LMP tienden a mostrar un
55 aumento en la titulación de anticuerpos y DON de 2 a 3 veces en los seis meses anteriores al diagnóstico.

- Un paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP si (i) se determina que la titulación de anticuerpos anti-VJC conforme se indica mediante el valor de índice o DON es >3 y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es >70 %, o (ii) el paciente mostró un aumento de índice, DON o titulación de dos veces respecto de una prueba
60 previa.

Opcionalmente, se puede determinar que un paciente que cumple con estos criterios no es candidato a recibir terapia con terapia anti-VLA-4, tal como un anticuerpo anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, o se puede valorar adicionalmente al paciente en cuanto a otros factores de riesgo de desarrollar LMP. Estos factores de riesgo incluyen si el paciente ha recibido o no previamente una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, y durante cuánto tiempo el paciente ha recibido la terapia; y si el paciente ha recibido o no previamente una terapia inmunosupresora distinta de una terapia anti-VLA-4 y durante cuánto tiempo. El riesgo de un paciente de desarrollar LMP es una combinación de cada uno de estos factores.

- 10 La titulación de anticuerpos se puede medir mediante «DON» o «índice». «DON» es el valor de densidad óptica normalizada en una prueba, tal como una prueba ELISA, para detección de anticuerpos anti-VJC.

Los solicitantes descubrieron previamente que los pacientes que recibieron una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, durante 24 meses o menos, y que no han recibido previamente una terapia inmunosupresora, presentan menor riesgo de desarrollar LMP que los pacientes que no cumplen con estos dos criterios. Asimismo, los pacientes que presentan el menor riesgo son aquellos que cumplen con estos dos criterios, y que también son VJC negativo, p. ej., pacientes que no dan positivo para anticuerpos anti-VJC o ácido nucleico de VJC, p. ej., ADN de VJC. Anteriormente no se sabía que cada uno de estos tres factores de riesgo ((i) la cantidad de tiempo que el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4; (ii) si un paciente ha recibido o no previamente tratamiento con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4; y (iii) estado de VJC) contribuyen independientemente con el riesgo de un paciente de desarrollar LMP. En general, las invenciones descritas en el presente documento se pueden utilizar para pacientes tratados con un inhibidor de VLA-4. La capacidad para identificar subpoblaciones de pacientes con riesgos de desarrollar LMP diferenciados permite obtener una mejor caracterización del riesgo que los procedimientos anteriores (es decir, riesgo global de desarrollar LMP) y debería ayudar a los profesionales sanitarios y a los pacientes a tomar decisiones con mayor información sobre beneficio-riesgo de un tratamiento. Estos criterios de valoración de riesgo se describen en las solicitudes provisionales de EE. UU. de titularidad compartida 61/491.810, presentada el 31 de mayo de 2011, y 61/508584, presentada el 15 de julio de 2011. Los criterios de riesgo descritos en el presente documento dirigidos a titulación (p. ej., medida mediante DON o nivel de índice) y porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC se pueden considerar en combinación con los factores de riesgo descritos en las solicitudes provisionales de titularidad compartida previas.

Los procedimientos para determinar riesgo de desarrollar LMP pueden requerir obtener una, dos o las tres clasificaciones de VJC para un paciente (p. ej., titulación de anticuerpos anti-VJC, por ejemplo, medida mediante DON o nivel de índice y porcentaje de inhibición), historial previo de terapia anti-VLA-4 para el paciente, e historial previo de terapia inmunosupresora (distinta de una terapia anti-VLA-4) para el paciente. En respuesta a estas clasificaciones, se le puede asignar a un paciente una clasificación de idoneidad de tratamiento. A los pacientes para quienes se ha determinado un riesgo bajo de desarrollar LMP se les puede asignar una clasificación de tratamiento positiva, y a los pacientes para quienes se ha determinado un riesgo relativo mayor de desarrollar LMP se les puede asignar una clasificación de tratamiento negativa. Un paciente que recibe una clasificación de tratamiento positiva puede recibir una recomendación de tratamiento adicional o de iniciar tratamiento con una terapia anti-VLA-4. Un paciente que recibe una clasificación de tratamiento negativa puede recibir una recomendación de interrumpir el tratamiento con una terapia anti-VLA-4, una recomendación de iniciar tratamiento con una terapia no anti-VLA-4, una recomendación de continuar o iniciar terapia anti-VLA-4 con mayor supervisión en cuanto a signos o síntomas de LMP.

Una recomendación de tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4 puede estar acompañada de instrucciones o requerimientos adicionales de que el paciente reciba monitorización adicional o optimizada, tal como si uno o más factores indicaran que el paciente puede presentar un riesgo aumentado de desarrollar LMP, p. ej., tratamiento previo con una terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, p. ej., 25 meses o más, o tratamiento previo con un inmunosupresor distinto de una terapia anti-VLA-4.

Se puede determinar que un paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4 o una terapia inmunosupresora distinta de una terapia anti-VLA-4 mediante el autoinforme del paciente, o mediante información (verbal o escrita) proporcionada por un padre/madre, médico, asistente de médico, enfermero/a u otro profesional sanitario. La información también se puede obtener de una base de datos tal como una base de datos médica o una base de datos de pruebas clínicas.

Las terapias inmunosupresoras previas, distintas de una terapia anti-VLA-4, que indicarán un riesgo aumentado de desarrollar LMP, pueden incluir tratamiento previo con antineoplásicos, inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como uno o más de interferón beta o acetato de glatiramer. Los inmunosupresores ejemplares incluyen, p. ej.,

mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, y micofenolato, terapia anti-CD20 (p. ej., rituximab), una terapia anti-CD11a (p. ej., efalizumab), o micofenolato de mofetilo. También se preverá que el tratamiento previo con otras terapias inmunosupresoras como se describe más adelante aumenta el riesgo de un paciente de desarrollar LMP después de administración adicional de una terapia anti-VLA-4. En general, una determinación de uso previo de inmunosupresores es un uso determinado que puede ser cualquier uso previo de un inmunosupresor que no sea un inhibidor de VLA-4 (p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4) o uso previo dentro de un período determinado, por ejemplo, 1, 2, 3, 5 o 10 años antes de la evaluación del riesgo de desarrollar LMP.

Determinar el estado de VJC se refiere a determinar si un paciente ha estado expuesto a VJC y, por lo tanto, incluye procedimientos directos para determinar exposición (por ejemplo, detectar proteínas de VJC o ADN de VJC) y procedimientos indirectos (p. ej., detectar anticuerpos contra VJC en una muestra de paciente). Los ensayos para determinar el estado de VJC pueden incluir ensayos para detectar ácido nucleico de VJC (p. ej., ADN o ARN) o seroprevalencia de VJC, o anticuerpos anti-VJC en una muestra biológica, tal como en muestras de plasma, suero, sangre u orina, o en una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por su sigla en inglés) o líquido cefalorraquídeo. El ácido nucleico de VJC se puede detectar utilizando procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante un procedimiento de amplificación, p. ej., reacción en cadena de polimerasa (PCR), o mediante un procedimiento de secuenciación de última generación (NGS). La seroprevalencia de VJC se puede analizar utilizando procedimientos conocidos en la materia tal como un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH). Los anticuerpos de VJC se pueden detectar mediante un inmunoensayo, tal como un ensayo ELISA. En una realización, los anticuerpos de VJC se pueden detectar mediante el procedimiento descrito en la Solicitud Internacional N.º PCT/US2011/20832, que utiliza HPVLP en condiciones adecuadas para la unión de un anticuerpo anti-VJC para detectar el nivel de unión de anticuerpo anti-VJC en una muestra biológica. Los procedimientos para determinar el estado de VJC también incluyen procedimientos para determinar titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC. La detección de titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC normalmente incluye un ensayo de detección de anticuerpos de dos etapas como se describe en la Solicitud Internacional N.º PCT/US2011/20832.

Si se identifica la presencia de VJC en una muestra biológica de un paciente, p. ej., anticuerpos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos de VJC, se determina que el paciente es «VJC positivo». Una clasificación VJC positiva corresponde a la presencia de anticuerpos de VJC en la muestra biológica, p. ej., anticuerpos de VJC que son iguales o mayores que un criterio preseleccionado. Normalmente, el criterio preseleccionado es un valor cualitativo, p. ej., una cantidad «detectable» de anticuerpo de acuerdo con un ensayo concreto, p. ej., un inmunoensayo.

Los procedimientos descritos en el presente documento para determinar el riesgo de desarrollar LMP pueden resultar útiles para cualquier sujeto humano, incluido un sujeto que está considerando el tratamiento con un inmunomodulador, por ejemplo, una terapia anti-VLA-4 (p. ej., natalizumab), una terapia anti-CD20 (p. ej., rituximab), una terapia anti-CD11a (p. ej., efalizumab), o micofenolato de mofetilo; en un sujeto que está siendo tratado en ese momento con un inmunomodulador; o en un sujeto que ha interrumpido el tratamiento con un inmunomodulador. El procedimiento puede resultar útil para otras personas que puedan ser susceptibles de desarrollar LMP, tales como los individuos que tienen trastornos linfoproliferativos, tales como mieloma múltiple o un linfoma; los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o que tienen el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), tumores malignos hematológicos, o una enfermedad autoinmune tal como lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad inflamatoria intestinal, tales como la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa, esclerosis múltiple (EM) o artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR). El procedimiento de valoración de riesgo también puede resultar útil para los sujetos que reciben terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras, tales como los pacientes de trasplante. Las terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras ejemplares incluyen natalizumab, rituximab, efalizumab, y micofenolato de mofetilo. El procedimiento puede resultar útil para la valoración de riesgo en un sujeto que tiene un trastorno, o que se está tratando con un fármaco, descrito en Piccinni y col. «Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (LMP) with biological immunomodulating agents» Eur. J. Clin. Pharmacol. 66:199-206,2010.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, una «HPVLP» es una VLP (siglas en inglés de «partícula similar a virus») altamente purificada compuesta en su mayoría por la proteína VP1. Una «HPVLP» que se presenta en la invención está compuesta principalmente por la proteína principal de la cápsida «VP1», que puede ser una VP1 de origen natural o una VP1 recombinante, del poliomavirus, virus JC (VJC). Una HPVLP puede estar compuesta, p. ej., por al menos una subunidad pentamétrica, más de una subunidad pentamétrica, hasta setenta y dos subunidades pentamétricas o más de VP1. Una HPVLP de la invención puede unirse a anticuerpos contra el virus JC de origen natural intacto. En algunas realizaciones, una HPVLP incluye un segundo, y opcionalmente un tercer, polipéptido

que es una proteína menor de la cápsida del virus JC, p. ej., al menos un polipéptido VP2 o VP3. VP2 o VP3 pueden ser polipéptidos recombinantes o de origen natural o derivados naturalmente.

Las partículas «altamente purificadas» de este tipo contienen más de un pentámero VP1, p. ej., al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 72 pentámeros de VP1, o menos de 100 pentámeros de VP1. Las partículas altamente purificadas de este tipo pueden obtenerse, por ejemplo, mediante un procedimiento que conlleva filtración doble. Por ejemplo, en un caso, una preparación altamente purificada de las VLP se obtiene mediante la purificación de las partículas por centrifugación al menos dos veces, p. ej., a través de una almohadilla de sacarosa. En otros casos, las HPVLP se preparan utilizando procedimientos cromatográficos. En general, una preparación de HPVLP puede identificarse por su actividad en un ensayo ELISA usando muestras de control definidas. En algunos casos, las muestras de control de este tipo son controles negativos y/o muestras de control que contienen bajos niveles de anticuerpos de VJC.

Como se utiliza en el presente documento, un «sustrato de HPVLP con una relación señal a ruido elevada» es un sustrato sobre el cual se disponen HPVLP. Se puede utilizar para evaluar el nivel de libre (es decir, no unido a antígeno u otra meta, p. ej., HPVLP, en una muestra. La concentración de HPVLP sobre el sustrato es tal que, cuando se mide la cantidad de anticuerpo anti-VJC presente, proporciona una relación señal a ruido de 10 a 30, 15 a 30, 15 a 25, 18 a 22. En una realización, la relación señal a ruido es al menos 10, 15, 18 o 20. En algunas realizaciones, la relación señal a ruido es al menos 10, 15, 18 o 20. La relación señal a ruido se puede determinar con una muestra, p. ej., un control de calibración, que proporciona una densidad óptica de 1,0. En una realización la HPVLP se proporciona en dicho sustrato con una concentración que resulta de liofilizar 0,5 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, o 1,5 ml de 0,4 µg/ml de HPVLP en un pocillo de una placa de 96 pocillos. En una realización, la HPVLP se proporciona en dicho sustrato con una concentración que resulta de liofilizar 1,0 ml de 0,4 µg/ml de HPVLP en un pocillo de una placa de 96 pocillos, que, como se usa en el presente documento, es equivalente a entre 30 ng y 50 ng (p. ej., 40 ng) de HPVLP por pocillo. En una realización, la HPVLP se proporciona en dicho sustrato con una concentración que resulta de liofilizar 0,05 ml a 0,35 mL o 0,1 ml a 0,2 ml de 0,4 µg/ml de HPVLP en un pocillo de una placa de 96 pocillos. La cantidad de HPVLP dispuesta sobre el sustrato, o las condiciones en las cuales se dispone, pueden variar siempre que se obtenga la relación señal a ruido deseada.

Una relación señal a ruido se calcula comparando el valor de densidad óptica del control negativo con el control de calibrador para determinar el intervalo dinámico de la intensidad de señal en el ensayo.

En una realización, la muestra se diluye alrededor de 100 veces y el corte para la puntuación negativa es una reducción inferior o igual a 45 % y el corte para una puntuación positiva es superior a 45 %. En algunas realizaciones, la dilución es distinta de 100 veces pero inferior a 200 veces. Por ejemplo, la dilución oscila entre 50 y 150 veces, 75 y 125 veces, 85 y 115 veces. En algunas realizaciones, la dilución es inferior a 150 veces, 125 veces, 100 veces o 75 veces. En algunas realizaciones donde la dilución es distinta a 100 veces (p. ej., 200 veces, 400 veces, 500 veces, 800 veces, hasta >1.000.000 veces), el corte, u otros parámetros, se ajustan de modo que una muestra reciba la misma puntuación (positiva o negativa) que recibiría si la dilución fuera de 100 veces y el corte para la puntuación negativa es inferior a 45 % y el corte para la puntuación positiva es superior o igual a 45 %.

Ensayo de detección de anticuerpos anti-VJC Los ensayos se llevan a cabo añadiendo una muestra biológica a un sustrato que fue revestido con una HPVLP y se detectó usando los procedimientos conocidos en la materia. En general, se usa una plataforma de base sólida tal como una placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de 96 pocillos); si bien se pueden usar otros formatos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la muestra biológica se diluye antes del uso en un ensayo.

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

El revestimiento de la placa con HPVLP en general incluye incubar el sustrato sólido (tal como pocillos de una placa de microtitulación) con una disolución de HPVLP con una concentración adecuada (p. ej., 0,4 µg/ml), ya sea durante toda la noche o durante un determinado número de horas. La HPVLP puede incluir la VP1 como el único componente viral de VJC, o la HPVLP puede ser una partícula heteróloga, que contiene al menos una de VP2 o VP3 por partícula o al menos una de cada una de VP2 y VP3 por partícula. Después del revestimiento con HPVLP, los

pocillos de la placa se lavan. A continuación, el sustrato se «reviste» con una proteína no específica que es antigénicamente neutra respecto de las muestras que se han de analizar. Los materiales de revestimiento adecuados se conocen en la técnica e incluyen albúmina de suero bovino (ASB), caseína, azúcares o disoluciones de leche en polvo. A continuación, las placas se pueden secar y almacenar durante un período más largo, tal como 1 día, 1 mes o 1 año antes de proceder a la siguiente etapa del ensayo.

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

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

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

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

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

En general, la detección del anticuerpo unido a HPVLP se lleva a cabo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. En general, los procedimientos de este tipo están basados en la detección de una etiqueta o marcador, tal como una etiqueta radioactiva, fluorescente, biológica o enzimática. Las patentes de EE. UU. referentes al uso de tales etiquetas incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. En general, la detección de la unión del anticuerpo anti-VJC se detecta usando un anticuerpo secundario que se marca. En general, el anticuerpo secundario es específico para la detección de IgG humana. La cuantificación se consigue midiendo el grado de color generado, p. ej., usando un espectrofotómetro de espectros visibles.

En una realización, el ensayo se lleva a cabo en un consultorio médico, por un profesional sanitario, p. ej., un médico, una enfermera/o o un técnico, que trabajan en una instalación donde se obtiene la muestra biológica de un paciente. En otra realización, la muestra biológica obtenida de un paciente se transporta a otra instalación, p. ej., a una instalación de un tercero, donde se lleva a cabo el ensayo. En este último caso, los resultados del ensayo pueden comunicarse al profesional sanitario, tal como por ejemplo a través de un formulario, que se puede enviar por correo o por vía telemática (p. ej., por fax o por correo electrónico) o a través de una base de datos en línea. En una realización, los resultados del ensayo (incluido el ensayo de cribado y, opcionalmente, un ensayo confirmatorio) pueden almacenarse en una base de datos a la que puede acceder un profesional sanitario, por ejemplo, a través de internet.

Prueba secundaria En algunos casos, por ejemplo, cuando el nivel de anticuerpo anti-VJC en una muestra se encuentra en una «zona equívoca» o «zona indeterminada» designadas, p. ej., donde se determina que hay certeza limitada en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpo anti-VJC (tal como cuando se determina que el valor de DO_{490} es $>0,2$ y $<0,4$), se utiliza una prueba secundaria de la muestra (también denominada en el presente documento «ensayo confirmatorio»). Para la prueba secundaria, se usan dos alícuotas de una muestra biológica. La primera se prepara antes de su uso en el ensayo preincubando la muestra en presencia de un tampón de ensayo en disolución durante un período (p. ej., durante 30 minutos, una hora, o más tiempo tal como toda la noche a 4 °C). La segunda alícuota se prepara antes de su uso en el ensayo preincubando la muestra en presencia de HPVLP en disolución durante un período (p. ej., durante 30 minutos, o una hora, o más tiempo). A continuación, las dos alícuotas se usan en el ensayo de HPVLP como se describe en el presente documento, y se lleva a cabo la

asignación de la muestra a anticuerpo anti-VJC positivo o anticuerpo negativo. Si los resultados del ensayo para la alícuota incubada con HPVLP indican un valor de inhibición $<45\%$ (es decir, el «punto de corte»), entonces la muestra se interpreta como negativa en cuanto a presencia de anticuerpos específicos de VJC. Si los resultados del ensayo indican un valor de inhibición $\geq 45\%$, entonces se interpreta que la muestra tiene anticuerpos específicos de VJC y, por lo tanto, como positiva para anticuerpo.

Un ensayo caracterizado en la invención que utiliza una prueba secundaria también se denomina en el presente documento una «prueba de dos etapas» o un «ensayo de dos etapas». Una versión anterior del ensayo de dos etapas se describe en la Solicitud Internacional de titularidad compartida N.º PCT/US2011/020832.

Sustratos y procedimientos basados en disoluciones Cualquier sólido adecuado se puede usar para el formato de ensayo de HPVLP. En algunas realizaciones, el sustrato es una placa de microtitulación (p. ej., una placa de 96 pocillos) un portaobjetos, una esfera, o una columna. El sustrato puede ser adecuado para procedimientos de detección cromogénicos o quimioluminiscentes o para procedimientos basados en disoluciones tales como ligación proximal.

Punto de corte La invención proporciona procedimientos de análisis que emplean «puntos de corte» para reducir las tasas de falsos negativos y falsos positivos. Se establecen los puntos de corte en base a datos de los ensayos de HPVLP (p. ej., para detectar anticuerpos de VJC en una muestra biológica), se promedian, por ejemplo, entre muestras de prueba duplicadas y múltiples repeticiones (por ejemplo, al menos dos, al menos cuatro, o al menos ocho repeticiones de muestras de control). Los puntos de corte también se pueden determinar estadísticamente utilizando paneles grandes de muestras de LMP y no de LMP.

En una versión de un ensayo de acuerdo con la presente invención, los resultados de los ensayos iniciales de cribado de HPVLP, p. ej., ensayos ELISA, provocarán que una muestra de prueba se clasifique como que tiene o no tiene anticuerpos específicos de VJC, o, si la muestra no se encuentra en una de estas dos clasificaciones, se someterá entonces a un ensayo de confirmación complementario. Por ejemplo, las muestras que producen un resultado menor que un nivel establecido (p. ej., $DO_{450} < 0,2$) en un ensayo ELISA de HPVLP descrito en la invención se clasificarán como sin anticuerpos específicos de VJC, y las muestras que proporcionan un resultado mayor que un nivel establecido (p. ej., $DO_{450} > 0,4$) en el ensayo ELISA se clasificarán como positivas para anticuerpos específicos de VJC. Las muestras que no entran claramente en una de estas clasificaciones (p. ej., $0,2 < DO_{450} < 0,4$) se pueden analizar en un ensayo confirmatorio.

En una realización, el ensayo confirmatorio requiere una etapa de pre-incubación, donde la muestra de prueba se preincuba con tampón de control (u otra disolución adecuada) o con las HPVLP (en tampón u otra disolución adecuada) para preadsorber los anticuerpos específicos de VJC antes del análisis en un ELISA de HPVLP, como se describe con mayor detalle a continuación. Después de la pre-incubación con HPVLP si la reacción en el ensayo primario disminuye por debajo del 45% en comparación con el tampón de control, la muestra se interpreta entonces como negativa en cuanto a presencia de anticuerpos específicos de VJC. Si los resultados muestran una reducción $\geq 45\%$ en la reacción en comparación con el tampón de control en el ensayo primario después de la pre-incubación con HPVLP, entonces se interpreta que la muestra contiene anticuerpos específicos de VJC. En algunas realizaciones, solo se lleva a cabo el ensayo confirmatorio.

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

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

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

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

La pureza puede evaluarse usando cualquiera de las técnicas adecuadas conocidas en la técnica, por ejemplo, ultracentrifugación analítica, microscopía electrónica, análisis por PAGE, espectrometría de masas, concentración de proteína, o actividad en un ensayo ELISA con sueros de control. Las VLP escasamente purificadas dan como resultado un fondo alto y producen, en falso, niveles de anticuerpo anti-VJC o tasas de exposición calculadas elevadas.

En algunos casos, las HPVLP contienen VP1 como la única proteína del virus JC.

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

Una HPVLP que incluye tanto VP1 como VP3 o ambas moléculas VP1 y VP2 puede producirse, por ejemplo, mediante la transformación de un baculovirus con un ácido nucleico que incluye un gen VP1 y VP3 o un gen VP1 y VP2, respectivamente, bajo el control de los mismos promotores o de promotores diferentes. Un cultivo de células se infecta con el baculovirus, y las células expresan VP1 y VP3 o VP1 y VP2, y se forman las HPVLP que incluyen

ambos tipos de proteínas. En algunos casos, los genes de VP1 y VP3 o de VP1 y VP2 están en diferentes moléculas de ADN, las moléculas de ADN se transforman en diferentes baculovirus y los baculovirus se usan para transfectar células en el mismo cultivo. Las células expresan las proteínas VP1 y VP3 o genes de VP1 y VP2 respectivamente, y se forman las HPVLP que incluyen ambos tipos de proteínas. Las partículas HPVLP pueden aislarse a partir de tales preparaciones usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los que se usan para aislar las cápsidas de VJC.

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

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

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

En otros casos, el procedimiento para preparar una disolución de HPVLP puede incluir la eliminación de de la disolución de partículas (p. ej., monómeros de VP1 o partículas que contienen VP1 pequeñas) que son del tamaño de un pentámero VP1 o más pequeñas. Los procedimientos tales como centrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño se pueden usar para llevar a cabo esta etapa de purificación. En algunos casos, se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., cromatografía de intercambio iónico, en la preparación de HPVLP que son mayores en tamaño que un pentámero VP1. En general, una preparación de HPVLP adecuada para usar en un ensayo contendrá al menos 20 % de HPVLP, al menos 25 % de HPVLP, al menos 40 % de HPVLP, al menos 60 % de HPVLP, al menos 65 % de HPVLP, al menos 70 % de HPVLP, al menos 80 % de HPVLP, al menos 85 % de HPVLP, al menos 90 % de HPVLP, al menos 95 % de HPVLP, o al menos 99 % de HPVLP en comparación con partículas no HPVLP (p. ej., por porcentaje de pentámeros respecto de monómeros de VP1 y agregados que contienen menos de cinco moléculas de VP1).

Procedimientos para evaluar muestras y/o sujetos. Como se utilizan en el presente documento, los procedimientos para evaluar o analizar un sujeto o muestra biológica de un sujeto incluyen uno o más de llevar a cabo el análisis de la muestra, solicitar el análisis de la muestra, solicitar los resultados del análisis de la muestra o recibir los resultados del análisis de la muestra. (En términos generales en el presente documento, determinación (o determinar), análisis o evaluación (o evaluar) pueden incluir uno o ambos de llevar a cabo el procedimiento subyacente o recibir los datos de otra persona que ha llevado a cabo el procedimiento subyacente).

El análisis o evaluación requiere una transformación de material, p. ej., material biológico o componentes de ensayo. Por ejemplo, una muestra biológica se puede evaluar en cuanto a presencia de anticuerpos anti-VJC, titulación de anticuerpos anti-VJC y porcentaje de inhibición de anticuerpos de VJC. La evaluación se puede llevar a cabo antes o después de que el paciente reciba tratamiento o mientras esté recibiendo dicho tratamiento, por ejemplo, para EM. La evaluación se basa, al menos en parte, en el análisis de una muestra del sujeto, p. ej., una muestra de sangre, plasma, suero, orina o LCR. La presencia de anticuerpos anti-VJC se puede determinar por contacto con un agente de unión específico, p. ej., una proteína de VJC, tal como VP1. El agente de unión puede ser una proteína de VJC, p. ej., VP1 en forma de una partícula, p. ej., una HPVLP.

En una realización, un ensayo para detectar la presencia de anticuerpos anti-VJC es un ensayo de dos etapas, tal como se describe en el presente documento. El ensayo utiliza HPVLP en condiciones adecuadas para unirse a un anticuerpo anti-VJC. El ensayo es capaz de detectar cualquier isotipo de anticuerpo anti-VJC (incluidos IgG, IgM, IgA e IgE). Asimismo, el ensayo es sumamente sensible y puede detectar anticuerpos anti-VJC con una concentración

de, por ejemplo, 2,0 µg/mL o menos, p. ej., 1,5 µg/mL o menos, 1,25 µg/mL o menos, 1,0 µg/mL o menos, 0,5 µg/mL o menos, 50 ng/mL o menos, 10 ng/mL o menos, 5 ng/mL o menos, 1,7 ng/mL o menos, o 1 ng/mL o menos.

En un caso, la muestra se analiza para determinar el nivel de ácido nucleico de VJC presente en la muestra. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar de la muestra y utilizar para amplificación por PCR o para una técnica de secuenciación de última generación (Nex-Gen). En un caso, un lisado crudo de la muestra biológica está sujeto a un procedimiento de amplificación, tal como PCR, y el producto amplificado se analiza mediante uno o más de electroforesis, mapeo de fragmentos de restricción, hibridación o secuenciación para identificar si el ADN de VJC o el ARN están presentes en la muestra y en qué cantidad.

La muestra biológica se puede extraer del paciente y analizar.

En algunas realizaciones, la muestra del paciente, p. ej., una muestra de suero o plasma o sangre entera o LCR, se puede almacenar antes de las pruebas de VJC, p. ej., para determinar anticuerpos de VJC o ácido nucleico de VJC.

La muestra del paciente, p. ej., la muestra del paciente que contiene anticuerpos de VJC o ácido nucleico de VJC se puede almacenar durante 1-21 días, p. ej., 1-14 días o 1-7 días o más (p. ej., un día, dos días, tres días, cinco días, siete días, diez días, 14 días, 21 días o más); durante una a seis semanas, p. ej., una a tres semanas o una a dos semanas o más (p. ej., hasta una semana, hasta dos semanas, hasta tres semanas, hasta seis semanas, o más); o durante uno a seis meses, p. ej., uno a tres meses o uno a dos meses o más (p. ej., hasta un mes, hasta dos meses, hasta tres meses, hasta seis meses o más). La muestra se puede almacenar, por ejemplo, congelada (p. ej., de -80°C a -20°C), a 2-8°C, a temperatura ambiente (18°C-25°C) o a mayor temperatura, p. ej., a 37°C.

Como se utilizan en el presente documento, los términos «obtener» u «obteniendo» se refieren a obtener posesión de una entidad física o un valor, p. ej., un valor numérico, «obteniendo directamente» u «obteniendo indirectamente»

la entidad física o valor, p. ej., el estado de un paciente, tal como exposición previa a terapia anti-VLA-4 u otros inmunosupresores, o estado de VJC. «Obteniendo directamente» significa llevar a cabo un proceso (p. ej., llevar a cabo un procedimiento sintético o analítico) para obtener la entidad física o valor. «Obteniendo indirectamente» se refiere a recibir la entidad física o valor de otra entidad o fuente (p. ej., un laboratorio de un tercero que obtuvo directamente la entidad física o valor). Obtener directamente una entidad física incluye llevar a cabo un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, p. ej., un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen producir una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, llevar a cabo una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Obtener directamente un valor incluye llevar a cabo un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., llevar a cabo un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (a veces denominado en el presente documento «análisis físico»), llevar a cabo un procedimiento analítico, p. ej., un procedimiento que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, p. ej., un analito o un fragmento u otro derivado correspondiente, a partir de otra sustancia; combinar un analito o fragmento u otro derivado correspondiente, con otra sustancia, p. ej., un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado correspondiente, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiando la estructura de un reactivo o un fragmento u otro derivado correspondiente, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

Al menos uno o ambos de los pasos de determinar el estado de un paciente (p. ej., estado de VJC), o un nivel de actividad, y determinar si el estado tiene una relación preseleccionada con un criterio de referencia incluye uno o más de los pasos de analizar una muestra, solicitar análisis de la muestra, solicitar resultados de análisis de la muestra o recibir los resultados de análisis de la muestra. (En términos generales, análisis incluye uno o más de los pasos de llevar a cabo el procedimiento subyacente (p. ej., un inmunoensayo) o recibir datos de otra persona que ha llevado a cabo el procedimiento subyacente).

Terapia anti-VLA-4. Una terapia anti-VLA-4 es una molécula, p. ej., un compuesto de molécula pequeña o un producto biológico proteico (p. ej., un anticuerpo o fragmento correspondiente, tal como un fragmento de unión a antígeno correspondiente) que bloquea la actividad de VLA-4. La molécula que es la terapia anti-VLA-4 es un antagonista de VLA-4. Un antagonista de VLA-4 incluye cualquier compuesto que inhibe una integrina de VLA-4 para que no se una a un ligando y/o receptor. Una terapia anti-VLA-4 puede ser un anticuerpo (p. ej., natalizumab (TYSABRI®)) o un fragmento correspondiente o una forma soluble de un ligando. Las formas solubles de las proteínas de ligando para integrinas α4 incluyen VCAM-I solubles o péptidos de fibronectina, proteínas de fusión VCAM-I o proteínas de fusión bifuncionales VCAM-I/Ig. Por ejemplo, una forma soluble de un ligando de VLA-4 o un fragmento correspondiente se pueden administrar para unirse a VLA-4, y en algunos casos, compiten por un sitio de

unión a VLA-4 en células, produciendo de este modo efectos similares a la administración de antagonistas tales como anticuerpos anti-VLA-4. Por ejemplo, los mutantes de integrina de VLA-4 que se unen al ligando de VLA-4 pero que no provocan señalización dependiente de integrina son adecuados para uso en los procedimientos descritos. Dichos mutantes pueden actuar como inhibidores competitivos de proteína integrina de tipo salvaje y se consideran «antagonistas». Otros antagonistas adecuados son «moléculas pequeñas».

Las «moléculas pequeñas» son agentes que imitan la acción de los péptidos para perturbar las interacciones VLA-4/ligando, por ejemplo, uniéndose a VLA-4 y bloqueando la interacción con un ligando de VLA-4 (p. ej., VCAM-I o fibronectina) o uniéndose a un ligando de VLA-4 y evitando que el ligando interactúe con VLA-4. Una molécula pequeña ejemplar es un oligosacárido que imita el dominio de unión de un ligando de VLA-4 (p. ej., fibronectina o VCAM-I) y une el dominio de unión a ligando de VLA-4. (Véase, Devlin y col., Science 249: 400-406 (1990); Scott y Smith, Science 249:386-390 (1990); y la patente de EE. UU. N.º 4.833.092 (Geysen).)

Una «molécula pequeña» puede ser un compuesto químico, p. ej., un compuesto orgánico, o un péptido pequeño, o un compuesto orgánico que contiene un péptido más grande o un compuesto orgánico no peptídico. Una «molécula pequeña» no pretende abarcar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Si bien el peso molecular de las moléculas pequeñas es, por lo general, inferior a 2.000 daltons, esta cifra no pretende ser un límite superior absoluto de peso molecular.

20 *Terapia de combinación o alternativas a la terapia anti-VLA-4.* En algunos casos, la terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, se administra con un segundo agente, o se puede administrar una terapia alternativa en vez de la terapia anti-VLA-4, tal como cuando se determina que un paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP.

Los ejemplos no restrictivos de segundos agentes para tratar esclerosis múltiple en combinación con la terapia anti-VLA-4, o de agentes alternativos para uso en vez de la terapia anti-VLA-4, incluyen: sales de ácido fumárico, tales como fumarato de dimetilo; antagonistas de esfingosina-1-fosfato (S1P), tal como el anticuerpo de bloqueo de S1B Sphingomab; interferones, tales como interferón beta-1a humano (p. ej., AVONEX® o Rebif®) e interferón β -1b (interferón β humano BETASERON® sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron); acetato de glatiramer (también denominado Copolímero 1, Cop-1; COPAXONE® Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); un anticuerpo o un fragmento correspondiente (tal como un fragmento de unión a antígeno correspondiente), tal como un anticuerpo anti-CD20, p. ej., Rituxan® (rituximab), o un anticuerpo o fragmento correspondiente que compite con o se une a un epítipo de solape con rituximab; mixtoxantrona (NOVANTRONE®, Lederle); un agente quimioterapéutico, tal como cladribina (LEUSTATIN®), azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®), ciclosporina-A, metotrexato, 4-aminopiridina, y tizanidina; un corticosteroide, tal como metilprednisolona (MEDRONE®, Pfizer), o prednisona; CTLA4 Ig; alemtuzumab (MabCAMPATH®) o daclizumab (un anticuerpo que se une a CD25); estatinas; y antagonistas de TNF.

El acetato de glatiramer es una proteína formada a partir de una cadena aleatoria de aminoácidos (ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina (por ende GLATiramer)). El acetato de glatiramer se puede sintetizar en una disolución a partir de estos aminoácidos con una relación de aproximadamente 5 partes de alanina por 3 partes de lisina, 1,5 partes de ácido glutámico y 1 parte de tirosina utilizando anhídridos de ácido N-carboxiamino.

Los segundos agentes adicionales o agentes para uso en lugar de la terapia anti-VLA-4 incluyen anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-LCR, FGF, y PDGF. Incluso otros segundos agentes ejemplares incluyen anticuerpos de moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Por ejemplo, daclizumab es un anticuerpo anti-CD25 que puede mejorar la esclerosis múltiple.

Incluso otros anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos que proporcionan una actividad de un agente descrito en el presente documento, tal como un anticuerpo que se acopla a un receptor de interferón, p. ej., un receptor de interferón beta. Normalmente, en implementaciones en las cuales el segundo agente incluye un anticuerpo, se une a una proteína meta distinta de VLA-4 o distinta de una integrina α 4, o al menos un epítipo en VLA-4 que no sea uno reconocido por natalizumab.

Incluso otros segundos agentes ejemplares adicionales incluyen: FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), por ejemplo, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización mediante citocinas proinflamatorias como se describe en el presente documento, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1 β (p. ej., Vx740), anti-P7, PSGL, inhibidores de TACE, inhibidores de

señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de metaloproteínasa, sulfasalazina, azatoprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina soluble y derivados correspondientes, como se describen en el presente documento, citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).

5

En algunos casos, se puede utilizar un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos adversos de EM. Dichos agentes incluyen amantadina, baclofeno, papaverina, meclizina, hidroxicina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenamina, clonazepam, isoniácida, vardenafilo, nitrofurantoina, muciloide hidrofílico de psilio, alprostadilo, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propantelina, modafinilo, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropión, y sertralina. Muchos segundos agentes que son moléculas pequeñas tienen un peso molecular que oscila entre 150 y 5.000 daltons.

10

Entre los ejemplos de antagonistas de TNF se incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos generados *in vitro* (o fragmentos de unión a antígeno correspondientes) de TNF (p. e j., TNF α humano), tal como D2E7, (anticuerpo de TNF α humano, patente de EE. UU. N.º 6.258.562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico; REMICADE™, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej., CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, p. ej., receptores de TNF humanos p55 o p75 o derivados correspondientes, p. ej., TNFR-IgG 75 kd (proteína de fusión de receptor de TNF 75 kd-IgG, ENBREL™; Immunex; véase, *Arthritis & Rheumatism* 37:S295, 1994; *J. Invest. Med.* 44:235A, 1996), TNFR p55 kd-IgG (proteína de fusión de receptor de TNF 55 kd-IgG (LENERCEPT™)); antagonistas de enzimas, p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de TNF α (TACE) (p. ej., un derivado del ácido alfa-sulfonil hidroxámico, publicación internacional WO 01/55112, e inhibidor de la TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005, o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína de unión a TNF soluble; véase, p. ej., *Arthritis & Rheumatism* 39:S284, 1996; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* 268:37-42, 1995).

25

En una implementación, la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se proporcionan como una coformulación, y la coformulación se administra al sujeto. Además es posible, p. ej., al menos 24 horas antes o después de administrar la coformulación, administrar, por separado, una dosis de la formulación de terapia anti-VLA-4 y, a continuación, una dosis de una formulación que contiene el segundo agente. En otra implementación, la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se proporcionan como formulaciones separadas, y la etapa de administrar incluye administrar secuencialmente la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente. Las administraciones secuenciales se pueden proporcionar el mismo día (p. ej., a intervalos de una hora o al menos cada 3, 6 o 12 horas) o en días distintos.

30

Cada uno de la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se pueden administrar como una pluralidad de dosis a intervalos de tiempo. La terapia anti-VLA-4 y el segundo agente normalmente se administran de acuerdo con un régimen. El régimen para uno o ambos pueden tener una periodicidad regular. El régimen para la terapia anti-VLA-4 puede tener una periodicidad diferente respecto del régimen para el segundo agente, p. ej., uno se puede administrar con mayor frecuencia que el otro. En una implementación, o bien la terapia anti-VLA-4 o el segundo agente se administra una vez por semana y el otro una vez al mes. En otra implementación, o bien la terapia anti-VLA-4 o el segundo agente se administra de manera continua, p. ej., en un período de más de 30 minutos pero menos de 1, 2, 4 o 12 horas, y el otro se administra como un bolo. La terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se pueden administrar mediante cualquier procedimiento apropiado, p. ej., por vía subcutánea, por vía intramuscular o por vía intravenosa.

40

45

En algunos casos, cada uno de la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se administra en la misma dosis puesto que cada uno se prescribe para monoterapia. En otros casos, la terapia anti-VLA-4 se administra con una dosificación que es igual o inferior a una cantidad requerida para que sea eficaz si se administra sola. Asimismo, el segundo agente se puede administrar con una dosificación que es igual o inferior a una cantidad requerida para que sea eficaz si se administra solo.

50

Kits Los reactivos para llevar a cabo un ensayo de anticuerpos anti-VJC se pueden proporcionar en forma de kit. A excepción de la muestra del paciente, algunos de los materiales o todos los materiales requeridos para el ensayo se pueden proporcionar en el kit. Un kit puede incluir, por ejemplo, un sustrato, tal como una placa con pocillos revestidos con sustrato de antígeno de VJC, p. ej., HPVLP. La placa puede ser, por ejemplo, una placa de 6 pocillos, de 12 pocillos, de 24 pocillos, de 48 pocillos, de 96 pocillos o de 384 pocillos. Las placas proporcionadas en un kit pueden ser prerrevestidas con antígeno de VLP de VJC, a 0,4 μ g/mL. En un caso, el kit incluye materiales y reactivos para uso con sistemas de alto rendimiento tales como puntas de SPR (receptáculo de fase sólida) para uso con sistemas bioMerieux.

55

60

El kit también puede incluir antígeno de VJC, p. ej., HPVLP liofilizada o en disolución, tal como para uso con la etapa de confirmación del ensayo. En un caso, el kit incluye un calibrador de corte de VJC, un control positivo de anticuerpos anti-VJC y un control negativo de VJC, que son muestras de sueros, tales como sueros humanos. Las disoluciones que contienen antígeno de VJC y sueros pueden incluir un conservante, tal como azida de sodio, p. ej.,

- 5 azida de sodio al 0,05 %, 0,1 %, 1,5 %, y 2 %. En un caso, un kit puede incluir uno o más reactivos para detectar un complejo que contiene anticuerpos anti-VJC unidos a antígeno, tal como HPVLP. Los reactivos para detectar el complejo incluyen, por ejemplo, un conjugado de VJC, una muestra de caseína, un reactivo detectable, tal como TMB (tetrametilbencidina), un tampón de lavado y un reactivo de detención.
- 10 El sustrato de VJC puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano, tal como un anticuerpo anti-humano conjugado con enzima. En un caso, el conjugado de VJC es un anticuerpo anti-humano de burro purificado por afinidad y conjugado con peroxidasa. En otro caso, la disolución de caseína contiene caseína, un tensioactivo y un conservante no de azida en tampón, (p. ej., tampón fosfato salino (PBS)). En otro caso, la disolución de sustrato de TMB incluye TMB y peróxido de hidrógeno en tampón. En otro caso, el kit incluye un tampón de lavado y el tampón
- 15 de lavado puede contener, por ejemplo, tensioactivo en PBS con conservantes no de azida. El reactivo de detención puede ser, por ejemplo, un ácido, tal como ácido sulfúrico (p. ej., ácido sulfúrico 1 M).

Las disoluciones proporcionadas en el kit se pueden proporcionar con niveles concentrados de modo que se requiera dilución antes del uso. La HPVLP para uso en unión de disolución a anticuerpo anti-VJC en una muestra

20 biológica, tal como en la etapa de confirmación del ensayo de dos etapas, se puede proporcionar como una concentración de 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, para uso en, por ejemplo, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,8 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,2 µg/mL. El tampón de lavado, por ejemplo, se puede proporcionar con una concentración de 10x. El sustrato de VJC (tal como un anticuerpo anti-humano de burro purificado por afinidad y conjugado con peroxidasa) se puede proporcionar, por ejemplo, en 1 mg/mL, 0,8 mg/mL o 0,6 mg/mL, para dilución en, p. ej.,

25 1:40.000, 1:30.000, 1:20.000 o 1:20.000 antes de su uso en un ensayo de detección de anticuerpos anti-VJC.

Los materiales para sellar las mezclas de reacción, tal como cinta de sellado, también pueden estar incluidos en el kit.

- 30 *Informe de resultados.* Los resultados del análisis de valoración de riesgo pueden ser informados a, por ejemplo, un centro de tratamiento, un profesional sanitario, o un proveedor de seguros. En una realización, los resultados de la valoración de riesgo se almacenan en una base de datos.

En una realización, el material informativo se proporciona para llevar a cabo e interpretar la valoración de riesgo. El

35 material informativo puede proporcionar orientación en cuanto a dónde informar los resultados de la valoración, tal como a un centro de tratamiento o profesional sanitario o a un proveedor de bases de datos. El material informativo se puede proporcionar en un kit o un envase, y puede incluir formularios para informar los resultados de la valoración, incluyendo cada paso de la valoración (información referente al tratamiento previo con terapias anti-VLA-4, tratamiento previo con inmunosupresores, y estado de VJC), y domicilio e información de contacto sobre dónde

40 enviar dichos formularios u otra información relacionada; o una dirección URL (Localizador Uniforme de Recursos) para informar los resultados en una base de datos en línea o una solicitud en línea (p. ej., una «app»). En otra realización, el material informativo puede incluir orientación referente a si un paciente debería recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4 de acuerdo con el riesgo del paciente de desarrollar LMP de acuerdo con los resultados de la valoración de riesgo.

- 45 El kit o envase también puede incluir instrucciones y artículos para la recogida o transporte de la muestra de un paciente a un profesional sanitario, o para recibir una muestra de un profesional sanitario, o para llevar a cabo los procedimientos de evaluación descritos en el presente documento. Por ejemplo, además de la información instructiva, un kit o envase puede incluir uno o más de un frotis o raspado, o un recipiente (p. ej., una copa, un tubo
- 50 de ensayo, una ampolla o una bolsa) para recoger y almacenar y transportar una muestra biológica. El kit o envase también puede contener material para llevar a cabo un inmunoensayo o un ensayo de secuenciación para detección de anticuerpos o ácidos nucleicos de VJC, respectivamente.

- Un kit puede incluir uno o más envases para los reactivos requeridos para un ensayo, p. ej., un ensayo de detección
- 55 de VJC. Los reactivos se pueden proporcionar en una concentración adecuada para uso en el ensayo o con instrucciones de dilución para uso en el ensayo. En algunos casos, el kit contiene envases, separadores o compartimentos separados para los componentes del ensayo, y el material informativo. Por ejemplo, los componentes del ensayo pueden estar dentro de un frasco o vial, y el material informativo puede estar dentro de una funda o envoltorio plástico. En otros casos, los elementos separados del kit están dentro de un solo envase, no
- 60 dividido. Por ejemplo, un reactivo del ensayo está dentro de un frasco o vial que tiene pegado al mismo el material

informativo en forma de etiqueta. En algunos casos, el kit incluye una pluralidad (p. ej., un paquete) de envases individuales, cada uno de los cuales contiene una o más formas unitarias (p. ej., para uso con un ensayo) de un componente del ensayo. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de ampollas, sobres de papel, o paquetes de blíster, cada uno de los cuales contiene una única unidad de reactivo de ensayo para uso en un ensayo de cribado o confirmatorio. Los envases de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables. El envase puede etiquetarse para el uso.

El material informativo de un kit o paquete no está limitado en cuanto a forma. En muchos casos, el material informativo, p. ej., instrucciones, se proporciona impreso, p. ej., un texto, figura, y/o fotografía impresos, p. ej., una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo puede proporcionarse además en otros formatos, tales como material legible por ordenador, grabación de vídeo o grabación de audio. En otro caso, el material informativo del kit es información de contacto, p. ej., una dirección física, una dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde un usuario del kit o paquete puede obtener información detallada sobre cómo encontrar la información requerida para el análisis de valoración de riesgo, p. ej., dónde y cómo identificar tratamientos previos administrados a un sujeto y cómo llevar a cabo un ensayo para determinar el estado de VJC de un paciente. El material informativo también se puede proporcionar con cualquier combinación de formatos.

En algunas realizaciones, se proporciona una muestra biológica a un proveedor del ensayo, p. ej., un proveedor de servicios (tal como una instalación de un tercero) o un profesional sanitario, que evalúa la muestra en un ensayo y proporciona una lectura. Por ejemplo, en una realización, un proveedor del ensayo recibe una muestra biológica de un sujeto, tal como muestra de plasma, sangre o suero, y evalúa la muestra usando un ensayo descrito en el presente documento, y determina que la muestra contiene ácido nucleico o anticuerpos de VJC. En algunas realizaciones, el proveedor del ensayo, p. ej., un proveedor de servicios o profesional sanitario, además puede determinar, p. ej., poniéndose en contacto con un profesional sanitario o un proveedor de servicios de base de datos, la cantidad de terapia anti-VLA-4 previa que un paciente ha recibido o si un paciente ha recibido previamente tratamiento con un inmunomodulador. El proveedor del ensayo además puede determinar que el sujeto no es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, o que el sujeto es candidato a recibir tratamiento con un inmunomodulador, o que el sujeto puede ser un candidato que debería recibir monitorización optimizada en comparación con un sujeto para el cual se ha determinado un estado VJC negativo (p. ej., que da negativo para ácido nucleico de VJC o anticuerpos anti-VJC). Por ejemplo, un candidato que ha recibido tratamiento previo con terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, y que no ha recibido terapia previa con un inmunosupresor, pero que se ha determinado VJC positivo, se puede seleccionar como candidato a recibir terapia anti-VLA-4 adicional, pero con la recomendación de que el paciente ha de ser monitorizado con mayor frecuencia en cuanto al desarrollo de síntomas adversos, tales como síntomas que puedan indicar el desarrollo de LMP.

En un caso, el proveedor del ensayo lleva a cabo una valoración del riesgo de desarrollar LMP descrito en el presente documento y determina que el sujeto es candidato a recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab. En un caso, el proveedor del ensayo informa a un profesional sanitario de que el sujeto es candidato para tratamiento con la terapia anti-VLA-4, y al candidato se le administra la terapia anti-VLA-4. Por ejemplo, el proveedor del ensayo puede determinar que un paciente presenta menor riesgo de desarrollar LMP y posteriormente informar al profesional sanitario sobre la determinación del riesgo menor y sobre el hecho de que el sujeto es candidato para tratamiento con la terapia anti-VLA-4.

En otro ejemplo, el proveedor del ensayo determina que un paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP y posteriormente informa a un profesional sanitario sobre la determinación del riesgo mayor y recomienda que el paciente es candidato para tratamiento con la terapia anti-VLA-4, pero que el paciente debería someterse a pruebas adicionales de LMP y, opcionalmente, de estado de VJC. En una realización, el proveedor del ensayo informa al profesional sanitario de que el paciente presenta mayor riesgo de desarrollar LMP y, por consiguiente, que el paciente debería recibir una alternativa a la terapia anti-VLA-4, o que el paciente es candidato a recibir terapia anti-VLA-4 con pruebas adicionales de LMP y, opcionalmente, de estado de VJC.

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

En un caso, un profesional sanitario o proveedor de seguros u otra entidad recomienda, p. ej., al paciente o a un segundo profesional sanitario, que un paciente se someta a una valoración de riesgo de desarrollar LMP como se describe en el presente documento.

Las herramientas de estratificación de riesgo de LMP son útiles como componente para tomar decisiones individuales sobre beneficio-riesgo de un tratamiento para pacientes que están tomando o considerando tomar un inhibidor de VLA4 u otros productos terapéuticos que se conoce aumentan el riesgo de desarrollar LMP. La cuantificación del riesgo de un paciente de desarrollar LMP se puede utilizar, por ejemplo, en un análisis de beneficio-riesgo.

Los encabezados, p. ej., (a), (b), (i), etc. se presentan simplemente para facilitar la lectura de la memoria descriptiva y las reivindicaciones. El uso de los encabezados en la memoria descriptiva o reivindicaciones no requiere que las etapas o elementos se lleven a cabo en orden alfabético o numérico o en el orden en el cual se presentan.

La invención se ilustra, además, mediante los siguientes ejemplos, los cuales no han de ser interpretados como restricciones adicionales.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. El riesgo de LMP en pacientes de EM se cuantificó por primera vez utilizando los dos factores de riesgo establecidos y el estado del anticuerpo anti-VJC conforme se determinó mediante un único ensayo ELISA de dos etapas basado en VLP de VP1

Procedimientos

Pacientes, muestras y recopilación de datos

Debido a la aparición infrecuente de LMP, se recopilaron datos sobre pacientes de LMP tratados con natalizumab de distintas fuentes incluyendo datos posteriores a la comercialización de la base de datos global de seguridad de natalizumab de Biogen Idec y de las pruebas clínicas al 4 de marzo de 2011. Los datos de uso previo de inmunosupresores no estaban disponibles para todos los pacientes expuestos a natalizumab; por lo tanto, la proporción de pacientes con y sin uso previo de inmunosupresores en el Programa de observación mundial de la seguridad de TYSABRI® (TYGRIS; NCT00477113, NCT00483847) se utilizó como una estimación de la población global tratada con natalizumab. TYGRIS es un estudio de observación de cohorte diseñado para obtener datos de seguridad a largo plazo en pacientes de EM tratados con natalizumab en un entorno de práctica clínica. La valoración de prevalencia de anticuerpos anti-VJC en la población de EM general se basó en una única muestra de referencia de plasma o suero recogida de pacientes de cuatro fuentes, incluyendo estudios clínicos de natalizumab en curso o completados (AFFIRM (Polman y col., N. Engl. J. Med. 354:899-910, 2006; STRATIFY-1 (NCT01070823), TYGRIS-US, y un registro de EM independiente de Suecia (disponible en Internet en msreg.net/cms/sv/home, al que se accedió el 3 de febrero de 2011)). Se desarrolló un plan clínico para la recogida a gran escala de muestras de suero y plasma obtenidas antes del diagnóstico de LMP incluyendo casos tanto de prueba clínica como posteriores a la comercialización.

Identificación de duración de tratamiento con natalizumab como factor de riesgo para LMP.

Las estimaciones de incidencia de LMP desde la reintroducción de natalizumab en el mercado se calcularon de acuerdo con la exposición a natalizumab posterior a la comercialización hasta el 28 de febrero de 2011, y el número de casos confirmados de LMP a mayo de 2011. La incidencia de LMP para cada período (duración acumulativa o intervalo de tratamiento de 12 meses) se calculó utilizando la cantidad de pacientes que desarrollaron LMP durante dicho período dividida por el número de pacientes que alguna vez estuvieron expuestos a natalizumab durante dicha cantidad de tiempo.

Identificación de uso previo de inmunosupresores como factor de riesgo para LMP.

Las historias clínicas de tratamiento con inmunosupresores de pacientes de EM tratados con natalizumab que desarrollaron LMP en el entorno posterior a la comercialización y las pruebas clínicas se obtuvieron en la base de datos mundial de seguridad de natalizumab de Biogen Idec al 2 de noviembre de 2010, y se compararon con los datos obtenidos en TYGRIS. Se escogió esta fecha de corte para historial de uso previo de inmunosupresores (contra 4 de marzo de 2011, para todos los demás datos) puesto que se espera que la inclusión de esto como factor de riesgo en el marcaje (diciembre de 2010 en la UE) (Prospecto. TYSABRI® (natalizumab). Biogen Idec. Weston, MA julio 2010; Resumen de características del producto. TYSABRI® (natalizumab). Biogen Idec. Weston, MA, 13 de diciembre de 2010) sea un factor de confusión.

Identificación de estado de anticuerpo anti-VJC como factor de riesgo para LMP.

La prevalencia global de anticuerpos anti-VJC en la población de EM general se determinó utilizando un único ensayo ELISA de dos etapas basado en VLP de VP1 como se describió anteriormente (Gorelik y col., Ann. Neurology, 2010). La prevalencia de anticuerpos anti-VJC en pacientes de EM con LMP donde había muestras de suero o plasma pre-LMP disponibles antes del diagnóstico también se determinó utilizando este ensayo y se comparó con la prevalencia global en la población de EM general.

Estimación de incidencia de LMP mediante estado serológico de anticuerpo anti-VJC

- 10 Se estimó la incidencia de LMP en pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo y negativo utilizando la incidencia global general de LMP, y la incidencia al cabo de 25-48 infusiones (el punto de tiempo después del cual el aumento de incidencia de LMP fue más pronunciado en este análisis), la prevalencia de anticuerpos anti-VJC en la población de EM general, y el número de pacientes de EM con LMP que tenían muestras pre-LMP disponibles que dieron
- 15 positivo para anticuerpo anti-VJC antes del diagnóstico. Se utilizó una prueba exacta de Fisher unilateral para comparar la incidencia estimada de LMP en pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo y anticuerpo anti-VJC negativo. Para proporcionar una estimación conservadora de incidencia de LMP en pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para evaluar el impacto de un caso hipotético de LMP con anticuerpo anti-VJC negativo en esta estimación. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para valorar
- 20 la certeza estadística de esta estimación variando el número de casos de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo.

Cuantificación de riesgo de LMP: uso previo de inmunosupresores, duración de tratamiento con natalizumab, y estado de anticuerpo anti-VJC positivo.

- 25 Se desarrollaron algoritmos de factor de riesgo para estimar la incidencia de LMP en pacientes con y sin ciertos factores de riesgo para LMP asociada a natalizumab y estado serológico de anticuerpo anti-VJC. Estos algoritmos se usaron para estimar riesgo de LMP por uso previo de inmunosupresores (sí o no), duración de tratamiento con natalizumab (1-24 meses y 25-48 meses), y estado de anticuerpo anti-VJC. Estos algoritmos de riesgo estaban basados en datos de incidencia de LMP por duración de tratamiento con natalizumab (1-24 o 25-48 meses) y en
- 30 estimaciones de uso previo de inmunosupresores en pacientes tratados con natalizumab de TYGRIS y en aquellos con LMP. Asimismo, la prevalencia global estimada de anticuerpos anti-VJC en la población de EM general se utilizó para imputar la incidencia de LMP asociada al estado serológico para el algoritmo de riesgo de tres factores, asumiendo que todos los casos confirmados de LMP asociada a natalizumab eran positivos para anticuerpos anti-VJC antes del diagnóstico. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para cuantificar el efecto de variar las
- 35 estimaciones utilizadas para desarrollar este algoritmo de tres factores de acuerdo con los valores más elevados y más reducidos que se observaron.

Resultados

40 Identificación de duración de tratamiento con natalizumab como factor de riesgo para LMP.

- Se identificaron, a nivel mundial, 102 casos confirmados de LMP al 4 de marzo de 2011. En general, el riesgo de desarrollar LMP aumentaba a medida que aumentaba la duración del tratamiento (Fig. 1A), produciéndose el mayor aumento de riesgo al cabo de dos años de terapia, con un pico en 1,68 casos cada 1.000 pacientes en el tercer año
- 45 (Fig. 1B). Los datos más allá del cuarto año fueron limitados.

Identificación de uso previo de inmunosupresores como factor de riesgo para LMP.

- El uso previo de inmunosupresores fue más común en pacientes tratados con natalizumab que desarrollaron LMP
- 50 en comparación con pacientes inscritos en TYGRIS, que representaban la población global de pacientes que recibían natalizumab. Cuarenta y cinco por ciento de los pacientes de LMP tratados con natalizumab habían recibido una o más terapias inmunosupresoras antes de iniciar el tratamiento con natalizumab, en comparación con el 20,3 % de pacientes tratados con natalizumab (13,9 % en EE. UU. y 23,6 % en la UE) de TYGRIS. Los inmunosupresores previos más comunes utilizados tanto en la población con LMP tratada con natalizumab como en TYGRIS incluían
- 55 mitoxantrona, metotrexato, ciclofosfamida, azatioprina y micofenolato sin que se haya observado ningún patrón específico en el tipo de inmunosupresor, duración de uso o período de lavado entre interrupción del inmunosupresor e inicio de natalizumab (Tabla 1).

Tabla 1. Historial de uso previo de inmunosupresores en pacientes con LMP asociada a natalizumab y en pacientes inscritos en TYGRIS.

Características	Totalidad de casos confirmados de LMP posteriores a la comercialización con uso previo de inmunosupresores (N = 32)	Pacientes de TYGRIS con uso previo de inmunosupresores (N = 792)
Inmunosupresores previos		
Mitoxantrona	18 (56%)	344 (43%)
Metotrexato	5 (16%)	45 (6%)
Azatioprina	5 (16%)	133 (17%)
Ciclofosfamida	6 (19%)	71 (9%)
Micofenolato	4 (13%)	48 (6%)
Otro	3 (9%)	201 (25%)
Duración de uso previo de inmunosupresores		
Intervalo	0,03-204 meses	<1-24 meses
Media	30·6 meses	10·1 meses
Período de lavado		
Intervalo	2-93 meses	<1-24 meses
Media	24·7 meses	8·5 meses

5 Cuantificación de riesgo de LMP: duración de tratamiento con natalizumab y uso previo de inmunosupresores

Quando los pacientes fueron estratificados por duración de tratamiento con natalizumab (1-24 o 25-48 meses) y por uso previo de inmunosupresores (sí o no), se identificaron cuatro subgrupos diferenciados de pacientes en cuanto a incidencia de LMP (Fig. 2). Tres de estos subgrupos tuvieron una incidencia de LMP estimada inferior o aproximadamente igual a 1 cada 1.000. El riesgo de LMP fue el más bajo en pacientes que fueron tratados con natalizumab durante 1-24 meses, y que no habían recibido terapia previa con inmunosupresores, 0,19 cada 1.000 (IC 95 %: 0-10-0·33). El cuatro subgrupo, incluyendo pacientes que tenían estos dos factores de riesgo para LMP, presentó el riesgo más elevado, con una incidencia de LMP estimada de 4·3 cada 1.000 (IC 95 %: 2·9-6·2).

15 Identificación de estado de anticuerpo anti-VJC como factor de riesgo para LMP.

5.896 pacientes de AFFIRM, TYGRIS-US, STRATIFY-1, y el Registro de EM de Suecia tenían una muestra de referencia disponible para pruebas de anticuerpos anti-VJC. La demografía, incluyendo duración de tratamiento con natalizumab e historial de uso previo de inmunosupresores, cuando estaban disponibles, fue similar entre estas fuentes de datos (Tabla 2). La prevalencia de anticuerpos anti-VJC global en la población de EM general valorada en este estudio fue 55 % (IC 95 %: 54-56 %).

Tabla 2. Prevalencia de anticuerpos anti-VJC y datos demográficos de población de EM general.

	AFFIRM (N=823)	TYGRIS-EE. UU. (N=1.480)	STRATIFY-1 (N=1.096)	Pacientes suecos de EM (N=2.497)
Prevalencia de anticuerpos anti-VJC	54·6 % (51·1-58·0)	47·6 % (45·0-50·1)	56·0% (53·0-59·0)	59·0% (57·0-60·9)
Edad (años)				
Intervalo	18-50	18-75	12-75	12-75
Media	35,9	44,3	44,4	37,5
Mediana	36	44	45	37
Género %				
Hombre	30·6 %	24·1 %	24·3 %	28·1 %
Mujer	69·4 %	75·9 %	75·7 %	71·9%
Geografía	Norteamérica y UE/Resto	EE. UU. y Canadá	EE. UU.	Suecia

	del mundo			
Inmunosupresor previo				
Uso (%)				
Sí	3·6 %	8·8 %	3·8 %	ND
No	96·4 %	91·2 %	96·2 %	ND

En el conjunto de datos de TYGRIS-EE. UU., 1.451 de 1.480 pacientes tenían información disponible sobre edad, género e inmunosupresor previo. En el conjunto de datos de STRATIFY-1, 988 de 1.096 pacientes tenían información disponible sobre inmunosupresor previo. En el conjunto de datos de EM en Suecia, 2.464 de 2.497

5 pacientes tenían información disponible sobre edad y 2.494 de 2.497 pacientes tenían información disponible sobre género. No había información disponible sobre uso previo de inmunosupresores (ND) en los pacientes suecos de EM.

Se obtuvieron una o más muestras pre-LMP de 25 pacientes de EM tratados con natalizumab 6,5-187 meses antes

10 del diagnóstico de LMP. Como se muestra en la Tabla complementaria 1, estos 25 pacientes tenían características clínicas que eran similares a los 102 casos confirmados de LMP en el mundo, no indicándose ningún sesgo de selección obvio. Todos los pacientes para quienes había muestras pre-LMP disponibles dieron positivo para anticuerpo anti-VJC en todos los puntos de tiempo, incluyendo aquellas muestras recogidas antes del inicio del tratamiento con natalizumab. El prevalencia del 100 % (25 de 25) de anticuerpo anti-VJC positivo en pacientes de

15 EM con LMP tratados con natalizumab antes del diagnóstico de LMP fue significativamente diferente respecto de la prevalencia esperada de 55 % observada en la población de EM general ($p < 0.0001$), demostrándose de este modo la capacidad del estado de anticuerpo anti-VJC como herramienta adicional de estratificación de riesgo de LMP.

Tabla complementaria 1. Características clínicas de 25 pacientes de EM con LMP con muestras pre-LMP en comparación con la totalidad de los 102 casos de LMP posteriores a la comercialización.

Características	Pacientes de EM con muestras pre-LMP, todos ellos positivos para anticuerpo anti-VJC (N=25)	Totalidad de casos confirmados de LMP posteriores a la comercialización (N=102)
Distribución geográfica		
EE. UU.	4 (16 %)	42 (41 %)
Europa/Resto del mundo	21 (84 %)	60 (59 %)
Edad en el momento del diagnóstico		
Intervalo	27 - 55	23 - 67
Media	40·7	44·6
Mediana	41	44
Género		
Hombre	8 (32 %)	32 (31 %)
Mujer	17 (68 %)	70 (69 %)
Duración de EM en el momento del diagnóstico (años)		
Intervalo	1·5 - 21	1·5 - 23
Media	12·2	11·9
Mediana	12·3	11·1
Exposición a TYSABRI® (mes)		
Intervalo	17 - 51	12 - 52
Media	33·0	30·8
Mediana	32	30
Inmunosupresores previos		
Sí	9 (38 %)	39 (42 %)
No	15 (63 %)	54 (58 %)

Se desconocía la fecha de inicio de EM para 5 pacientes en el grupo de anticuerpo anti-VJC positivo y para 38

pacientes en todo el grupo de LMP. Se desconocía el estado de uso previo de inmunosupresores para 1 paciente en el grupo de anticuerpo anti-VJC positivo y para 9 pacientes en el grupo global de LMP.

Estimación de incidencia de LMP mediante estado serológico de anticuerpo anti-VJC

5

Se estimó que la incidencia de LMP en pacientes que eran anticuerpo anti-VJC positivo era casi 2 veces la de la población global tratada con natalizumab (Tabla 4). Para estimar la incidencia global de LMP por estado de anticuerpo anti-VJC, se utilizó el siguiente procedimiento: De acuerdo con los 25 pacientes de EM tratados con natalizumab con muestras pre-LMP disponibles, se estimó que los 25 pacientes de EM con LMP provenían de
10 aproximadamente 20.276 pacientes que recibían tratamiento con natalizumab, de acuerdo con la tasa global de LMP, 1,23 cada 1.000 pacientes (Fig. 1). Asumiendo que 55 % de estos 20.276 pacientes eran anticuerpo anti-VJC positivo (es decir, 11.152 pacientes) y 45 % eran anticuerpo anti-VJC negativo (es decir, 9.124 pacientes), se estimó que la incidencia de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC positivo era 2,24 casos cada 1.000 pacientes tratados (=1.000x25/11.152), IC 95 %: 1,45-3,31, similar a la tasa estimada en la bibliografía (Tyler, Ann. Neurol. 68:271-274,
15 2010). A la inversa, la incidencia estimada de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC negativo era 0 casos cada 1.000 pacientes (IC 95 %: 0-0,40), significativamente diferente de la incidencia estimada en los pacientes anticuerpo anti-VJC positivo, $p < 0,0001$.

20 Tabla 4. Incidencia estimada de LMP por estado de anticuerpo anti-VJC de acuerdo con 25 casos de LMP que eran anticuerpo anti-VJC positivo antes del inicio de LMP.

	Número de casos de LMP	Total de pacientes tratados	Incidencia cada 1.000 pacientes (IC 95 %)
Incidencia global de LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab			
Anticuerpo anti-VJC positivo	25	11.152	2·24 (1·45, 3·31)
Anticuerpo anti-VJC negativo	0	9.124	0 (0, 0·40)
Total	25	20.276	1·23 (0·80, 1·82)
Valor de p		<0·0001	
RR (IC 95 %)		∞ (6·44, ∞)	
Incidencia de LMP después de 25-48 meses de terapia con natalizumab			
Anticuerpo anti-VJC positivo	18	4.533	3·97 (2·36, 6·27)
Anticuerpo anti-VJC negativo	0	3.709	0 (0, 0·99)
Total	18	8.242	2·18 (1·30, 3·45)
Valor de p		<0·0001	
RR (IC 95 %)		∞ (5·63, ∞)	
Análisis de sensibilidad: suposición de 1 paciente con LMP hipotética con anticuerpo anti-VJC negativo			
Anticuerpo anti-VJC positivo	25	11.598	2·16 (1·40, 3·18)
Anticuerpo anti-VJC negativo	1	9.489	0·11 (0·00, 0·59)
Total	26	21.087	1·23 (0·81, 1·81)
Valor de p		<0·0001	
RR (IC 95 %)		20·5 (3·35, 842)	

El efecto de la duración del tratamiento con natalizumab sobre esta estimación se valoró en un análisis utilizando la incidencia de LMP después de 25-48 meses de natalizumab (la duración de la terapia después de la cual el aumento de incidencia fue más pronunciado). El riesgo de LMP al cabo de 25-48 meses de terapia en pacientes anticuerpo anti-VJC positivo fue 3,97 cada 1.000 (IC 95 %: 2,36-6·27) y en pacientes anticuerpo anti-VJC negativo fue 0 cada 1,000 (IC 95 %: 0-0,99), Tabla 3.

En el momento de la redacción del presente documento, la incidencia de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC negativo no se pudo determinar por completo puesto que no hubo ningún caso de LMP que haya dado negativo para anticuerpo anti-VJC antes del diagnóstico. Por lo tanto, para estimar la incidencia de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC negativo, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad asumiendo que se había producido un caso hipotético

de LMP en un paciente anticuerpo anti-VJC negativo, permitiéndose de este modo la determinación de una estimación conservadora para la cual la tasa es probablemente inferior. Este análisis demostró una incidencia estimada de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC negativo al menos 20 veces inferior que en pacientes anticuerpo anti-VJC positivo, $p < 0.0001$ (Tabla 3).

5

El análisis de sensibilidad del efecto de aumentar el número de pacientes de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo con muestras pre-LMP disponibles que dieron positivo para el anticuerpo anti-VJC demostró que la certeza estadística referente al riesgo aumentado de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC positivo no mejoraba más allá de las 25 muestras pre-LMP disponibles (Tabla 5).

10

Tabla 5. Efecto de los números crecientes de casos de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo sobre la certeza estadística de las estimaciones de incidencia de LMP en pacientes anticuerpo anti-VJC positivo.

Número de casos de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo analizados antes del diagnóstico de LMP	Incidencia de LMP cada 1.000 pacientes				Unilateral valor de p
	Anticuerpo anti-VJC negativo		Anticuerpo anti-VJC positivo		
	Incidencia	IC 95 %	Incidencia	IC 95 %	
10		0, 1·01		1·08, 4·12	p=0·025
25	0	0, 0·40	2·24	1·45, 3·31	P<0·0001
30		0, 0·34		1·51, 3·20	
40		0, 0·25		1·60, 3·05	
50		0, 0·20		1·66, 2·95	
60		0, 0·17		1·71, 2·88	

Cuantificación de riesgo de LMP: duración de tratamiento con natalizumab, uso previo de inmunosupresores, y estado de anticuerpo anti-VJC

15

Se desarrolló un algoritmo de riesgo de LMP cuantitativo combinado para pacientes de EM tratados con natalizumab de acuerdo con la duración del tratamiento con natalizumab, uso previo de inmunosupresores y estado de anticuerpo anti-VJC (Fig. 3). Puesto que la exposición a VJC es un requerimiento para LMP, los pacientes que eran anticuerpo anti-VJC negativo representaban el subgrupo de riesgo más bajo en el algoritmo de estratificación de riesgo de LMP con un riesgo estimado de ≤ 0.11 cada 1.000 (IC 95 %: 0.0-0.59) de acuerdo con la estimación conservadora determinada en el análisis de sensibilidad. A la inversa, el grupo de mayor riesgo está compuesto por aquellos pacientes que eran anticuerpo anti-VJC positivo, con uso previo de inmunosupresores, y que habían sido tratados con natalizumab durante 25-28 meses. En este algoritmo se asumía que la totalidad de los 102 casos confirmados de LMP eran positivos para anticuerpos anti-VJC antes del diagnóstico de LMP. Para el subgrupo de mayor riesgo (pacientes que tenían los tres factores de riesgo), el riesgo de LMP estimado era aproximadamente 7,8 cada 1.000 (IC 95 %: 5.2-11.3). Para los pacientes que eran anticuerpo anti-VJC positivo sin uso previo de inmunosupresores, el riesgo de LMP coincidía con el riesgo en la población global tratada con natalizumab en puntos de tiempo similares (Fig. 1A y 1B). El análisis de sensibilidad del efecto de variar las estimaciones utilizadas para desarrollar este algoritmo dio como resultado valores mínimos y máximos que, en general, eran coherentes con las estimaciones originales observadas en el escenario de caso base (Véanse las Fig. 4A y 4B). El riesgo en los pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo se determinó asumiendo que se había producido un caso hipotético de LMP en un paciente con anticuerpo anti-VJC negativo.

20

25

30

35

40

Este análisis modificaba la prevalencia de anticuerpo anti-VJC en la población de EM general de 48 % (conforme se observó en TYGRIS-EE. UU.) a 59 % (conforme se observó en el Registro independiente de Suecia), el uso previo de inmunosupresores en la población de EM tratada con natalizumab de 14 a 24 % (de acuerdo con las estimaciones de EE. UU. y UE en TYGRIS respectivamente) y las estimaciones de exposición a natalizumab durante 25-48 meses de 35 a 45 % (de acuerdo con la estimación actual de 40 % y un aumento aproximado de 10 % durante el último año). Los gráficos representan las estimaciones con puntos y los intervalos de 95 % de confianza para cada escenario (caso base, mínimo y máximo). En general, el escenario de caso base era relativamente coherente con las

estimaciones mínima y máxima.

Puesto que para el desarrollo de LMP se requiere infección con VJC, el riesgo de LMP más bajo fue determinado en pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo, ≤ 0.11 casos cada 1.000 pacientes tratados con natalizumab (IC 95 % 0-0,59), independientemente de otros factores de riesgo, al menos 20 veces menor que en pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo, $p < 0,0001$. Si bien hasta la fecha no ha habido casos de LMP en pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo, el riesgo verdadero de desarrollar LMP no puede ser cero puesto que el ensayo de anticuerpos anti-VJC tiene una tasa analítica de falsos negativos estimada entre 2,5 y 3,2 %^{1, 19}. A la inversa, el riesgo de LMP fue el más elevado en pacientes que tenían los tres factores de riesgo (tratamiento con natalizumab durante 25-48 meses, uso previo de inmunosupresores y estado de anticuerpo anti-VJC positivo) con una incidencia estimada de 7,8 casos cada 1.000 pacientes (IC 95 %: 5.2-11.3).

Ejemplo 2. El ensayo ELISA de anticuerpos anti-VJC se validó en laboratorios clínicos para demostrar la solidez del procedimiento.

Un ensayo novedoso de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de 2 etapas que detecta anticuerpos anti-VJC en suero o plasma humano fue descrito recientemente (véase PCT/US2011/020832). Los atributos clave del ensayo incluyen componentes de competencia tanto de unión directa como en disolución; uso de preparaciones bien caracterizadas de partículas similares a virus JC (VLP); inclusión de muestras de control de calidad apropiadas (CC); determinación estadística de puntos de corte de ensayo utilizando un gran número de muestras clínicas recogidas longitudinalmente; normalización de la señal del ensayo; y detección de varios isotipos de anticuerpos anti-VJC (incluyendo IgG, IgM, IgA e IgE).

El ensayo ELISA de anticuerpos anti-VJC se validó en tres laboratorios clínicos para demostrar la solidez del procedimiento. La validación analítica se llevó a cabo mediante evaluación de precisión dentro del mismo ensayo o entre ensayos, especificidad y sensibilidad analítica, interferencia de matriz, solidez y estabilidad de reactivo.

La estabilidad de los anticuerpos anti-VJC en muestras de suero y plasma fue demostrada utilizando muestras de CC de ensayo preparadas a partir de sueros humanos en lotes así como muestras de suero y plasma de donantes individuales. Los anticuerpos anti-VJC demostraron ser estables en suero o plasma a través de 6 ciclos de congelación/descongelación y durante 14 días cuando se almacenaron tanto a temperatura ambiente (18-25 °C) como a 2-8 °C. De manera adicional, también se demostró la estabilidad de los anticuerpos anti-VJC en sangre entera almacenada a 2-8 °C, a temperaturas ambiente (18-25 °C), o a 37 °C durante 7 días, 7 días y 3 días, respectivamente, antes del procesamiento utilizando tubos para extracción de suero y plasma. Se demostró la estabilidad de la VLP de JC a través de 4 ciclos de congelación/descongelación y durante 18 meses a 2-8 °C.

La validación analítica demostró que el ensayo es sensible, específico y preciso. Se estimó que la sensibilidad del ensayo era de 1,7 ng/mL utilizando un control de anticuerpo monoclonal anti-VJC humanizado y de 1,25 µg/mL utilizando un anticuerpo policlonal purificado de sueros con anticuerpo anti-VJC positivo. Se estimó que la sensibilidad para detectar infección con VJC fue 97,5 %. También se demostró la especificidad del ensayo para discriminar anticuerpos específicos de VJC de anticuerpos dirigidos a virus BK, un poliovirus relacionado. La precisión media entre ensayos y dentro del mismo ensayo fue de aproximadamente 6,4 % y 12,2 % para la etapa de cribado y 2,6 % y 5,3 % para la etapa de confirmación. Los resultados obtenidos para plasma y suero fueron sumamente congruentes y la solidez del ensayo fue demostrada mediante los resultados sumamente concordantes generados por 3 laboratorios que analizaron un panel de 100 muestras ciegas.

Ejemplo 3. Un ensayo refinado de VJC de dos etapas (el ensayo Gen2) proporciona resultados más precisos que el ensayo original (ensayo Gen1).

El ensayo de anticuerpos anti-VJC de dos etapas fue modificado después de rondas de optimización. El nuevo ensayo difiere del primero al menos en lo que sigue:

- Se utiliza HPVLP con una concentración de sustrato de 0,4 µg/mL en placas en la primera etapa, y en disolución en el ensayo confirmatorio, en contraposición a 1 µg/mL utilizado en el ensayo Gen1;
- El suero del paciente se diluye 1:101 antes de aplicar a HPVLP en placas en la primera etapa del ensayo, o a HPVLP en disolución en el ensayo confirmatorio, en contraposición a 1:200 en el ensayo Gen1;
- El reactivo secundario (IgG anti-humana) conjugado con HRP normalmente se diluye 1:20.000 (pero puede ser necesario ajustarlo en nuevos lotes para hacer coincidir la señal con un lote previo), y el tiempo de incubación con el conjugado es solo 30 min. En el ensayo Gen1, se diluyó el mismo reactivo 1:80.000 y el tiempo de incubación fue

60 min;

- se analiza la reacción de unión incubando la TMB en sustrato de HRP durante 20 minutos $\pm$ 2 minutos, mientras que en el ensayo Gen1, la incubación de la TMB fue durante 20 minutos $\pm$ 5 minutos;

- En el ensayo de confirmación, se añaden 10 μ l de la muestra a 1 mL de tampón de confirmación (dilución 1:101), y la reacción continúa durante 10 a 20 minutos. En el ensayo Gen1, una concentración de 2x de la muestra (dilución 1:100) y HPVLP (2 μ g/mL) se mezcló en proporciones iguales y a continuación se incubó durante 60 minutos.

- El calibrador de corte (CO) se ajusta para tener un índice de reactividad de alrededor de 1,0 de DON, y un control positivo (CP) se ajusta para tener un índice de reactividad de alrededor de 1,3 de DON. El CO y el CP se producen mezclando un suero con anticuerpo anti-VJC positivo y un suero con anticuerpo anti-VJC negativo. Para el control negativo (CN), que es normalmente un suero negativo en frasco, el índice de reactividad meta es alrededor de 0,1; En términos de calidad, los controles provienen de distintos lotes de suero humano, pero a partir de una concentración meta del ensayo, son similares a los niveles de control de Gen1.

Los resultados del estudio de acuerdo clínico Gen2 de VJC se resumen en la Tabla 6 que se muestra a continuación. Todas las pruebas de Gen1 se llevaron a cabo en un laboratorio de referencia Focus Diagnostics (Cypress, CA), y entre los sitios de prueba para el ensayo Gen2 se incluían Denver (n: global= 275; con TYSABRI®= 149; Sin tratamiento previo= 126); Nueva York (n: global= 275; con TYSABRI®= 136; Sin tratamiento previo= 139); y Focus Diagnostics (n= global 262; con TYSABRI®= 95; Sin tratamiento previo= 167). El acuerdo porcentual se expresa como límite inferior y superior (Gen2/Gen1) del intervalo de confianza de 96 % (IC 95 %: LI a LS).

Tabla 6. Resultados del estudio de acuerdo clínico Gen2 de VJC

	Global		Pacientes con TYSABRI®		Pacientes sin tratamiento previo	
Sitio de prueba	% de acuerdo negativo (PAN)	% de acuerdo positivo (PAP)	% de acuerdo negativo (PAN)	% de acuerdo positivo (PAP)	% de acuerdo negativo (PAN)	% de acuerdo positivo (PAP)
Denver	86,5 % (115/133) IC 95 %: 79,6 a 91,3 %	97,2 % (138/142) IC 95 %: 93 a 98,9 %	85,7 % (60/70) IC 95 %: 75,7 a 92,1 %	94,9 % (75/79) IC 95 %: 87,7 a 98 %	87,3 % (55/63) IC 95 %: 76,9 a 93,4 %	100 % (63/63) IC 95 %: 94,3 a 100 %
Nueva York	88,8 % (119/134) IC 95 %: 82,4 a 93,1 %	100 % (141/141) IC 95 %: 97,3 a 100 %	89,5 % (51/57) IC 95 %: 78,9 a 95,1 %	100 % (79/79) IC 95 %: 95,4 a 100 %	88,3 % (68/77) IC 95 %: 79,3 a 93,7 %	100 % (62/62) IC 95 %: 94,2 a 100 %
Focus Diagnostics	90,2 % (101/112) IC 95 %: 83,3 a 94,4 %	100 % (150/150) IC 95 %: 97,5 a 100 %	87,2 % (34/39) IC 95 %: 73,3 a 94,4 %	100 % (56/56) IC 95 %: 93,6 a 100 %	91,8 % (67/73) IC 95 %: 83,2 a 96,2 %	100 % (94/94) IC 95 %: 96,1 a 100 %

Ejemplo 4. El estado de anticuerpo anti-VJC se puede utilizar para categorizar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP.

Se formuló la hipótesis de que los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo podían ser estratificados de manera adicional en cuanto al riesgo de desarrollar LMP de acuerdo con titulaciones de anticuerpos anti-VJC (DON o índice) y avidez/afinidad de anticuerpos anti-VJC (% inhibición). Esta hipótesis se derivó de la observación de que los pacientes con una titulación y % de inhibición de anticuerpos anti-VJC por debajo de un nivel predeterminado («un punto de corte clínico») presentan menor riesgo de desarrollar LMP en comparación con la población global con anticuerpo anti-VJC positivo. Para determinar el riesgo relativo de LMP sugerido por el estado de titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos, las titulaciones y porcentaje de inhibición de anticuerpos anti-VJC se pudieron calcular antes de comenzar con TYSABRI® (natalizumab) o cuando los pacientes ya estaban recibiendo TYSABRI®.

Para determinar el riesgo relativo de LMP sugerido por el estado de titulación y porcentaje de inhibición de anticuerpos en combinación con otros factores de riesgo, se recopilaron y analizaron datos preexistentes de dos ensayos de anticuerpos anti-VJC distintos («Generation I» y «Generation II»). Los datos preexistentes incluían información de titulación de anticuerpos anti-VJC expresada como «DON» o «índice».

En el ensayo Generation I, 22 % (77/356) de pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo tenían DON >1,0 (C-1801), y 34 % (13/38) de pacientes de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo tenían DON >1,0 (C-1801). Por lo tanto, ~1,5

veces más de pacientes de LMP tienen una DON >1,0 en comparación con los pacientes no de LMP. Esto se traduce en una relación de riesgo de 2-3 veces asociada con una DON >1,0.

También se observó que 6 % de los pacientes no de LMP con TYSABRI® tenían >2 veces de cambio en titulación de anticuerpos anti-VJC (DON) para muestras longitudinales recogidas a lo largo de >2 años (C-1801). No obstante, la mayor parte de los pacientes de LMP con muestras longitudinales recogidas en puntos de tiempo informativos (>1 año antes del diagnóstico de LMP, y dentro de los 6 meses del diagnóstico de LMP y en el momento del diagnóstico de LMP) mostraron un aumento de >2 veces en la titulación de anticuerpos anti-VJC (DON). Esto sugiere que los pacientes que no muestran un cambio significativo en titulación de VJC en el tiempo presentan menor riesgo de desarrollar LMP.

En las Fig. 5A-10B, se proporcionan titulaciones de anticuerpos y DON ejemplares. En la Tabla 7 se resumen los datos de los pacientes.

En la Fig. 11 se muestra un gráfico del análisis estadístico.

El análisis estadístico indicó que para porcentaje de inhibición, ~17 % de las muestras con anticuerpo positivo son inferiores a 0,502, y ~0 % de muestras de LMP son inferiores a 0,502. ~30 % de las muestras con anticuerpo positivo son inferiores a 70 % de inhibición, y ~0 % de las muestras de LMP (con índice <3,0) son inferiores a 70 % de inhibición.

Tabla 7. Titulaciones de anticuerpos anti-VJC y mediciones de DON en pacientes.

Paciente	Diagnóstico	DON o índice	Titulaciones
1	09oct09	Relación:	Relación:
		1,077/0,258= ~4 veces entre primera y segunda prueba	5.400/600= 9 veces entre primera y segunda prueba
2	16feb05	Constantemente elevado/a (>1,0)	Constantemente elevado/a (16.200)
3	08oct09	Relación: 0,385/0,129= ~3 veces entre primera y segunda prueba	Relación: 600/200= 3 veces entre primera y segunda prueba
		(aumentado/a)	(aumentado/a)
4	16feb10	Relación: 0,628/0,309= ~2 veces entre primera y segunda prueba	Relación: 1.800/600= 3 veces entre primera y segunda prueba
		(aumentado/a)	(aumentado/a)
5	14jun09	Sin aumento	Sin aumento
6	Desconocido	Sin aumento	Sin aumento
7	11jul08	Relación: 0,639/0,226= ~2,8 entre primera y segunda prueba	Relación: 1.800/200= 9 veces entre primera y segunda prueba
		(aumentado/a)	(aumentado/a)

Ejemplo 5. Se ha introducido en la práctica clínica un ensayo analíticamente validado de anticuerpos anti-VJC para estratificar pacientes de EM en cuanto a mayor o menor riesgo de desarrollar LMP.

El objetivo del estudio que se detalla a continuación fue valorar los cambios de titulación de anticuerpos anti-VJC antes y después de comenzar tratamiento con natalizumab.

El ensayo de anticuerpos anti-VJC (Gorelik y col., Ann. Neurol. 2010) se aplicó a muestras de pacientes suecos de EM tratados con natalizumab, incluyendo cinco pacientes con LMP positiva. Se estudiaron valores de DO normalizada (DON) del ensayo de anticuerpos anti-VJC antes y durante el tratamiento con natalizumab. Las muestras positivas se diluyeron en etapas de dilución 1:3 para determinar niveles de titulación. Una proporción de los mismos pacientes también fue analizada en cuanto a anticuerpos contra un antígeno de citomegalovirus (CMV) humano nuclear (Schmitz y col., J. Clin. Microbiol. 1977), y anticuerpos contra el antígeno de glicoproteína E del virus de varicela-zóster (VZV) recombinante (Thomsson, J. Virol. Methods 2011).

Tabla 8. Pacientes con análisis de anticuerpos anti-VJC.

Características	Mujer	Hombre	Todos
-----------------	-------	--------	-------

Pacientes (n, %)	603 (70 %)	258 (30 %)	861
Edad (mediana, intervalo)	37 (13-60)	36 (12-63)	36 (12-63)
Tiempo entre muestras en pares (mediana, intervalo)	12 (1-38)	12 (1-36)	12 (1-38)
Pacientes con tiempo entre muestras emparejadas 1 a 8 meses (n, % todos los pacientes)			244 (28 %)
Pacientes con tiempo entre muestras emparejadas 8 a 18 meses (n, % todos los pacientes)			296 (34 %)
Pacientes con tiempo entre muestras emparejadas >18 meses (n, % todos los pacientes)			321 (37 %)

Después de comenzar tratamiento con natalizumab, los niveles de anticuerpos anti-VJC permanecieron relativamente estables con un leve descenso en los niveles de DOn observado en los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo. El descenso aparente en los niveles de anticuerpos anti-VJC (DOn) se observó cuando los pacientes 5 recibían tratamiento con natalizumab (n=471) pero no durante la terapia anterior con interferón beta (n=210). Esto indica un efecto potencial de la terapia con natalizumab en los niveles de anticuerpos anti-VJC, sin afectar de manera significativa el estado serológico y la tasa de seropositividad (previo: 56 %; posterior 55 %).

Después de comenzar tratamiento con natalizumab, descendieron levemente los niveles de anticuerpos anti-VZV 10 (DO) (n=715), pero no de anticuerpos anti-CMV (n=502).

Para los 5 pacientes que desarrollaron LMP, el cambio observado en los niveles de anticuerpos anti-VJC (DOn) en suero se resume en la Tabla 9 que se incluye a continuación. Los niveles de anticuerpos anti-VJC (DOn) en suero aumentaron en el momento del diagnóstico de LMP en comparación con los valores de referencia.

15

Tabla 9. Cambio en DOn durante el tratamiento con natalizumab

Paciente de LMP	Meses tratado con natalizumab antes de diagnóstico de LMP	Δ DOn entre tiempo de inicio de tratamiento con natalizumab y tiempo de diagnóstico de LMP
1	~25	0,348
2	~29	0,284
3	~34	0,190
4	~49	0,932
5	~25	0,175

De este estudio se puede concluir que la terapia con natalizumab puede producir un leve descenso en los niveles de anticuerpos anti-VJC (DOn) sin afectar la tasa de seropositividad de VJC. En particular, solo 5 % de la población de referencia con anticuerpo anti-VJC positivo mostró un cambio en los valores de DOn (Δ DOn) por encima de 0,151 20 (95 %-percentil), mientras que esto se observó en todos los 5 casos de LMP de Suecia en el momento del diagnóstico en comparación con los valores de referencia. Por lo tanto, la investigación de un aumento en los niveles de anticuerpos anti-VJC durante la terapia con natalizumab, antes del diagnóstico de LMP, en el contexto de estratificación de riesgo de LMP, está garantizada.

25

Ejemplo 6. Uso de un corte clínico diferenciado del corte analítico para definir grupos de alto y bajo riesgo entre pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo.

Los resultados del estudio Stratify I se utilizaron para determinar un corte clínico diferenciado de un corte analítico 30 con el propósito de definir grupos de alto y bajo riesgo entre los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo. Por lo tanto, el riesgo de un paciente de desarrollar LMP se basaría inicialmente en niveles de titulación de anticuerpos anti-VJC de referencia. En este estudio se utilizó el ensayo de anticuerpos anti-VJC Generation II.

Se evaluaron los pacientes no de LMP con TYSABRI® (Stratify I, n= 1.044) y los pacientes de LMP (>6 meses antes 35 de diagnóstico de LMP (n= 38) (Fig. 12). En el ensayo Generation II, 17 % de los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo tenían titulaciones (índice) por debajo de la titulación (índice) más baja observada para muestras de pacientes de LMP recogidas >6 meses antes del diagnóstico de LMP, lo cual sugería que esos pacientes pueden presentar menor riesgo de desarrollar LMP (como los pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo). De manera adicional, 50 % de los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo tenía titulaciones (índice) por debajo del índice 1,5, 40 en comparación con solo 13 % de pacientes de LMP de los cuales se extrajeron muestras >6 meses antes del

diagnóstico de LMP que tenían un índice <1,5. Asimismo, solo 4,4 % de los pacientes de LMP que no se sabía si habían recibido previamente agentes inmunosupresores tenían muestras con un índice <1,5, lo cual sugería que dichos pacientes podían presentar un riesgo menor de desarrollar LMP en comparación con pacientes con titulación de anticuerpos anti-VJC elevada (DON o índice).

Se determinó que los pacientes con una DON <0,5 (109/1.044 (10,4 % del total de muestras) o 109/549 (20 % de los pacientes con anticuerpo anti-VJC positivo)) estaban en el grupo de riesgo de LMP más bajo (potencialmente tan bajo como los pacientes con anticuerpo anti-VJC negativo), puesto que ningún paciente de LMP tenía un índice <0,5. Se determinó que los pacientes con un índice >0,5 pero <1,5 estaban en la zona de riesgo más bajo, puesto que 50 % de los pacientes no de LMP con anticuerpo anti-VJC positivo y solo 13 % de los paciente de LMP, respectivamente, tenían muestras en esta zona. Asimismo, solo 4 % de los paciente de LMP que no se sabía si habían recibido terapias inmunosupresoras previas tenían muestras con índice <1,5 (Fig. 13). Se determinó que los pacientes con un índice >1,5 (271/549 (50 %) de población con anticuerpo anti-VJC positivo) presentaban mayor riesgo de desarrollar LMP. Cuarenta y siete por ciento de los pacientes eran negativos para anticuerpo anti-VJC.

Después del diagnóstico de LMP, los pacientes se someten a inmuno-adsorción (IA) o intercambio de plasma (PLEX) para eliminar el natalizumab de la circulación y recuperar la función inmune. Los niveles de anticuerpos anti-VJC vuelven rápidamente a los niveles previos al procedimiento en estos pacientes.

Ejemplo 7. Metodología estadística propuesta para asignar riesgos estratificados a pacientes de Esclerosis múltiple (EM) que están bajo tratamiento con TYSABRI® que ya han dado positivo para anticuerpos anti-VJC en el ensayo anti-VJC refinado de dos etapas descrito en el presente documento.

Para el estudio STRATIFY-II (Reunión de la Academia Estadounidense de Neurología (AAN), 21-28 de abril de 2012, resumen S041.002), se evaluarán dos estrategias alternativas (denominadas Estrategias 1 y 2) para asignar riesgo de LMP a pacientes sero-positivos para anticuerpos anti-VJC. La Estrategia 1, la más conservadora de los dos procedimientos, será un refinamiento de una de las regiones de tolerancia bivariadas no paramétricas proporcionadas en el informe adjunto. La Estrategia 2, cuya metodología estadística se ilustra a continuación, debería asignar una proporción mayor de sero-positivos para anticuerpos anti-VJC futuros respecto de bajo riesgo de desarrollar LMP en comparación con la Estrategia 1.

La Estrategia 2 concibe una región de tolerancia simultánea inferior en torno a una ecuación ajustada que mide % de inhibición vs. índice para una muestra de paciente de LMP. Si bien la Estrategia 1 construye una región de bajo riesgo de acuerdo con las mediciones de % de inhibición/índice a partir del ensayo anti-VJC de dos etapas en pacientes de STRATA (Ann. Neurol., 68:295-303, 2010) y STRATIFY-I (Ann. Neurol., 70:742-750, 2011) (casi todos los que se suponen presentan un riesgo muy bajo de desarrollar LMP), la Estrategia 2 construye una región de alto riesgo de acuerdo con las mediciones recogidas de pacientes de EM antes de sus fechas de diagnóstico de LMP. Aunque nuestra recogida limitada de muestras de LMP puede no ser representativa del universo completo de pacientes de EM tratados con Tysabri infectados con LMP, la Estrategia 2 supone que la relación de % de inhibición vs. índice en estas muestras es representativa del universo de LMP antes del diagnóstico. Esta suposición fue respaldada estadísticamente por datos de LMP anti-VJC que mostraban una relación de % de inhibición vs. índice paralela a la de STRATIFY-1+STRATA. Es este paralelismo que explotado por la Estrategia 2 modelará la relación de % de inhibición vs. índice de LMP.

La relación entre % de inhibición e índice se modelará primero en términos estadísticos para el conjunto combinado de muestras de STRATIFY-1/STRATA/LMP. La ecuación ajustada a % de inhibición vs. índice distinguirá entre muestras de LMP y de STRATIFY-1/STRATA. Se construirá entonces una región de tolerancia simultánea de 95 % o 99 % inferior en torno a la ecuación ajustada limitada para las muestras de LMP. A los sero-positivos para anticuerpos anti-VJC futuros con mediciones de % de inhibición/índice comprendidas en esta región de tolerancia se les asignará un mayor riesgo de desarrollar LMP; esta región de tolerancia debería garantizar que a al menos 95 % (o 99 %) de las muestras de pacientes de LMP antes de su diagnóstico se les asignará un riesgo mayor. Cabe mencionar que a las muestras futuras con mediciones de índice >2,5 se les asignará automáticamente un riesgo mayor de desarrollar LMP.

Detalles estadísticos El modelo mixto que se incluye a continuación (o un refinamiento correspondiente) se ajustará en primer lugar utilizando el procedimiento SAS MIXED a un conjunto combinado de mediciones de % de inhibición/índice de muestras de STRATIFY-1 + STRATA + LMP anti-VJC de Gen-2.

$$Y_{ij} = \beta_0 + \delta \times W + \beta_1 \times X^+ + \beta_{11} \times X^+ \times X^+ + \pi_i + \varepsilon_{ij}$$

(1)

donde

- 5 Y (o proporción logarítmica) = $-\log_e\{1-\%inhibición/100\}$;
 X^+ = índice si $\text{índice} < x_0 = x_0$ para $x_0 \leq \text{índice} \leq 2,5$;
 $W=0$ si la muestra se extrajo de un paciente de STRATIFY-1 o STRATA =1 si la muestra se extrajo de un paciente de LMP antes del diagnóstico;
 π_i =efecto aleatorio para paciente i ;
10 ε_{ij} =medición de ensayo aleatoria+error longitudinal para el j-ésimo punto de tiempo del i-ésimo paciente;
las ε_{ij} se suponen normal e independientemente distribuidas con media cero y varianza σ^2 ; los π_i se asumen normal e independientemente distribuidos con media cero y varianza

σ_p^2 ;

- 15 las ε_{ij} y π_i se suponen independientes. Por lo tanto, para el modelo mixto en la ecuación (1), X^+ y W son efectos fijos, mientras que π_i y ε_{ij} son efectos aleatorios. Una estimación preliminar de x_0 fue 1,77 pero será refinada. Se construirá una región de tolerancia simultánea de 95 o 99 % inferior en torno a la ecuación ajustada (ref. 1-5). Los límites inferiores de la región de tolerancia como función de nivel de índice posteriormente se transformarán en % de inhibición. Las muestras futuras cuyas mediciones de % de inhibición/índice o bien están comprendidas en la región de tolerancia o tienen mediciones de índice $>2,5$ serán consideradas con mayor riesgo de desarrollar LMP.

La Tabla 10 que se muestra a continuación proporciona porcentajes estimados de positivos para anticuerpos anti-VJC que se clasificarán como riesgo inferior de acuerdo con distintas DON.

- 25 Tabla 10. Porcentajes estimados de positivos para anticuerpos anti-VJC que se clasificarán como riesgo inferior de acuerdo con distintas DON.

Regla de medición de índice para asignación a riesgo inferior de desarrollar LMP	Porcentaje empírico de sero-positivos de STRATIFY-1 no de LMP asignado a menor riesgo de desarrollar LMP	Porcentaje estimado de sero-positivos futuros no de LMP asignado a menor riesgo de desarrollar LMP con 95 % de confianza	Proporción estimada de sero-positivos pre-LMP mal clasificados con menor riesgo de desarrollar LMP (de acuerdo con un Weibull ajustado a 39 muestras de paciente independientes extraídas antes del diagnóstico)**	Porcentaje estimado de sero-positivos pre-LMP futuros mal clasificados con menor riesgo de LMP (con 95 % de certeza de confianza)	Porcentaje empírico de extracción interna de sero-positivos pre-LMP mal clasificados con menor riesgo de LMP*
$\leq 0,40$	11,1 % (66/595)	$\geq 9,2$ %	0,4 %	$\leq 1,2$ %	0 % (0/153)
$\leq 0,50$	16,0 % (95/595)	$\geq 13,7$ %	0,8 %	$\leq 2,0$ %	0,65 % (1/153)
$\leq 0,65$	22,7 % (135/595)	$\geq 20,0$ %	1,7 %	$\leq 3,6$ %	4,58 % (7/153)
$\leq 0,70$	25,2 % (205/595)	$\geq 22,5$ %	2,0 %	$\leq 4,2$ %	4,58 % (7/153)
$\leq 0,75$	25,7 % (153/595)	$\geq 22,9$ %	2,4 %	$\leq 5,0$ %	8,50 % (13/153)
$\leq 1,00$	34,5 % (205/595)	$\geq 31,4$ %	5,4 %	$\leq 9,6$ %	11,76 % (18/153)
$\leq 1,25$	41,0 % (244/595)	$\geq 37,8$ %	9,7 %	$\leq 15,7$ %	15,69 % (24/153)
$\leq 1,50$	46,9 % (279/595)	$\geq 43,6$ %	15,6 %	$\leq 22,2$ %	22,22 % (34/153)

*Estimaciones sesgadas de población pre-LMP debido a números múltiples y desiguales de mediciones en donantes que son pacientes.

**Ajuste estimado de acuerdo con promedio de 1.000 simulaciones donde se seleccionó aleatoriamente 1

punto de tiempo por paciente pre-LMP.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP), comprendiendo el procedimiento:
5 determinar una titulación de anticuerpos de virus JC (VJC), expresada como un valor de índice en una muestra de suero o plasma del paciente donde se determina que el paciente presenta un riesgo elevado si se determina que el valor de índice de anticuerpos de VJC es $>1,5$;
10 donde se determina el valor de índice normalizando un valor de DO de la muestra a un calibrador de corte, donde el calibrador de corte se ajusta para tener un valor de DO de 1, donde el calibrador de corte comprende una mezcla de suero positivo para anticuerpos de VJC y de suero negativo para anticuerpos de VJC,
15 donde normalizar un valor de DO de un control negativo que comprende suero negativo para anticuerpos de VJC al calibrador de corte da como resultado un valor de índice de 0,1, y
donde la titulación de anticuerpos de VJC se determina mediante un ensayo ELISA para detectar anticuerpos de VJC en la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la titulación de anticuerpos de VJC se vuelve a analizar en intervalos de 6 o 12 meses, donde un aumento en la titulación o porcentaje de inhibición de anticuerpos indica un aumento en el riesgo del paciente de desarrollar LMP.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que además comprende:
25 (a) determinar si el paciente ha recibido tratamiento con natalizumab durante más de 24 meses; y/o
(b) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada, donde la terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada se selecciona de entre mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato, terapia anti-CD20, terapia anti-CD11a y micofenolato de mofetilo.
30
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el paciente se clasifica como con mayor riesgo de desarrollar LMP si el paciente ha recibido natalizumab durante más de 24 meses, y no ha recibido previamente una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada, donde la terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 determinada se selecciona de entre mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato, terapia anti-CD20, terapia anti-CD11a y micofenolato de mofetilo.
35
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende monitorizar los pacientes en cuanto al desarrollo de LMP, opcionalmente donde dicha monitorización incluye RM para identificar lesiones cerebrales.
40
6. El procedimiento de evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
45 (a) determinar si un nivel de anticuerpos anti-VJC es mayor que un valor de índice de 1,5;
(b) determinar si el paciente ha recibido natalizumab durante más de 24 meses; y
(c) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4, donde la terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 se selecciona de entre mitoxantrona, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida, micofenolato, terapia anti-CD20, terapia anti-CD11a y micofenolato de mofetilo; y, en respuesta a las
50 determinaciones, evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el paciente está recibiendo tratamiento con natalizumab.

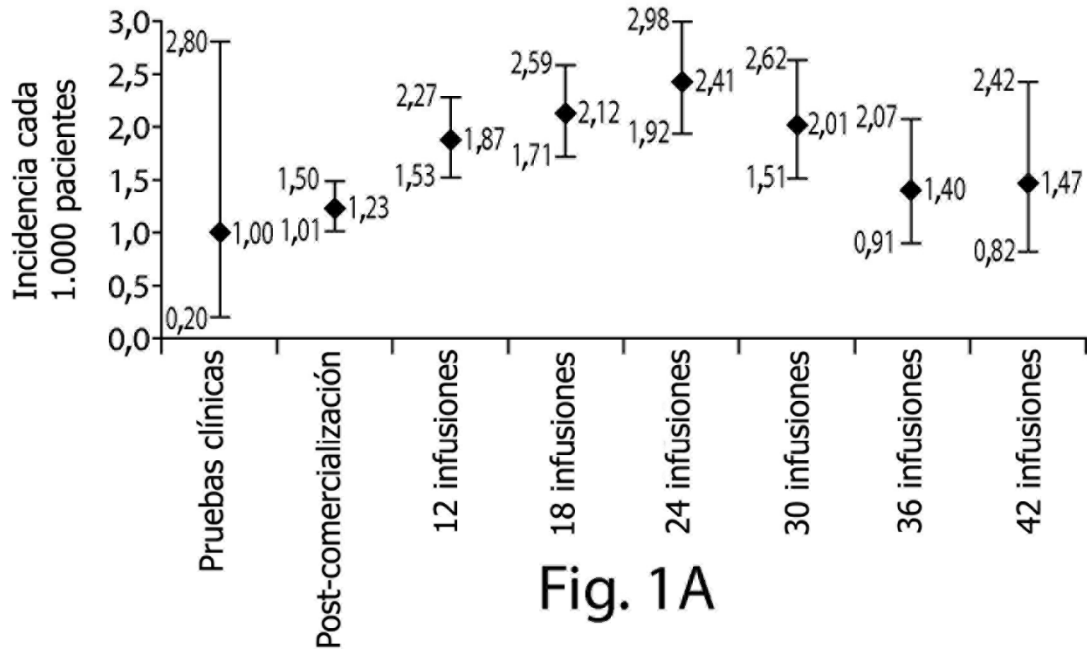


Fig. 1A

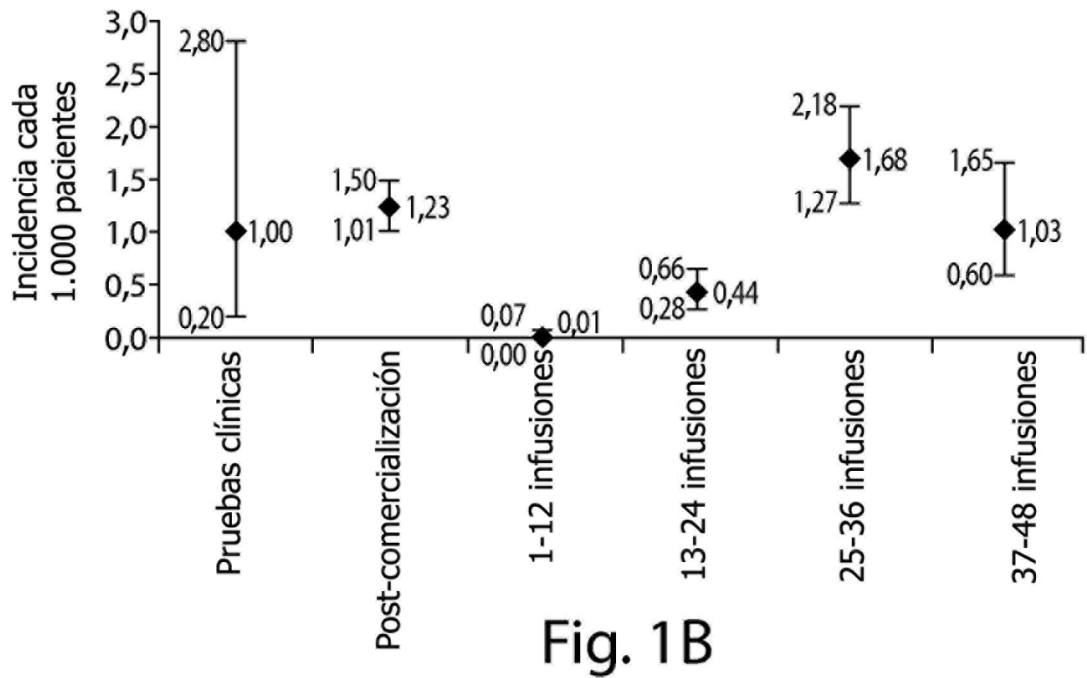


Fig. 1B

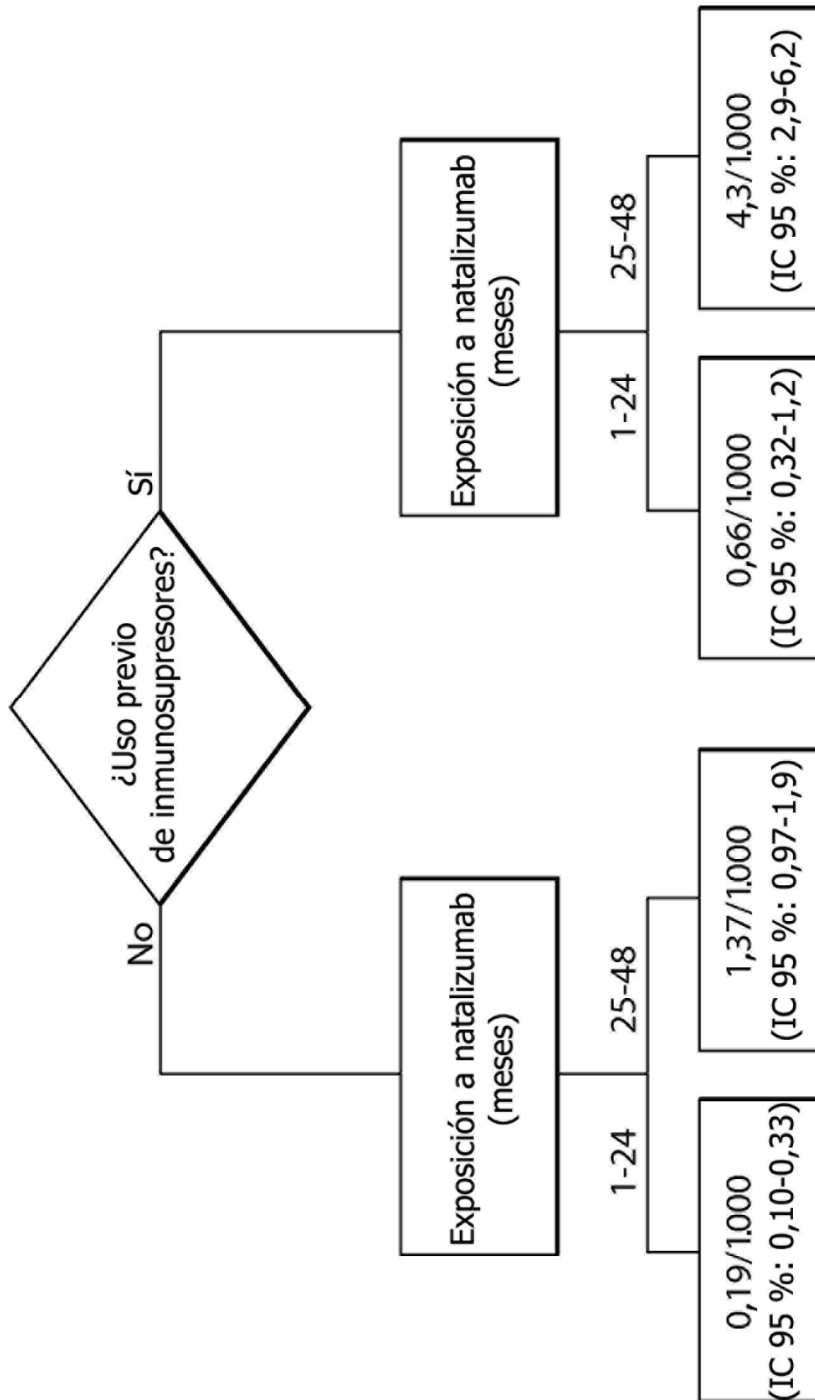


Fig. 2

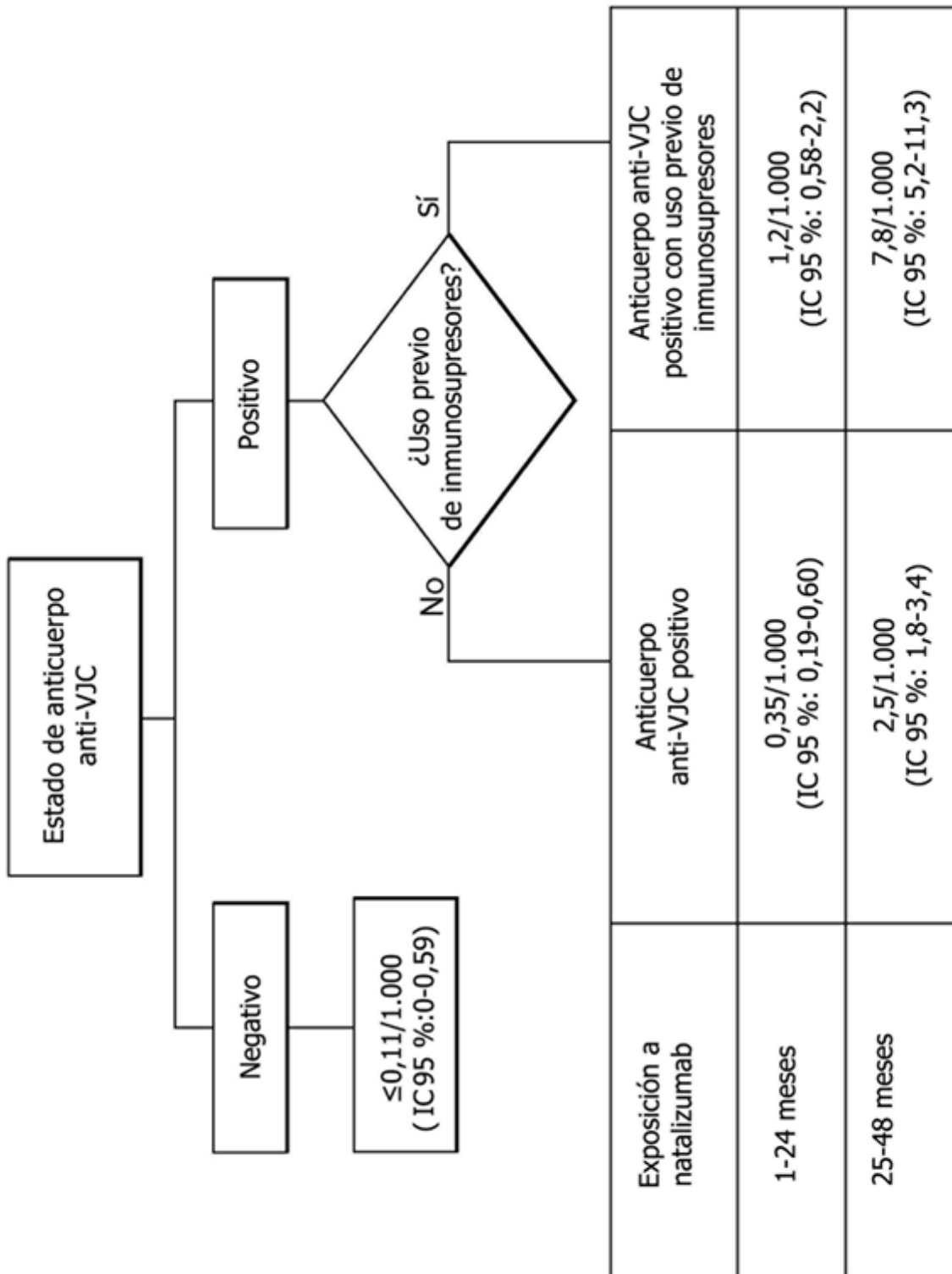


Fig. 3

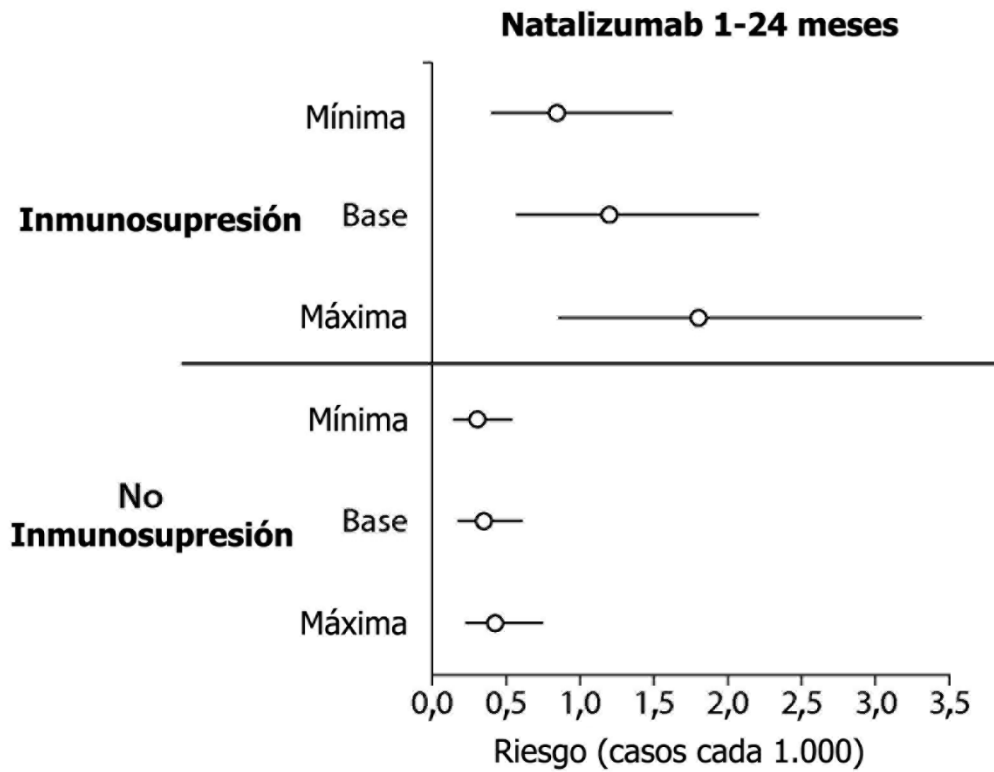


Fig. 4A

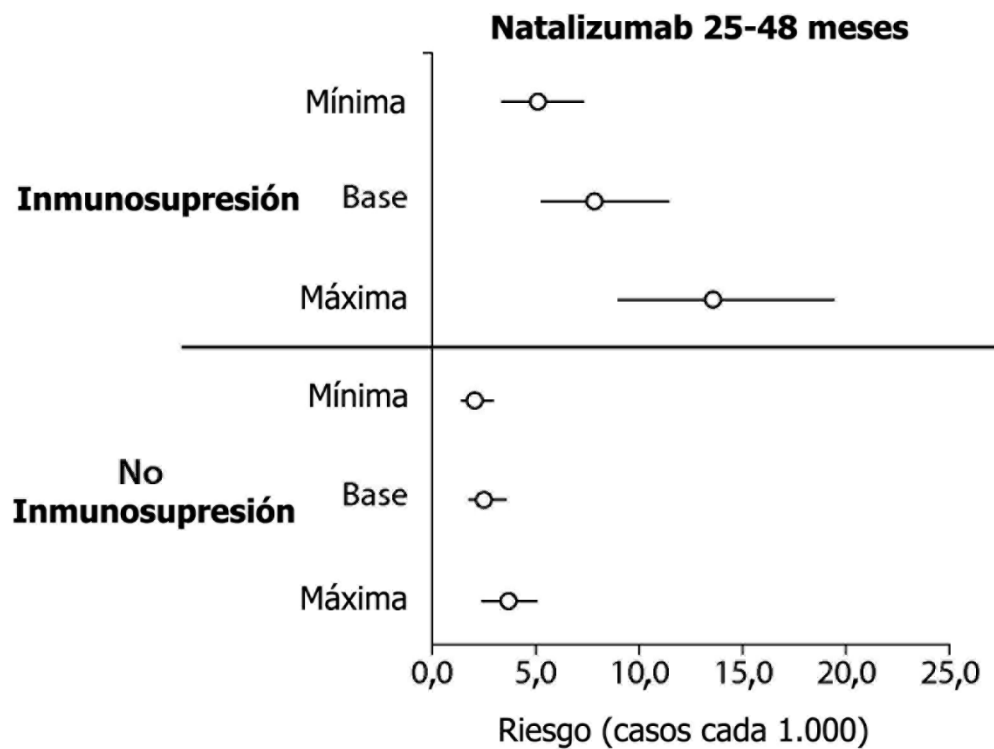


Fig. 4B

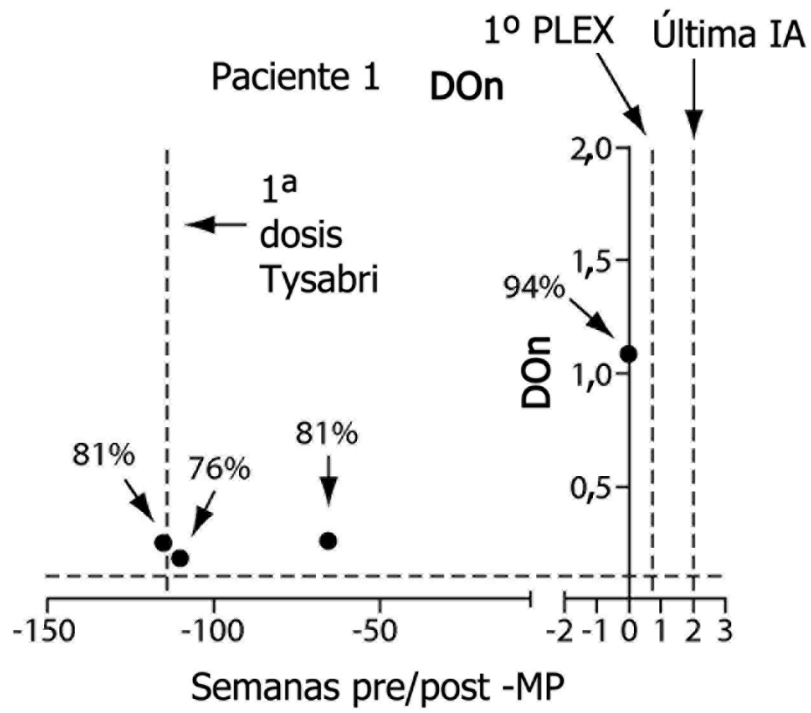


Fig. 5A

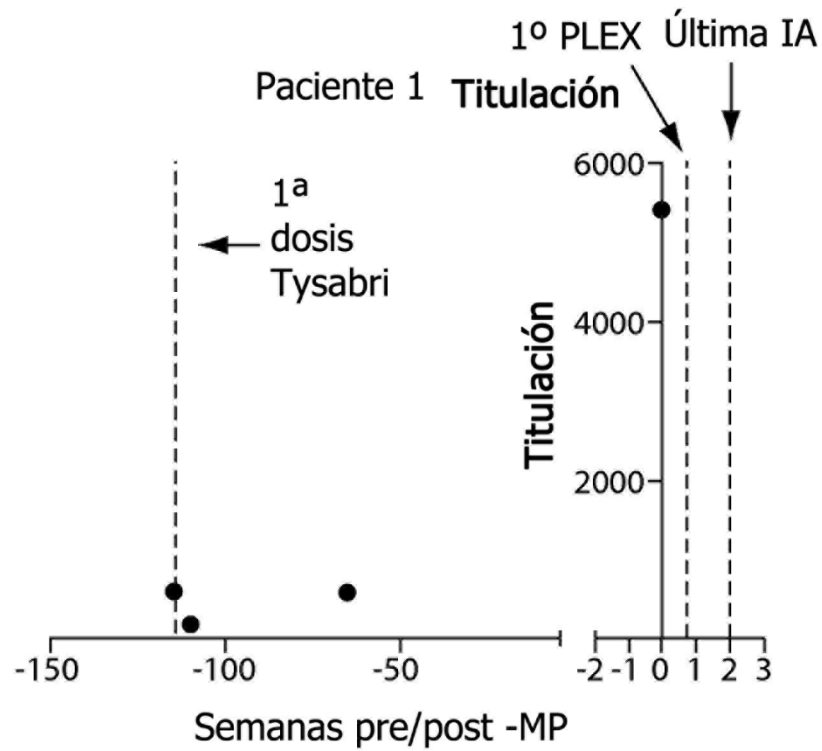


Fig. 5B

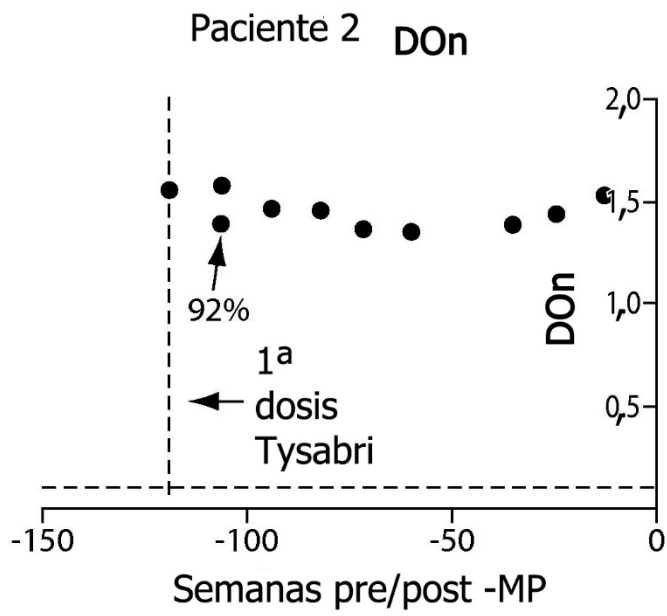


Fig. 6A

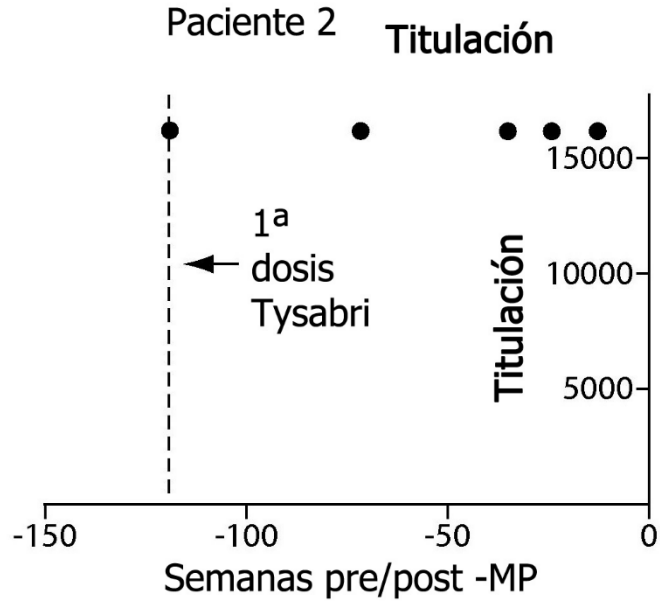


Fig. 6B

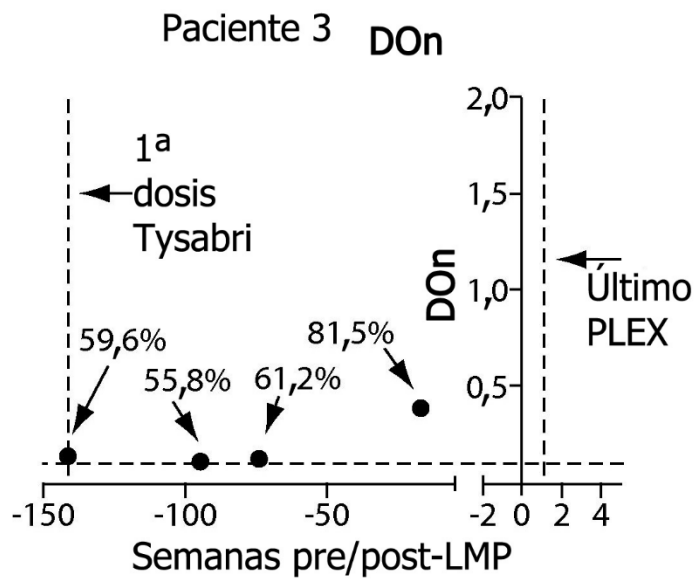


Fig. 7A

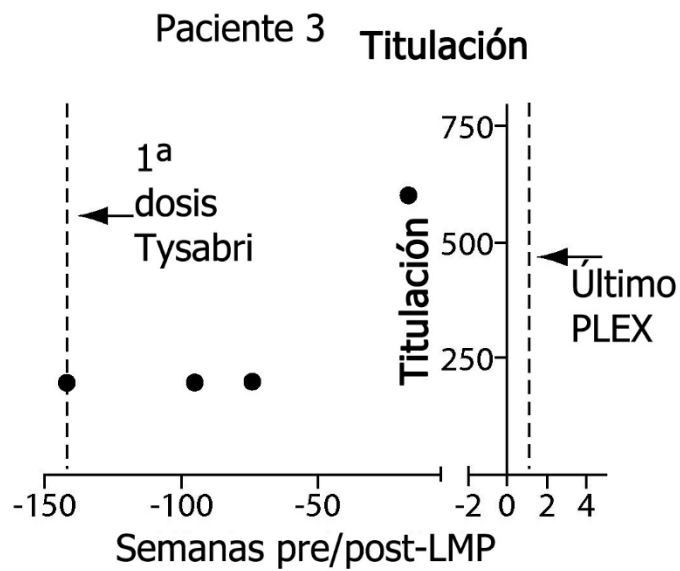


Fig. 7B

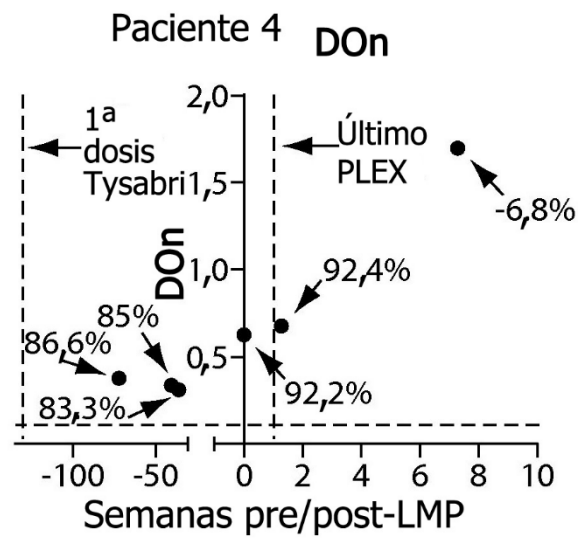


Fig. 8A

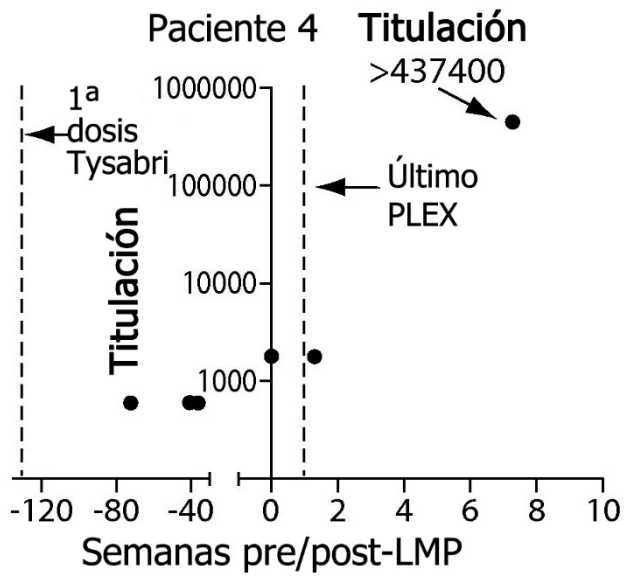
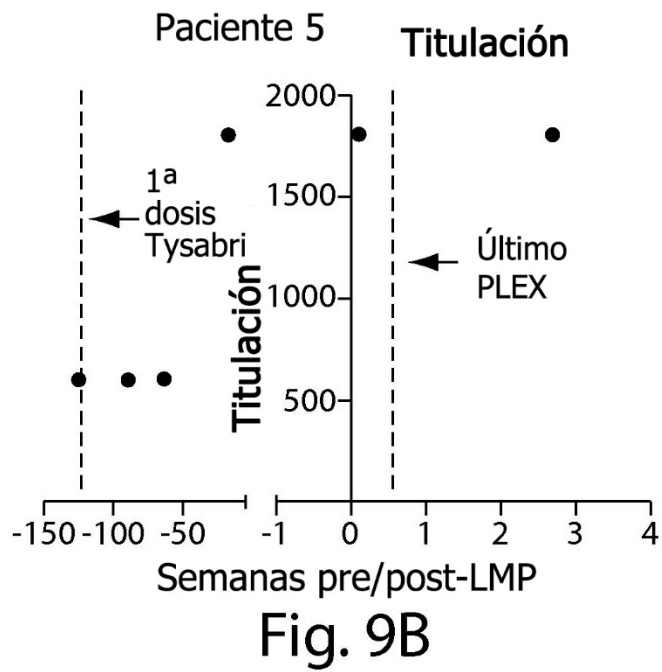
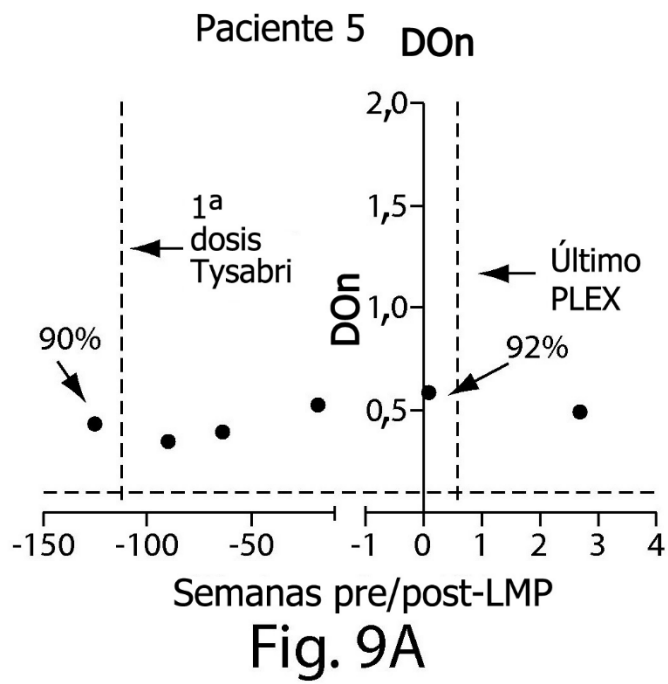


Fig. 8B



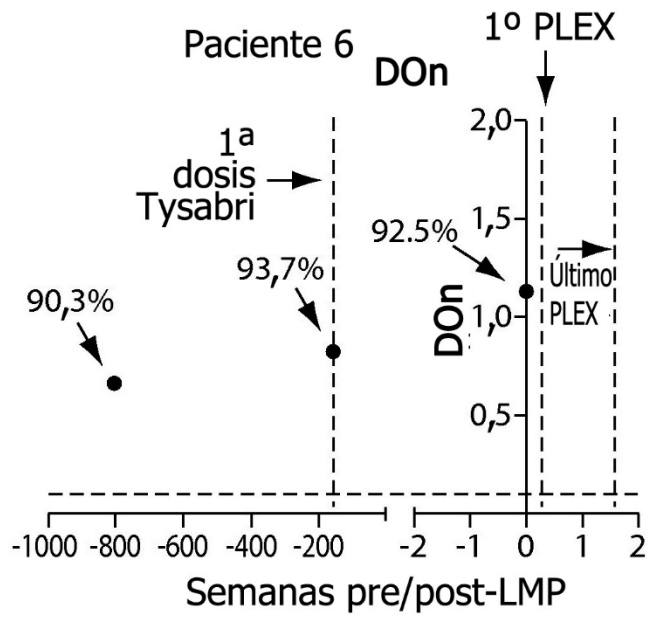


Fig. 9C

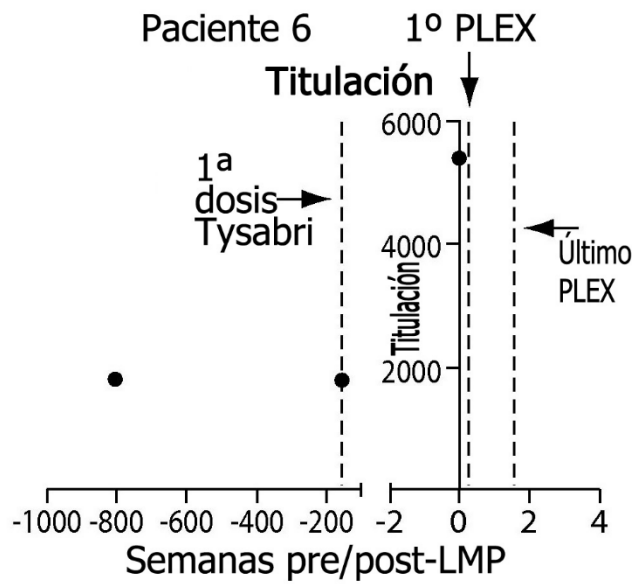


Fig. 9D

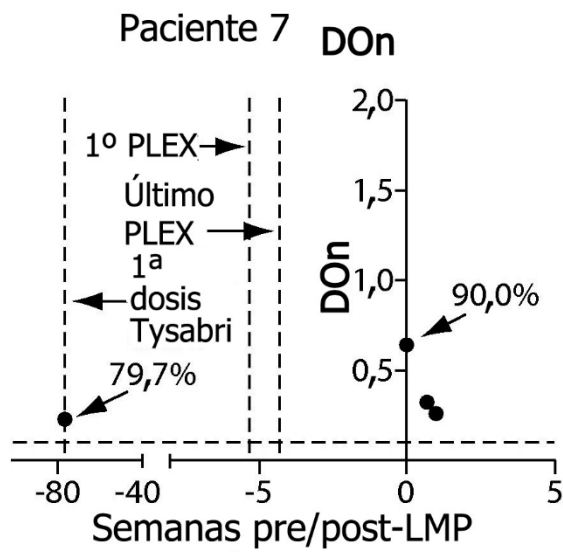


Fig. 10A

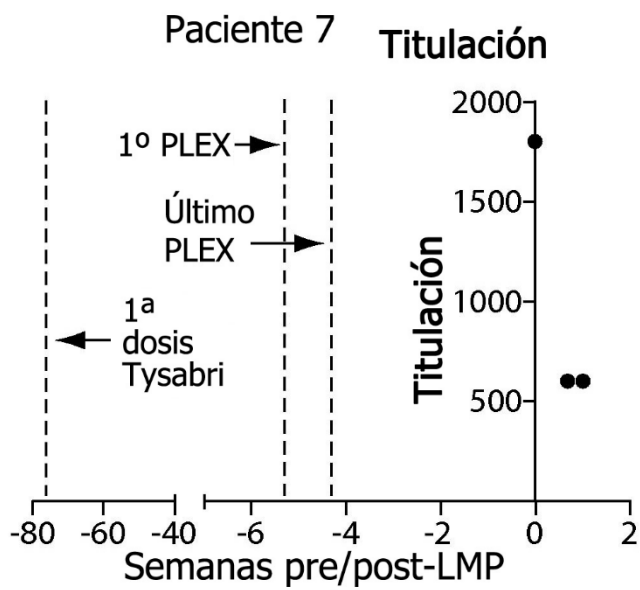


Fig. 10B

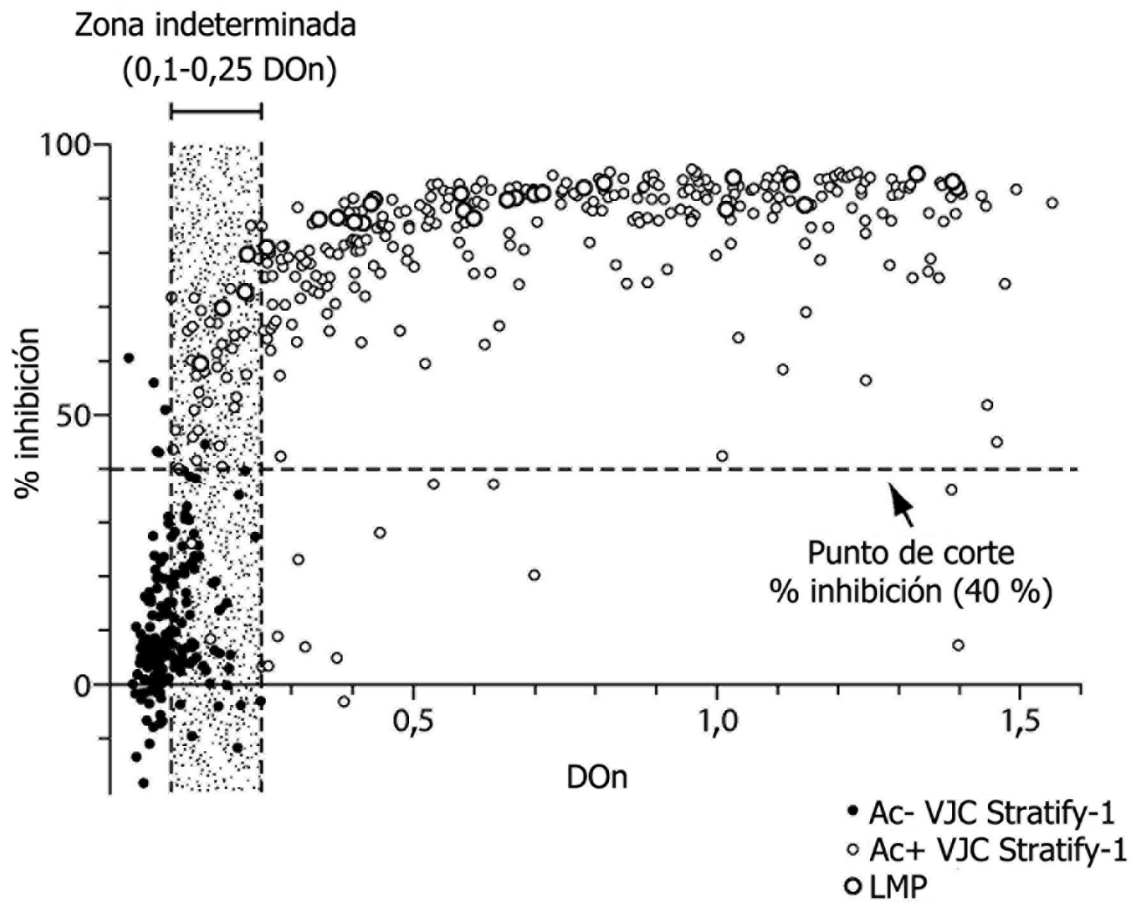


Fig. 11

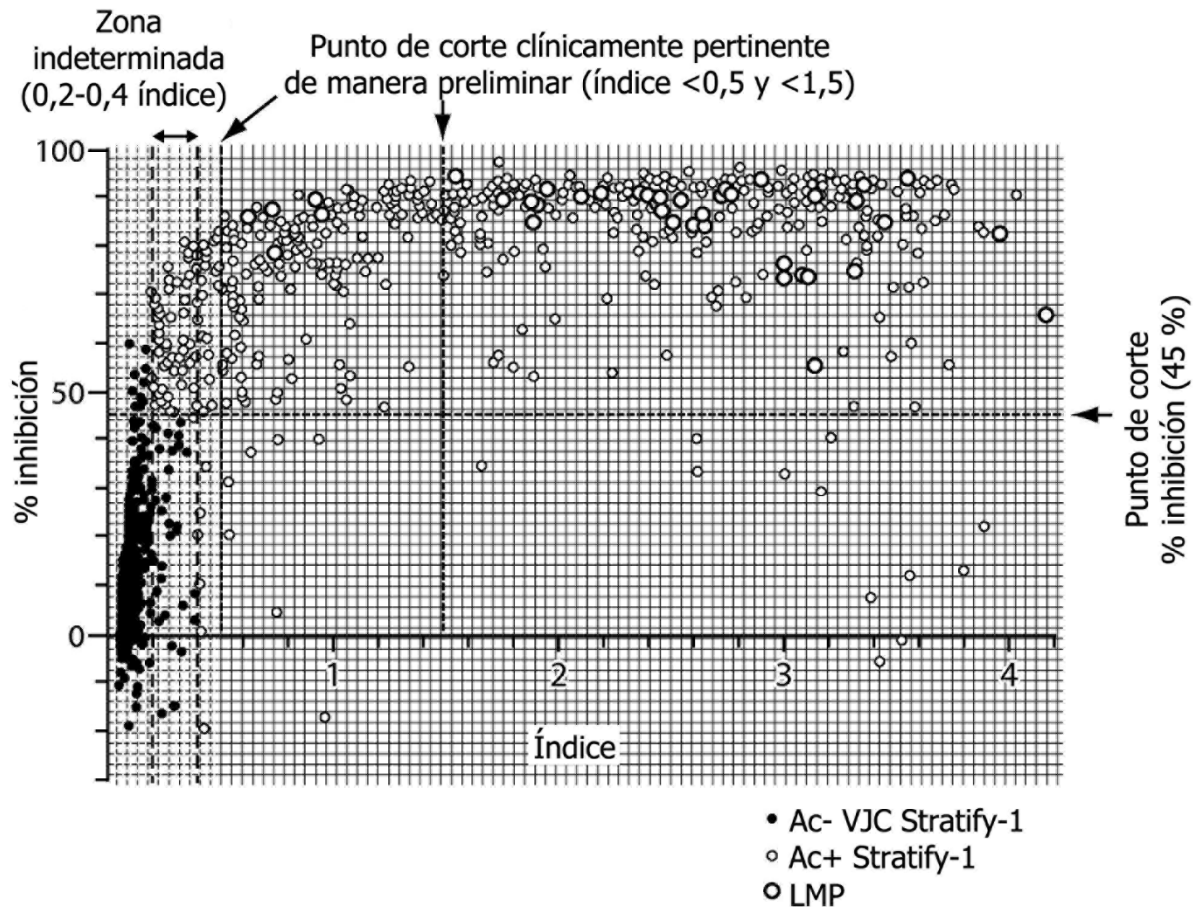
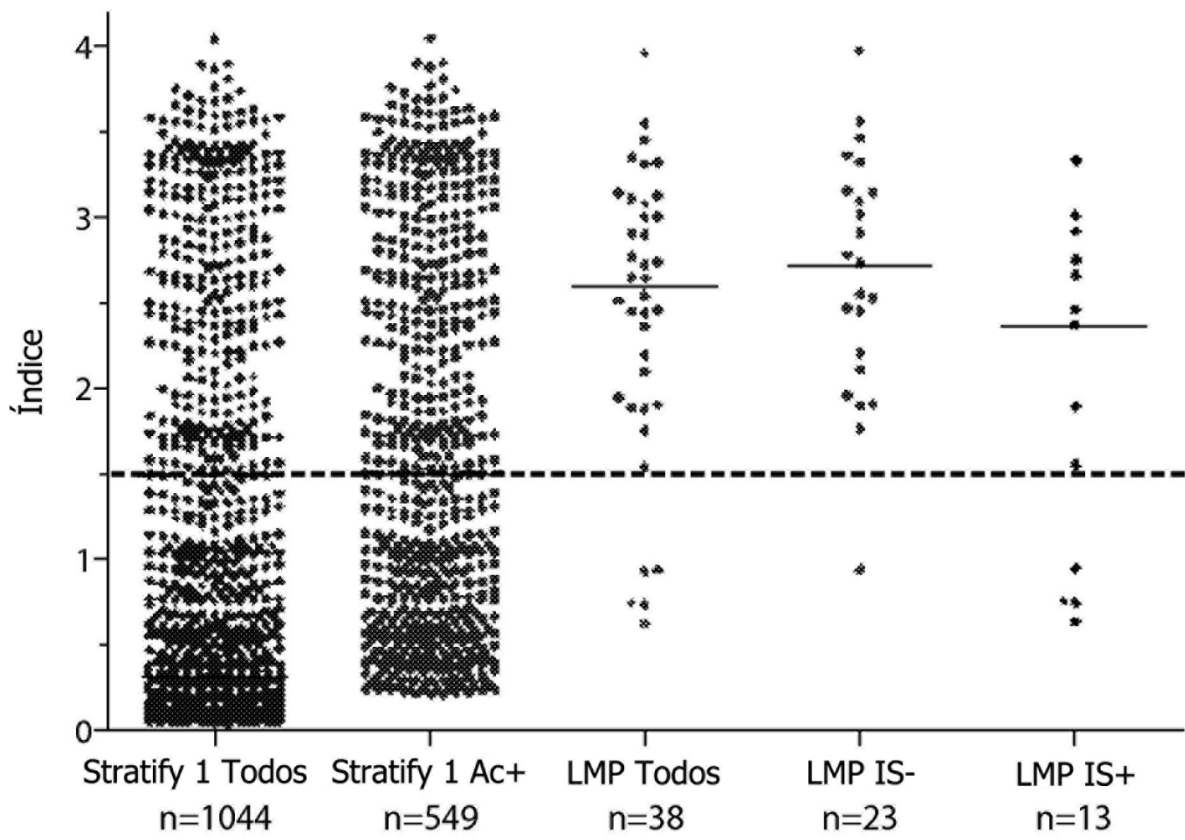


Fig. 12



50 % (278/549) de pacientes Ac+ tienen índice <1,5
 4,4 % (1/23) de pacientes LMP IS- tienen índice <1,5

Fig. 13