

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 823**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/US2015/018069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15131078**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15754919 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3110976**

54 Título: **Método de evaluación del riesgo de LMP**

30 Prioridad:

**27.02.2014 US 201461945778 P**

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

**14.04.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PLAVINA, TATIANA;  
CARULLI, JOHN;  
GORELIK, LEONID y  
COMPTON, TERESA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 818 823 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**

Método de evaluación del riesgo de LMP

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a métodos de evaluación del riesgo de un paciente de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP).

**Antecedentes de la invención**

10 El anticuerpo terapéutico natalizumab anti-VLA-4 (Antígeno muy tardío 4) está indicado para tratar formas recurrentes de esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Crohn de moderada a severa. El tratamiento con natalizumab, sin embargo, se asocia con un riesgo más alto de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una infección cerebral oportunista causada por el virus JC (VJC). La LMP ocurre principalmente en individuos inmunodeprimidos y en pacientes que reciben ciertas terapias inmunomoduladoras, incluyendo el natalizumab. Se supone que la LMP es el resultado de una interacción compleja entre el huésped y los factores virales, que conduce a la reactivación y mutación del arquetipo latente VJC a una forma neurotrófica que puede infectar a los oligodendrocitos en el sistema nervioso central.

**Sumario de la invención**

15 La invención se refiere, entre otros, a ensayos para detectar la presencia y/o cantidad de uno o más marcadores de células B en un fluido biológico, p. ej., sangre completa, suero o plasma, que puede usarse, p. ej., para predecir un riesgo de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), y para varios otros métodos, incluyendo los métodos de evaluar y/o tratar pacientes. Aquí se describen kits, mezclas de reacción y matrices para predecir el riesgo de desarrollar LMP.

20 Por consiguiente, en un aspecto, la invención presenta un método para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP, comprendiendo el método: determinar los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B, seleccionados del grupo que consiste en IgM e IgG1, en donde los niveles de expresión de uno o más de IgM e IgG1 son los niveles de expresión total, en una muestra biológica del paciente (p. ej., una muestra de sangre completa, suero o plasma), en donde si hay una diferencia significativa en los niveles de expresión, p. ej., en comparación con una referencia estándar (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP), se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de desarrollar LMP, y en donde los niveles de expresión son los mismos o sustancialmente similar al estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP), se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP.

25 En algunas realizaciones, el método comprende además obtener una muestra biológica (p. ej., una muestra de sangre) del paciente. La muestra puede incluir una fracción no celular (p. ej., plasma, suero, u otro fluido corporal no celular). En una realización, la muestra es una muestra de suero. En otras realizaciones, la muestra biológica es sangre (p. ej., sangre completa). En ciertas realizaciones, la sangre además puede procesarse para obtener plasma o suero.

35 En algunas realizaciones, el método comprende además obtener (p. ej., purificar o procesar a partir de la muestra) un ácido nucleico (p. ej., ADN genómico, ADNc, ARN) o proteína para determinar los niveles de expresión del marcador de células B. Purificar y/o procesar de la muestra puede implicar una o más de extracción, concentración, aislamiento, clasificación, fijación, adición de reactivos y similares. La muestra procesada o purificada puede contener compuestos que no se entremezclan de forma natural con el fluido biológico en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, sondas, marcadores o similares.

40 En algunas realizaciones, el marcador de células B puede determinarse, p. ej., usando cualquier ensayo adecuado, p. ej., un ensayo descrito en este documento que incluye, p. ej., un ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), una transferencia Western o un método inmunohistoquímico. Alternativamente, el nivel de expresión del marcador de células B puede determinarse por la cantidad de ácido nucleico (p. ej., ARNm) en la muestra biológica. p. ej., las cantidades de expresión de ácidos nucleicos marcadores de células B (p. ej., niveles de ARNm) pueden determinarse fácilmente usando cualquier ensayo adecuado, p. ej., un ensayo descrito en este documento que incluye, p. ej., Transferencia Northern, RT-PCR o el uso de biochips. En algunas realizaciones, se determinan los niveles de expresión de IgM, p. ej., se determinan los niveles de proteína IgM, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de IgM en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgM según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (referido como "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína IgM determinados están por debajo de una cantidad umbral (denominada en este documento como "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína IgM entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el

nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente se somete a una evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En una realización, el nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo de IgM, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, es superior a 250 mg/dL. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgM, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento, está por debajo de 50 mg/dL. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de proteína IgM están entre 50 y 250 mg/dL, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento. En algunas realizaciones, se identifica a un paciente con un riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de IgM en comparación con la referencia estándar.

En algunas realizaciones, los niveles de expresión de IgM se determinan, p. ej., los niveles de ácido nucleico de IgM se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de ácido nucleico de IgM en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de ácido nucleico de IgM según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (denominado "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de ácido nucleico de IgM determinados están por debajo de una cantidad umbral (denominada aquí como "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de ácido nucleico de IgM entre el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo y el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente se somete a evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En una realización, el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo para IgM, p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento, es superior a 4 log<sub>2</sub> (por ejemplo, 4,5 log<sub>2</sub> o superior). En una realización, el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de IgM, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, es 3 log<sub>2</sub> o inferior. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de ácido nucleico de IgM están entre 3 log<sub>2</sub> y 4,5 log<sub>2</sub> (p. ej., entre 3 log<sub>2</sub> y 4 log<sub>2</sub>), p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento. En algunas realizaciones, se identifica a un paciente con un riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de ácido nucleico de IgM en comparación con la estándar de referencia.

En algunas realizaciones, el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, y antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, se determinan los niveles de expresión de IgM, p. ej., niveles de proteína IgM y/o niveles de ácido nucleico de IgM se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y se comparan con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente que aún no ha sido tratado con un anticuerpo anti-VLA pero que después de ser tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, no desarrolla LMP). Si los niveles de expresión de IgM antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 disminuyen en comparación con el estándar de referencia, esto es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En una realización, se determina que el paciente es uno de los siguientes: tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgM que cae en o por encima de un nivel umbral de expresión de proteína de IgM de riesgo más bajo y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgM que cae en o por encima de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de IgM; tener un riesgo más alto de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgM que cae en o por debajo de un nivel de expresión de proteína de riesgo más alto de IgM; y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgM que cae en o debajo de un nivel de umbral de ácido nucleico de alto riesgo de IgM o está en riesgo intermedio de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgM de IgM que cae entre un umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo nivel y un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto para IgM y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgM que se encuentra entre un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de IgM y un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de IgM. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo para IgM en un paciente que aún no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento, está por encima de 200 mg/dL. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgM, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, es 100 mg/dL o menor. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de expresión de la proteína IgM están entre 100 y 200 mg/dL, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento.

Como se describe en este documento, los niveles de expresión de IgM son niveles de expresión de IgM de IgM a un antígeno particular, p. ej., VJC o VBK. Como se describe en este documento, los niveles de expresión de IgM son una relación, p. ej., una relación de niveles de expresión de IgM de IgM a un antígeno particular, p. ej., VJC o VBK, a los niveles de expresión de IgM totales.

En otras realizaciones, se determina el riesgo de LMP en un paciente que está recibiendo un anticuerpo anti-VLA, p. ej., natalizumab, p. ej., ha estado recibiendo la administración del anticuerpo anti-VLA, p. ej., natalizumab durante al menos una semana, dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses, 1, 2 o 3 años en el momento de la determinación.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de expresión de IgG1, p. ej., los niveles de proteína IgG1 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de IgG1 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más de que el paciente desarrolle LMP.

5 En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgG1 determinados están por encima de una cantidad umbral (denominada "un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína IgG1 determinados están por debajo de una cantidad umbral (denominada en este documento como "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto"). En una realización, se determina que el paciente  
10 tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína IgG1 entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente se somete a una evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., por otros métodos descritos en este documento. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo de IgG1, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, está por encima de 1100 mg/dL. En una  
15 realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgG1, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, está por debajo de 240 mg/dL. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de proteína IgG1 están entre 240 y 1100 mg/dL, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento. En algunas realizaciones, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6,  
20 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de IgG1 en comparación con la referencia estándar.

En algunas realizaciones, se determinan los niveles de expresión de IgG1, p. ej., los niveles de ácido nucleico de IgG1 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de ácido nucleico de IgG1 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el  
25 paciente desarrolle LMP. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de ácido nucleico de IgG1 según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (referido como "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo"). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de ácido nucleico de IgG1 determinados están por debajo de una cantidad umbral (denominada aquí como "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto"). En una realización, se determina que  
30 el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de ácido nucleico IgG1 entre el nivel de ácido nucleico de riesgo más bajo y el nivel de ácido nucleico de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente está sujeto a una evaluación adicional de riesgo del LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En algunas realizaciones, se identifica a un paciente con un riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de ácido nucleico de IgG1 en comparación con el  
35 estándar de referencia.

En algunas realizaciones, el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, y antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, se determinan los niveles de expresión de IgG1, p. ej., niveles de proteína IgG1 y/o niveles de ácido nucleico de IgG1 se determinan, p. ej., mediante un método  
40 descrito en este documento, y se comparan con un estándar de referencia (p. ej., Niveles de expresión en un paciente que aún no ha sido tratado con un anticuerpo anti-VLA pero que después de ser tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, no desarrolla LMP). Si los niveles de expresión de IgG1 antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 disminuyen en comparación con el estándar de referencia, esto es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En una realización, se determina que el paciente es uno de los siguientes: tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgG1 que cae en o por encima de un  
45 nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo de IgG1 y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgG1 que cae en o por encima de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de IgG1; tener un riesgo más alto de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgG1 que cae en o por debajo de un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgG1; y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgG1 que cae en o por debajo de un nivel de umbral de ácido nucleico de alto riesgo de IgG1 o que tiene un riesgo intermedio  
50 de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína IgG1 que se encuentra entre un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y un nivel de umbral de expresión de proteínas de riesgo más alto para IgG1 y/o basado en un nivel de ácido nucleico de IgG1 que cae entre un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de IgG1 y un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de IgG1. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo para IgG1 en un paciente que aún no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, p. ej., según lo determinado por un método descrito aquí, está por encima de 600 mg/dL. En una realización, el nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgG1, p. ej., según se determina mediante un método descrito en este documento, es 400 mg/dL o menor. En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de expresión de la proteína IgG1 están entre 400 y 600 mg/dL, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este  
60 documento.

Como se describe en este documento, los niveles de expresión de IgG1 son los niveles de expresión de IgG1 de IgG1 a un antígeno particular, p. ej., VJC o VBK. Como se describe en este documento, los niveles de expresión de IgG1 son una relación, p. ej., una relación de los niveles de expresión de IgG1 de IgG1 a un antígeno particular, p. ej., VJC

o VBK, a los niveles de expresión de IgG1 total. La invención también proporciona un anticuerpo anti-VLA-4 para usar en un método de tratamiento de un paciente que tiene esclerosis múltiple, en donde el paciente ha sido evaluado por un método que se afirma que tiene un riesgo más bajo de desarrollar PLM, opcionalmente en el que el anti-VLA-4 anticuerpo es natalizumab.

5 Como se describe en este documento, los niveles de expresión de CD72 se determinan, p. ej., los niveles de proteína CD72 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de CD72 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína CD72 determinados están por encima de una cantidad umbral (denominada "un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína CD72 según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominado en este documento "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína CD72 entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente se somete a una evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de CD72 en comparación con la referencia estándar.

20 En algunos casos, los niveles de expresión de CD72 se determinan, p. ej., los niveles de ácido nucleico de CD72 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de ácido nucleico de CD72 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de ácido nucleico de CD72 determinados están por encima de una cantidad umbral (denominada "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de ácido nucleico de CD72 según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominado en este documento "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de ácido nucleico CD72 entre el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo y el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente está sujeto a una evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En un caso, el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo para CD72, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento, está por encima de  $7 \log_2$  (p. ej.,  $7,5 \log_2$  o superior). En un caso, el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de CD72, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento, es 3  $\log_2$  o inferior. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de ácido nucleico CD72 están entre  $6,5 \log_2$  y  $8 \log_2$  (p. ej., entre  $7 \log_2$  y  $8 \log_2$ ), p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de ácido nucleico de CD72 en comparación con la estándar de referencia.

40 En algunos casos, el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, y antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, se determinan los niveles de expresión de CD72, p. ej., niveles de proteína CD72 y/o niveles de ácido nucleico de CD72 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y se comparan con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente que aún no ha sido tratado con un anticuerpo anti-VLA pero que después de ser tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, no desarrolla LMP). Si los niveles de expresión de CD72 antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 disminuyen en comparación con el estándar de referencia, esto es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene uno de los siguientes: tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de la proteína CD72 que cae en o por encima de un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo de CD72 y/o basado en un nivel de ácido nucleico CD72 que cae en o por encima de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de CD72; tener un riesgo más alto de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de la proteína CD72 que cae en o por debajo de un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más alto de CD72; y/o basado en un nivel de ácido nucleico de CD72 que cae en o por debajo de un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de CD72; o tener un riesgo intermedio de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína CD72 de CD72 que cae entre un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto para CD72 y/o basado en un nivel de ácido nucleico de CD72 que se encuentra entre un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de CD72 y un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de CD72.

60 En algunos casos, se determinan los niveles de expresión de CD22, p. ej., los niveles de proteína de CD22 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de CD22 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína CD22 según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (denominado "un nivel umbral de

expresión de proteína de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína CD22 según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominada en este documento "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína CD22 entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto y, opcionalmente, el paciente se somete a más evaluación del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de CD22 en comparación con el estándar de referencia.

En algunos casos, se determinan los niveles de expresión de CD22, p. ej., los niveles de ácido nucleico de CD22 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de ácido nucleico de CD22 en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de ácido nucleico de CD22 según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (referida como "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de ácido nucleico de CD22 según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominado en este documento "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de ácido nucleico de CD22 entre el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo y el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente está sujeto a evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En un caso, el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo para CD22, p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento, está por encima de  $7 \log_2$  (p. ej.,  $7,5 \log_2$  o mayor). En un caso, el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto para CD22, p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento, es  $6,5 \log_2$  o menor. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de ácido nucleico de CD22 están entre  $6,5 \log_2$  y  $8 \log_2$  (p. ej., entre  $7 \log_2$  y  $8 \log_2$ ), p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de ácido nucleico de CD22 en comparación con el estándar de referencia.

En algunos casos, el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, y antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, se determinan los niveles de expresión de CD22, p. ej., niveles de proteína CD22 y/o niveles de ácido nucleico de CD22 se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y se comparan con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente que aún no ha sido tratado con un anticuerpo anti-VLA4 pero que después de haber sido tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, no desarrolla LMP). Si los niveles de expresión de CD22 antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 disminuyen en comparación con el estándar de referencia, esto es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente es uno de los siguientes: tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína CD22 que cae en o por encima de un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo de CD22 y/o basado en un nivel de ácido nucleico de CD22 que cae en o por encima de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de CD22; estar en riesgo más alto de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína CD22 que cae en o por debajo de un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de CD22; y/o basado en un nivel de ácido nucleico de CD22 que cae en o por debajo de un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de CD22 o está en riesgo intermedio de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína CD22 de CD22 que cae entre un umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo nivel y un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto para CD22 y/o basado en un nivel de ácido nucleico de CD22 que cae entre un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de CD22 y un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de CD22.

En algunos casos, se determinan los niveles de expresión de FcRLA, p. ej., los niveles de proteína FcRLA se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de FcRLA en comparación con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína FcRLA según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (denominada "un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína FcRLA según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominado en este documento "un nivel umbral de expresión de proteína de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína FcRLA entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente se somete a una evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., mediante otros métodos descritos en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de FcRLA en comparación con el estándar de referencia.

En algunos casos, los niveles de expresión de FcRLA se determinan, p. ej., los niveles de ácido nucleico de FcRLA se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y una disminución en los niveles de ácido nucleico de FcRLA en comparación con un estándar de referencia (p. ej., los niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP) es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de ácido nucleico de FcRLA según lo determinado están por encima de una cantidad umbral (denominada "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de ácido nucleico de FcRLA según lo determinado están por debajo de una cantidad umbral (denominado en este documento "un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto"). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de ácido nucleico de FcRLA entre el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo y el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto, y opcionalmente, el paciente está sujeto a evaluación adicional del riesgo de LMP, p. ej., por otros métodos descritos en este documento. En un caso, el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo para FcRLA, p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento, está por encima de  $7,5 \log_2$  (p. ej.,  $8 \log_2$  o mayor, p. ej.,  $8,5 \log_2$  o mayor). En un caso, el nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto para FcRLA, p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento, es  $7,0 \log_2$  o menor (p. ej.,  $6,5 \log_2$  o menor). En un caso, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP de desarrollar LMP si se determina que los niveles de ácido nucleico de FcRLA están entre  $7 \log_2$  y  $8,5 \log_2$  (p. ej., entre  $7,5 \log_2$  y  $8,5 \log_2$ ), p. ej., según lo determinado mediante un método descrito en este documento. En algunos casos, se identifica a un paciente con riesgo más alto de desarrollar LMP, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de ácido nucleico de FcRLA en comparación con el estándar de referencia.

En algunos casos, el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, y antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, se determinan los niveles de expresión de FcRLA, p. ej., niveles de proteína FcRLA y/o niveles de ácido nucleico de FcRLA se determinan, p. ej., mediante un método descrito en este documento, y se comparan con un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente que aún no ha sido tratado con un anticuerpo anti-VLA pero que después de haber sido tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, no desarrolla LMP). Si los niveles de expresión de FcRLA antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 disminuyen en comparación con el estándar de referencia, esto es indicativo de un riesgo más alto de que el paciente desarrolle LMP. En un caso, se determina que el paciente tiene uno de los siguientes: tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de la proteína FcRLA que cae en o por encima de un nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo de FcRLA y/o basado en un nivel de ácido nucleico de FcRLA que cae en o por encima de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de FcRLA; estar en riesgo más alto de desarrollar LMP, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína FcRLA que cae en o por debajo de un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de FcRLA; y/o basado en un nivel de ácido nucleico de FcRLA que cae en o por debajo de un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de FcRLA; o tener un riesgo intermedio de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva, p. ej., basado en un nivel de expresión de proteína FcRLA de FcRLA que se encuentra entre un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto para FcRLA y/o basado en un nivel de ácido nucleico de FcRLA que se encuentra entre un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo de FcRLA y un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de FcRLA.

En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo mayor de desarrollar LMP o riesgo intermedio de desarrollar LMP basado en los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B, y se identifica al paciente como alguien que debería recibir pruebas adicionales para determinar el riesgo de desarrollar LMP.

En algunas realizaciones, el método comprende además evaluar (p. ej., determinar) un título de anticuerpos contra el virus JC (VJC) en una muestra biológica del paciente como un indicador adicional de riesgo (p. ej., mediante un método descrito en este documento, y/o como se describe en los documentos WO 2011/085369 y WO2012/166971), p. ej., en donde el paciente tiene una clasificación de exposición inmunosupresora anterior negativa; en donde si se determina que el título está por encima de un nivel predeterminado, p. ej., por encima de un nivel índice de 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5, se determina que el paciente está en un nivel más alto riesgo de desarrollar LMP, y en donde si se determina que el título es igual o inferior a un nivel predeterminado, p. ej., igual o inferior a un nivel de índice de 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 1,0, 0,9, 0,8 o 0,7, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP. En algunas realizaciones, el nivel predeterminado es 0,9. En algunas realizaciones, el nivel predeterminado es 1,2. En algunas realizaciones, el nivel predeterminado es 1,5.

En algunas realizaciones, el paciente ha estado libre de una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 durante un período de 1, 3 o 5 años. En algunas realizaciones, el paciente ha estado libre de una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 durante toda la vida del paciente, o desde el diagnóstico con esclerosis múltiple (p. ej., recaída, esclerosis múltiple en remisión).

Como se describe y/o reivindicado en este documento, los niveles de expresión se determinan para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho marcadores de células B, p. ej., los niveles de expresión se determinan para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o todos IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b. Pueden

- determinarse al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen IgM, IgG1, CD72, CD22 y/o FcRLA. En algunos casos, se determinan al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen CCL21, CXCL12 y/o CXCL13. En algunos casos, se determinan al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen SICLEC-3 y SIGLEC-9. Pueden determinarse niveles de expresión de al menos dos de: IgM e IgG1; IgM y CD72; IgM y CD22; IgM y FcRLA; IgG1 y CD72; IgG1 y CD22; IgG1 y FcRLA; CD72 y CD22; CD72 y FcRLA; CD22 y FcRLA.
- 5 En una realización, el paciente tiene esclerosis múltiple (p. ej., recaída, esclerosis múltiple en remisión).
- En algunas realizaciones, el paciente tiene enfermedad de Crohn (p. ej., enfermedad de Crohn moderada a severamente activa).
- 10 En algunas realizaciones, el método comprende además evaluar (p. ej., determinar) el nivel de expresión de VLA-4, p. ej., proteína VLA-4 y/o nivel de ácido nucleico, en una muestra. En una realización, se determina un nivel de expresión de VLA-4 en un subconjunto específico de células B presentes en una muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se determina un nivel de expresión de VLA-4 en combinación con un nivel de expresión de uno o más marcadores de células B.
- 15 Descrito y/o reivindicado en este documento un método para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP, comprendiendo el método: determinar los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b) (p. ej., mediante un método descrito en este documento) en dos o más muestras biológicas, una primera
- 20 determinación y una segunda o posterior determinación (p. ej., sangre completa, plasma o muestras de suero) obtenidas del paciente durante un período de tiempo (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses) en donde se administra al paciente un anticuerpo anti-VLA4 durante al menos una parte del período de tiempo; y el estado del paciente de tener un riesgo más bajo, un riesgo intermedio o un riesgo más alto de desarrollar LMP se determina en el momento de la determinación inicial y se vuelve a evaluar en función
- 25 de la segunda o las siguientes determinaciones.
- En varias realizaciones, el período de tiempo es de 6 meses. En varias realizaciones, el período de tiempo es de 12 meses. En varias realizaciones, el período de tiempo es de 18 meses.
- En ciertas realizaciones, las dos o más muestras son muestras consecutivas. En algunas realizaciones, se determina que los niveles de expresión en cada muestra obtenida del paciente durante un período de tiempo están en o por encima de un nivel umbral de expresión de riesgo más bajo. En algunas realizaciones, se determina que los niveles de expresión en cada muestra obtenida del paciente durante un período de tiempo se encuentran entre un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo y un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de la determinación inicial están en o por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo, y los niveles de expresión de una determinación posterior están entre un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo y un nivel de expresión de umbral de expresión de riesgo más alto o están en o por debajo de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de una determinación inicial están entre un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo y un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, y la determinación posterior es igual o superior a un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo, o en o por debajo de una expresión de riesgo más alto nivel de umbral.
- 30 En algunas realizaciones, el paciente tiene esclerosis múltiple (p. ej., recaída, esclerosis múltiple en remisión).
- En algunas realizaciones, el paciente tiene enfermedad de Crohn (p. ej., enfermedad de Crohn moderada a severamente activa).
- En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de desarrollar LMP o riesgo intermedio de desarrollar LMP basado en los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B según la segunda
- 45 determinación o posterior, y el paciente se identifica como alguien que deben recibir pruebas adicionales para determinar el riesgo de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva, p. ej., un riesgo adicional o los riesgos múltiples descritos en este documento.
- En algunas realizaciones, si se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP, entonces el paciente se clasifica como adecuado para el tratamiento con una terapia anti-VLA4. En realizaciones particulares, el
- 50 método incluye además administrar una terapia anti-VLA4 al paciente. En determinadas realizaciones, la terapia anti-VLA4 es una terapia con natalizumab. En algunas realizaciones, el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA4.
- En algunas realizaciones, el método comprende además proporcionar información con respecto a la clasificación del paciente, p. ej., los niveles de expresión de células B del paciente y, opcionalmente, el título de VJC del paciente y/o
- 55 la clasificación de anticuerpos anti-VLA4 y/o clasificación de exposición de inmunosupresores a otra parte, p. ej., un proveedor de atención médica o una persona que decide el reembolso (p. ej., un seguro o agencia gubernamental).

Como se describe y/o reivindica en este documento, los niveles de expresión se determinan para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho marcadores de células B, p. ej., los niveles de expresión son determinado para dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o todos IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b. Pueden determinarse al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen IgM, IgG1, CD72, CD22 y/o FcRLA. En algunos casos, se determinan al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen CCL21, CXCL12 y/o CXCL13. En algunos casos, se determinan al menos dos niveles de expresión de marcadores de células B, y los marcadores de células B incluyen SIGLEC-3 y SIGLEC-9. Pueden determinarse niveles de expresión de al menos dos de: IgM e IgG1; IgM y CD72; IgM y CD22; IgM y FcRLA; IgG1 y CD72; IgG1 y CD22; IgG1 y FcRLA; CD72 y CD22; CD72 y FcRLA; CD22 y FcRLA.

También se describe en este documento un kit para evaluar el riesgo de desarrollar LMP. En algunos casos, el kit puede incluir sondas para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico en una muestra biológica, p. ej., una muestra de sangre completa, suero o plasma. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto o agente marcado capaz de detectar un marcador de células B o un ARNm que codifica un marcador de células B en una muestra biológica y medios para determinar la cantidad del marcador de células B o ARNm en la muestra (p. ej., un anticuerpo que se une al marcador de células B o una sonda de oligonucleótidos que se une al ADN o ARNm que codifica el marcador de células B). En algunos casos, el kit comprende además instrucciones para interpretar los resultados obtenidos utilizando el kit.

En algunos casos, el kit comprende una pluralidad de sondas para detectar una pluralidad de marcadores de células B.

En algunos casos, el kit puede comprender una o más sondas capaces de identificar uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o todos) marcador de células B descrito en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En algunos casos, pueden incluirse sondas para dos o más de IgM1, IgM1, IgG1, CD72 CD22 FCRLA. En algunos casos, pueden incluirse sondas para dos o más de CCL21, CXCL12 y/o CXCL13. En algunos casos, pueden incluirse al menos dos sondas para SIGLEC-3 y SIGLEC-9.

En algunos casos, el kit es para la detección de un polipéptido marcador de células B y la sonda se selecciona de un anticuerpo, derivado de anticuerpo, fragmento de anticuerpo y similares. Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (p. ej., unido a un soporte sólido) que se une a un polipéptido marcador de células B, p. ej., un polipéptido marcador de células B descrito en este documento; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o al primer anticuerpo y se conjuga con un marcador detectable.

En algunos casos, el kit es para la detección de un ácido nucleico marcador de células B y comprende una sonda seleccionada de un oligonucleótido (marcado o no marcado) fijado a un sustrato, oligonucleótido marcado no unido a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas de baliza molecular y similares. Para los kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, p. ej., un oligonucleótido marcado de forma detectable, que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido marcador de células B, p. ej., un marcador de células B descrito en este documento, o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico correspondiente a un marcador de células B. En algunos casos, el kit puede comprender además uno o más de, p. ej., un agente tamponador, un conservante, un agente estabilizador de proteínas y componentes necesarios para detectar el marcador detectable (p. ej., una enzima o un sustrato).

En algunos casos, el kit puede comprender además una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden analizarse y compararse con la muestra de prueba.

En algunos casos, el kit comprende un sustrato, p. ej., una placa con pocillos recubiertos con un agente capaz de unirse a uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En un caso, el sustrato está recubierto con un agente capaz de unirse a uno o más de IgM, IgG1, CD72, CD22, FCRLA. En algunos casos, el sustrato está recubierto con al menos dos agentes capaces de unirse a CCL21, CXCL12 y/o CXCL13. En algunos casos, el sustrato está recubierto con al menos dos agentes capaces de unirse a SIGLEC-3 y SIGLEC-9. En algunos casos, la placa proporcionada en un kit puede recubrirse previamente con un agente capaz de unirse a uno o más marcadores de células B.

En algunos casos, el kit comprende un sustrato capaz de unirse a dos o más marcadores de células B, p. ej., dos o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En un caso, el kit comprende además un control positivo de marcador de células B. En un caso, el kit comprende además un control negativo de marcador de células B.

En un caso, un kit comprende uno o más reactivos para detectar un complejo que contiene marcadores de células B unidos a un agente de detección, p. ej., un reactivo detectable, como TMB (tetrametilbencidina), un tampón de lavado y un reactivo de parada.

5 También se describe en este documento un sustrato, p. ej., una placa con pocillos, recubierto con un agente capaz de unirse a uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En algunos casos, el sustrato, p. ej., la placa está recubierta con agentes que detectan dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o todos IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, 10 BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b. En un caso, el sustrato está recubierto con un agente capaz de unir 2 o más de IgM, IgG1, CD72, CD22, FCRLA. En algunos casos, el sustrato está recubierto con al menos dos agentes capaces de unirse a CCL21, CXCL12 y/o CXCL13. En algunos casos, el sustrato está recubierto con al menos dos agentes capaces de unirse a SIGLEC-3 y SIGLEC-9.

15 Los métodos descritos en este documento se basan al menos en parte en el descubrimiento de que ciertos niveles de expresión de marcadores de células B pueden ser indicadores del riesgo de un paciente de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP).

También se describe y/o reivindica en este documento un método para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP, que comprende adquirir conocimiento de uno o más niveles de expresión de marcadores de células B (p. ej., uno o más marcadores de células B proporcionados en la Tabla 4), p. ej., según lo determinado como se describe en este documento en muestra del paciente, y opcionalmente comparando el nivel de expresión adquirido con un estándar de referencia divulgado en este documento, para evaluar de este modo el riesgo.

20 En una realización, los niveles de expresión celular de inhibición se determinan en una muestra biológica de un paciente, tal como una sangre (sangre completa, suero o plasma, o CSF o PBMC). Si el nivel de expresión es significativamente diferente de un estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., Natalizumab, que no desarrolla LMP), se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de desarrollar LMP, y si los niveles de expresión son iguales o sustancialmente similares al estándar de referencia (p. ej., niveles de expresión en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab, que no desarrolla LMP), se determina que el paciente está en un riesgo más bajo de desarrollar LMP. En algunas realizaciones, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo, un riesgo intermedio o un riesgo más alto de LMP (p. ej., mediante los métodos descritos en este documento).

25 En una realización, los niveles de expresión de marcadores de células B se determinan en más de una muestra biológica de un paciente.

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

35 En una realización, el sujeto tiene enfermedad de Crohn (p. ej., enfermedad de Crohn moderada a grave).

En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP, y se le administra además una terapia anti-VLA-4, tal como un anticuerpo anti-VLA-4, como natalizumab, o un fragmento del mismo. (tal como un fragmento de unión a antígeno del mismo).

40 En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo mayor o un riesgo intermedio de desarrollar LMP, y se identifica al paciente como alguien que debería recibir una terapia alternativa, p. ej., el paciente debería dejar de recibir la terapia con anticuerpos anti-VLA-4, p. ej., natalizumab y, p. ej., recibir una terapia alternativa, p. ej., una terapia alternativa aprobada para la esclerosis múltiple (EM) tal como Avonex®. En otra realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto o un riesgo intermedio de desarrollar LMP, y se le administra una terapia de anticuerpos anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

45 En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio o un riesgo más alto de desarrollar LMP en función del nivel de expresión de uno o más marcadores de células B, y el paciente se identifica como alguien que debería recibir pruebas adicionales para determinar el riesgo de desarrollar LMP, p. ej., un riesgo identificado en este documento.

50 En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína marcadora de células B están en o por encima de un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo (p. ej., un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo descrito en este documento) y/o niveles de ácido nucleico marcador de células B están en o por encima de un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo (p. ej., un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo descrito en este documento). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de proteína marcadora de células B según lo determinado están en o por debajo de un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto (p. ej., un nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto descrito en este documento) y/o niveles de ácido nucleico marcador de células B están en o por debajo de un nivel de umbral de ácido nucleico de riesgo más alto (p. ej., un 55

- 5 nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto descrito en este documento). En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de LMP, p. ej., el paciente tiene niveles de proteína marcadora de células B entre el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto y/o niveles de ácido nucleico marcador de células B se encuentran entre un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo y un nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto.
- En un caso, una entidad, p. ej., un proveedor de atención médica, adquiere información resultante de un ensayo de marcador de células B descrito en este documento, y en respuesta a la información, administra un tratamiento descrito en este documento al paciente, p. ej., un paciente con EM.
- 10 En otro caso, se realiza un ensayo de marcador de células B descrito en este documento en un paciente, y luego se trata al paciente, p. ej., se trata al paciente con EM, basado en los resultados del ensayo.
- 15 En cualquiera de los métodos descritos en este documento, los niveles de expresión del marcador de células B en un paciente pueden reevaluarse a intervalos regulares, como cada 3 meses, cada 6 meses o cada 12 meses o a intervalos más largos o con mayor frecuencia. Un cambio observado, p. ej., disminución, en uno o más de los niveles de expresión del marcador de células B puede indicar un aumento en el riesgo del paciente de desarrollar LMP. Por ejemplo, una disminución de 1 o 2 veces en los niveles de expresión del marcador de células B puede indicar un riesgo más alto de LMP. Un paciente que recibe una terapia anti-VLA-4, tal como un natalizumab, puede suspender la terapia con la terapia anti-VLA-4 y, opcionalmente, comenzar la terapia con un agente alternativo, p. ej., un inmunosupresor que no sea una terapia anti-VLA-4 u otro que no sea natalizumab.
- 20 En una realización, un paciente que recibe un anticuerpo anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, puede controlarse, p. ej., cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, quince, veinte, treinta, cuarenta meses, para inhibir los niveles de expresión del marcador celular.
- La evaluación de un paciente como se describe en este documento puede realizarse antes de la administración de una terapia anti-VLA-4, o después de que el paciente haya comenzado una terapia anti-VLA-4.
- 25 En una realización, se determina que un paciente tiene un riesgo más bajo de LMP, tal como por un ensayo descrito en este documento, y al paciente se le administra una terapia anti-VLA-4. En otra realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP y se le administra una terapia anti-VLA-4, p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4, tal como natalizumab. En otra realización más, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP y se le administra una terapia diferente a la terapia anti-VLA-4, tal como un interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide.
- 30 En una realización, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP, y en consecuencia deja de recibir una terapia anti-VLA-4.
- En una realización, después de que se determina que un paciente tiene un riesgo más alto de LMP, p. ej., se determina que el paciente tiene un nivel de expresión de marcador de células A que está por debajo de un nivel umbral de riesgo más alto (p. ej., descrito en este documento), entonces no se vuelve a analizar al paciente para los niveles de expresión de ese marcador de células B. Por ejemplo, el paciente puede interrumpir la terapia con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, y no volver a analizar los niveles de expresión del marcador de células B.
- 35 En una realización, un método para evaluar a un paciente como se describe en este documento, tal como para determinar los niveles de expresión de marcadores de células B, puede incluir además evaluar otras medidas de otros predictores de riesgo. Por ejemplo, un método para evaluar a un paciente puede incluir además: (a) determinar el título de anticuerpos anti-VJC o el porcentaje de inhibición (b) determinar si el paciente ha recibido un tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 (p. ej., más de 24 meses); o (c) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 específica (p. ej., mitoxantrona u otras terapias en los últimos 2, 3, 5 años o alguna vez en la vida del paciente).
- 40 En una realización, el paciente recibió previamente una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, y en otra realización, al paciente se le administra una terapia anti-VLA-4, basada en una evaluación, p. ej., una evaluación de niveles de expresión de marcadores de células B. Por ejemplo, como resultado de la evaluación, el paciente puede clasificarse como candidato para la terapia anti-VLA-4. En una realización, se administra además la terapia a un paciente clasificado como candidato para la terapia anti-VLA-4.
- 45 También se describe y/o se reivindica en este documento un método para evaluar a un paciente, p. ej., como un candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4.
- 50 El método incluye, por ejemplo, adquirir o determinar niveles de expresión de uno o más marcadores de células B (p. ej., uno o más marcadores de células B proporcionados en la Tabla 4) en una muestra biológica del paciente, p. ej., mediante un método descrito en este documento. Si se determina que el nivel de expresión del marcador de células B está por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto, entonces el paciente puede clasificarse como adecuado para el tratamiento con una primera categoría de terapia, como una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. Si se determina que el nivel de expresión del marcador de células B es igual o está por debajo de un nivel de umbral de
- 55

riesgo más alto, el paciente se clasifica como adecuado para una segunda categoría de terapia, p. ej., interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide. Adquirir un nivel de expresión de marcador de células B en una muestra de un paciente puede incluir extraer una muestra biológica del cuerpo del paciente o analizar una muestra del paciente. El método de evaluación también puede incluir la administración de una terapia, como de la primera categoría (p. ej., natalizumab) o la segunda categoría (p. ej., interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide), al paciente.

5 Como se discutió anteriormente, los métodos de evaluación de un paciente pueden incorporar más de una consideración o factor. Por lo tanto, los métodos de evaluación de un paciente pueden incluir además:

(aa) determinar el título de anticuerpo anti-VJC o porcentaje de inhibición.

10 (bb) determinar si el paciente ha recibido un tratamiento prolongado con una terapia anti-VLA-4 (p. ej., más de 24 meses) y en realizaciones que proporcionan una clasificación de exposición previa a la terapia anti-VLA-4; o

(cc) determinar si el paciente ha recibido una terapia inmunosupresora específica no anti-VLA-4 (p. ej., en los últimos 2, 3, 5 años o alguna vez en la vida del paciente), y en realizaciones que proporcionan una clasificación de exposición previa a inmunosupresores.

15 En una realización, el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4. En otra realización, el método incluye administrar una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab al paciente.

En una realización, el paciente se clasifica como candidato para la terapia anti-VLA-4, y se le administra además la terapia anti-VLA-4.

20 Pacientes que tienen niveles de expresión de marcadores de células B en o por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto, que han recibido una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab durante 24 meses o menos, que no han recibido previamente una terapia inmunosupresora (que no sea terapia anti-VLA-4), y los que dan negativo para la exposición al VJC (p. ej., negativo para los anticuerpos contra el VJC) normalmente tienen el riesgo más bajo de desarrollar LMP. Por el contrario, los pacientes tienen niveles de expresión de marcadores de células B en o por debajo de un nivel de umbral de riesgo más alto, que recibieron terapia anti-VLA-4 durante más de 24 meses, que recibieron previamente una terapia inmunosupresora (que no sea una terapia anti-VLA-4) y quienes dan positivo por

25 exposición al VJC (p. ej., positivo por anticuerpos contra el VJC) normalmente tienen el riesgo más alto de desarrollar LMP. En una realización, si el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B en o por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, se administra al paciente una terapia anti-VLA4, p. ej., un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab. En una realización, si el paciente tiene un nivel de expresión de marcador de células B en o por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto y si el paciente tiene un nivel de expresión de

30 marcador de células B en o por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, se administra al paciente una terapia anti-VLA4, p. ej., un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab. En una realización, si el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B en o por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, tiene un estado de VJC positivo y una clasificación de exposición previa a inmunosupresores positiva que corresponde a haber recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 dentro de un período de tiempo

35 preseleccionado, p. ej., dentro de 1, 3 o 5 años, o en la vida del paciente; y/o una clasificación de exposición previa a inmunosupresores negativa que corresponde a estar libre de una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4, al paciente se le administra una terapia anti-VLA4, p. ej., un anticuerpo anti-VLA4, p. ej., natalizumab.

El nivel de riesgo de un paciente para LMP puede evaluarse evaluando uno, o dos, o tres o los cuatro factores de riesgo identificados.

40 El control mejorado también puede incluir imágenes de MRI para identificar lesiones cerebrales debido a LMP.

En una realización, el paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4, y en otra realización, el paciente no ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4.

En otra realización más, el paciente se clasifica como candidato para la terapia anti-VLA-4, y se administra al paciente una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

45 En una realización, hacer una determinación, p. ej., determinar los niveles de expresión de marcadores de células B de un paciente, requiere proporcionar (p. ej., obtener o recibir) una muestra biológica del paciente, y realizar un inmunoensayo, tal como un ensayo descrito en este documento para detectar niveles de expresión de la proteína marcadora de células B en la muestra. En otra realización, una determinación, p. ej., determinar los niveles de expresión de marcadores de células B de un paciente requiere proporcionar una muestra biológica del paciente y

50 realizar un ensayo, tal como un ensayo basado en PCR, para detectar ácido nucleico marcador de células B en la muestra.

Si el paciente se clasifica como un candidato para la terapia anti-VLA-4, puede administrarse además al paciente una terapia anti-VLA-4. Se determina que un paciente clasificado como candidato para la terapia anti-VLA-4 tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP.

Se determina que un paciente no clasificado como candidato para la terapia anti-VLA-4, o que se determina que es candidato para la terapia anti-VLA-4 con un mejor control para el desarrollo de LMP, tiene un riesgo más alto de desarrollar LMP.

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

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

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

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

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

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

En una realización, el método comprende proporcionar una clasificación de idoneidad del tratamiento, que, p. ej., puede seleccionarse de una de las siguientes:

20 una clasificación de idoneidad del tratamiento positiva que se correlaciona con la idoneidad del paciente para el tratamiento anti-VLA-4 (la clasificación de idoneidad del tratamiento positivo puede subdividirse en clasificaciones de idoneidad del tratamiento positivas que se acompañan de varias advertencias o requisitos para el seguimiento, tal como un mayor seguimiento para el desarrollo de LMP); y

25 una clasificación negativa de idoneidad del tratamiento que se correlaciona con la inadecuación del paciente para el tratamiento anti-VLA-4, o la idoneidad del paciente para el tratamiento anti-VLA-4, acompañado de varias advertencias o requisitos para un mayor control, como el desarrollo de LMP.

Una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva se correlaciona con un riesgo más bajo de desarrollar LMP, y una clasificación de idoneidad de tratamiento negativa se correlaciona con un riesgo más alto de desarrollar LMP. Un riesgo más bajo de desarrollar LMP normalmente corresponde a un riesgo más bajo que 0,2/1000 pacientes, y un riesgo más alto de desarrollar LMP corresponde a un riesgo de  $\geq 0,37/1000$ .

30 En una realización, si el paciente es positivo, p. ej., tiene un nivel de expresión por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto, para uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento, al paciente se le asigna una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva. En algunas realizaciones, si al paciente se le asigna una clasificación de riesgo intermedio, al paciente se le asigna una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva, p. ej., una clasificación de idoneidad de tratamiento positiva modificada que aconseja o

35 requiere control para el desarrollo de LMP.

En una realización, al paciente se le asigna una clasificación positiva de idoneidad para el tratamiento, y al paciente se le administra además una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

También se describe en este documento un método para evaluar a un paciente, p. ej., también se proporciona la evaluación del riesgo de un paciente de desarrollar LMP. El método incluye dos o más de (p. ej., 3 o todos):

40 (aaa) determinar si el nivel de expresión de un marcador de células B (p. ej., un marcador de células B proporcionado en la Tabla 4) es menor o mayor que un criterio preseleccionado, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este documento;

(bbb) determinar si el paciente es negativo o positivo para VJC, tal como determinar si el nivel de anticuerpos anti-VJC es menor o mayor que un criterio preseleccionado, p. ej., según lo determinado por un método descrito en este

45 documento;

(ccc) determinar si el paciente ha recibido una terapia anti-VLA-4 por más de un período de tiempo preseleccionado (p. ej., más de 24 meses), o menos de un período de tiempo 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 nunca en la vida del paciente;

50 (ddd) determinar si el paciente ha estado libre de una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 por un período de tiempo preseleccionado o si ha recibido una terapia inmunosupresora no anti-VLA-4 por un período de tiempo

preseleccionado (un tiempo especificado) (p. ej., los últimos 1, 2, 3, 4, 5 o 10 años, o alguna vez en la vida del paciente); y sensible a las determinaciones, evaluando al paciente.

5 El método puede requerir además administrar una terapia al paciente. La terapia puede, p. ej., en el caso de un paciente de riesgo bajo o riesgo intermedio, ser una terapia anti-VLA-4 (p. ej., anticuerpo anti-VLA-4), o, p. ej., en el caso de un riesgo alto o intermedio paciente de riesgo, una terapia alternativa (no anti-VLA-4), p. ej., un interferón, acetato de glatiramer o un corticosteroide.

10 En un caso, se describe un método para cumplir con las instrucciones. Las instrucciones pueden, por ejemplo, aparecer en un prospecto requerido por el gobierno, p. ej., un paquete de mandato de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) o EMA (Agencia Europea del Medicamento), y proporcionar una guía para el uso de una terapia anti-VLA-4. El método para cumplir con las instrucciones incluye, opcionalmente, recibir las instrucciones; adquirir los resultados de un método de evaluación descrito en este documento y responder al resultado adquirido, proporcionar una recomendación de terapia a un paciente y, opcionalmente, administrar una terapia adicional al paciente. La instrucción puede especificar un método evaluativo como se describe en este documento, es esencial para administrar la terapia de manera segura. La terapia puede ser una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab.

15 Se describe un método de evaluación de un paciente, donde el método requiere proporcionar un kit para la recolección o transporte de una muestra de paciente a un proveedor de atención médica; recibir una muestra de paciente del proveedor de atención médica; realizar un método como se reivindica en este documento.

20 También se describe un método computarizado para autorizar el reembolso, tal como el coste de una terapia anti-VLA-4. La parte a reembolsar puede ser un tercero pagador, tal como una compañía de seguros o una agencia gubernamental. El método puede incluir (a) adquirir el resultado de un método de evaluación del paciente descrito en este documento, y registrar el resultado en un medio legible por ordenador; (b) adquirir evidencia de la administración de una terapia anti-VLA-4 al paciente y registrar la evidencia en un medio legible por computadora; y (c) si el resultado es consistente con la administración de la terapia anti-VLA-4, autorizando el reembolso o el reembolso a la parte.

25 Descrito y/o reivindicado en este documento un método para seleccionar o clasificar a un paciente como candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. Por ejemplo, el método 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 haya recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, y evaluar los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B (p. ej., uno o más marcadores de células B proporcionados en la Tabla 4), p. ej., mediante un método descrito en este documento. En una realización, la evaluación implica analizar una muestra del paciente. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, plasma o suero, una muestra de LCR o una muestra de PBMC. Si la evaluación indica que el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B igual o inferior a un nivel de umbral de riesgo más alto, entonces el paciente no se selecciona o clasifica como candidato para el tratamiento con la terapia anti-VLA-4. Si la evaluación indica que el paciente tiene niveles de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto, entonces el paciente se selecciona o clasifica como candidato para recibir tratamiento con la terapia anti-VLA-4.

35 Un ensayo para la expresión de la proteína marcadora de células B puede ser un inmunoensayo, tal como un ensayo ELISA u otro ensayo descrito en este documento. Un ensayo para el ácido nucleico marcador de células B puede ser, p. ej., un ensayo de PCR o un método de secuenciación de próxima generación (NGS) o cualquier otro método descrito en este documento.

40 Un paciente que se determine que tiene un riesgo más bajo o un riesgo intermedio de LMP puede recibir además una terapia anti-VLA-4, como natalizumab. A un paciente que se determine que tiene un riesgo más alto de LMP se le puede administrar una alternativa a una terapia anti-VLA-4, tal como un interferón, acetato de glatiramer, un corticosteroide o un agonista de TNF. En una realización, a un paciente que se determina que tiene un riesgo más alto de LMP se le puede administrar una terapia anti-VLA-4 adicional, y se le puede solicitar que reciba una mayor frecuencia de pruebas de LMP, p. ej., cualquier riesgo descrito en este documento, p. ej., por cualquier método descrito en este documento, y donde se determina inicialmente que el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por debajo de un nivel de umbral de riesgo más bajo, y es opcionalmente negativo para VJC, o cualquier otro factor de riesgo descrito en este documento, o tiene cualquier combinación de factores de riesgo descritos en este documento, también puede requerirse que reciba una mayor frecuencia de pruebas para detectar niveles de marcadores de células B y, opcionalmente, niveles de VJC, o cualquier otro factor de riesgo descrito en este documento, o cualquier combinación de factores de riesgo descritos en este documento.

55 También se describe y/o reivindica en este documento el tratar a un paciente. El método de tratamiento incluye determinar los niveles de expresión de un paciente de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). Opcionalmente, el método incluye además determinar el estado del paciente para VJC y/o determinar la exposición previa del paciente a una terapia anti-VLA-4, y/o determinar si el paciente recibió tratamiento previamente con un inmunosupresor.

En algunas realizaciones, si se determina que el paciente tiene un nivel de expresión de células B en o por debajo de un nivel de umbral de riesgo más alto, y opcionalmente se determina que ha recibido la terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, es VJC negativo, y no haber recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP y se le administra la terapia anti-VLA-4. Si se determina que el paciente tiene un nivel de expresión de células B igual o inferior a un nivel de umbral de riesgo más alto, y opcionalmente se determina que es VJC negativo, que ha recibido natalizumab durante más de 24 meses (p. ej., 25 meses o más), y no haber recibido tratamiento previo con un inmunosupresor, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP y se le administra una alternativa a la terapia anti-VLA-4, p. ej., un interferón, un corticosteroide, una estatina o un TNF antagonista.

10 Determinar la exposición previa del paciente a una terapia anti-VLA-4 o un inmunosupresor puede incluir preguntarle al paciente o al cuidador, p. ej., un médico, enfermera, padre u otro cuidador. En algunos casos, determinar la exposición previa del paciente puede incluir el acceso a la información en una base de datos, p. ej., una base de datos de registros médicos.

15 También se describe y/o reivindica en este documento un método para determinar el riesgo de un paciente de LMP. El método incluye determinar los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGDM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, CXCL13 BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En algunas realizaciones, el método incluye además 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 puede determinarse el estado del anticuerpo anti-VJC del paciente. Si se determina que el paciente recibió una terapia anti-VLA-4 durante 24 meses o menos, y que no recibió tratamiento previamente con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de LMP. Si se determina que el paciente ha recibido terapia anti-VLA-4 por más de 24 meses, y no ha recibido previamente tratamiento con un inmunosupresor, entonces se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP. A un paciente que se determine que tiene un riesgo más bajo de LMP se le puede administrar además una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. Por el contrario, a un paciente que se determine que tiene un riesgo más alto de LMP se le puede administrar una alternativa a la terapia anti-VLA-4, p. ej., un interferón, un corticosteroide, una estatina o un antagonista del TNF.

30 En una realización, se determina el estado de marcadores de células B del paciente, y si se determina que el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel umbral de riesgo más alto, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos aquí, entonces se determina el paciente tener un riesgo más bajo de LMP que si se determinara que el paciente tiene un nivel de expresión de marcadores de células B en o por debajo del nivel de umbral de riesgo más alto.

35 En una realización, según el riesgo determinado de LMP, p. ej., según los resultados de un ensayo descrito en este documento, p. ej., un ensayo de marcadores de células B, se determina que el sujeto es uno o más de: i) un candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, como natalizumab; ii) un no candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, como natalizumab; iii) un candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, iv) un no candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador; iv) un candidato que debería tener un control mejorado en comparación con un sujeto que se determina que tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un candidato que se determina que tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto puede seleccionarse como candidato para recibir terapia anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un candidato que ha recibido tratamiento previo con una terapia anti-VLA-4, p. ej., durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses, y quién está determinado a tener un nivel de expresión de marcador de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto puede seleccionarse como candidato para recibir más terapia anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un candidato que ha recibido terapia previa con un inmunosupresor, y que se determina que tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto puede seleccionarse como candidato para recibir terapia adicional anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un candidato que se determina que es positivo para VJC, pero que se determina que tiene un nivel de expresión de marcadores de células B por encima de un nivel de umbral de riesgo más alto puede seleccionarse como candidato para recibir terapia adicional anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un sujeto puede seleccionarse como candidato para recibir más terapia anti-VLA-4, pero con una recomendación para controlar al paciente con mayor frecuencia para el desarrollo de síntomas adversos, tales como síntomas que pueden indicar el desarrollo de LMP

55 Al menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A continuación, se describen métodos y materiales adecuados, aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

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

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIGURA 1 representa ejemplos de transcripciones expresadas diferencialmente en pacientes con LMP frente a pacientes sin LMP.
- La FIGURA 2 representa ejemplos de proteínas expresadas diferencialmente (BCMA, CCL21 y SIGLEC 9) en pacientes con LMP frente a sin LMP.
- 10 La FIGURA 3 representa ejemplos de proteínas expresadas diferencialmente (SIGLEC 3 e IgG1) en pacientes con LMP frente a sin LMP.
- La FIGURA 4 representa ejemplos de proteínas expresadas diferencialmente (IgM e IgG1) en pacientes con LMP frente a sin LMP.

### Descripción detallada

15 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de métodos nuevos y mejorados para evaluar el riesgo de un paciente de LMP que incluyen evaluar la modulación, p. ej., aumento o disminución, de varios marcadores celulares. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la presencia o ausencia y/o cantidad de uno o más marcadores específicos de células B que puede ser un indicador del riesgo de un paciente de desarrollar Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (LMP).

20 Los solicitantes han descubierto que en pacientes que tienen niveles más bajos de expresión de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b), p. ej., en comparación con un estándar de referencia, el paciente puede tener un riesgo más alto de desarrollar LMP. Los solicitantes también han descubierto que en pacientes que tienen niveles de expresión más altos de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b), p. ej., en comparación con un estándar de referencia, el paciente puede tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP. Según la invención reivindicada, los niveles de expresión totales de uno o más de IgM e IgG1 son un indicador del riesgo de un paciente de desarrollar LMP. En algunas realizaciones, el paciente es evaluado además para otros parámetros asociados con un riesgo de desarrollar LMP, que incluyen pero no se limitan a, si el paciente ha recibido terapia inmunosupresora (IS) previa, y/o título anti-VJC.

Los niveles de marcadores de células B pueden determinarse mediante cualquier método disponible. Por ejemplo, en este documento se describen métodos de detección de productos de transcripción y traducción ejemplares.

35 Un paciente puede ser controlado a intervalos regulares, como cada 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, cada 12 meses o más para un cambio en los niveles de expresión de marcadores de células B. Un paciente puede ser controlado durante un período de tiempo, como durante un período de 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses, 24 meses o más. Si los resultados de un ensayo posterior indican que el paciente todavía tiene un título de anticuerpos anti-VJC de nOD inferior a 0,5 y, opcionalmente, un porcentaje de inhibición de < 70%, entonces puede determinarse que el paciente aún tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP. Si un análisis posterior indica que el título de anticuerpos del paciente aumenta de 2 a 3 veces desde el análisis inicial, entonces puede determinarse que el paciente tiene un riesgo mayor o mayor de desarrollar LMP. Los solicitantes observaron que los pacientes diagnosticados con LMP tienden a demostrar un aumento en el título de anticuerpos y nOD de 2 a 3 veces en los seis meses anteriores al diagnóstico. Además, los solicitantes observaron que los pacientes que tienen más de una muestra positiva de anticuerpos anti-VJC a lo largo del tiempo, pero el índice de anticuerpos está constantemente por debajo del umbral, puede determinarse que tienen un riesgo más bajo de desarrollar LMP. En algunas realizaciones, un paciente tiene un riesgo más bajo si el paciente es consistentemente negativo para anticuerpos anti-VJC durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, un paciente tiene un riesgo más bajo si el paciente tiene más de una muestra tomada durante un período de tiempo que es positivo para anticuerpos anti-VJC, donde el nivel de índice es 1,5 o menor. En algunas realizaciones, un paciente tiene un riesgo más bajo si el paciente tiene más de una muestra tomada durante un período de tiempo que es positivo para anticuerpos anti-VJC, donde el nivel de índice es 1,2 o menor. En algunas realizaciones, un paciente tiene un riesgo más bajo si el paciente tiene más de una muestra tomada durante un período de tiempo que es positivo para anticuerpos anti-VJC, donde el nivel de índice es 0,9 o menor.

55 Un paciente tiene un riesgo más alto de LMP si, (i) se determina que el título de anticuerpos anti-VJC indicado por el valor índice o nOD es > 3 y se determina que el valor de porcentaje de inhibición es > 70%, o (ii) el paciente mostró un aumento en el índice, nOD o título en 2 veces con respecto a una prueba anterior. En algunas realizaciones, un

paciente tiene un riesgo más alto de LMP si el paciente es consistentemente positivo para anticuerpos anti-VJC durante un período de tiempo, con un nivel de índice por encima de un valor de umbral, p. ej., con un valor de índice mayor que 0,9, mayor que 1,0, mayor que 1,1, mayor que 1,2, mayor que 1,3, mayor que 1,4 o mayor que 1,5. En algunas realizaciones, un paciente tiene un alto riesgo de LMP si tiene más de dos o más, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más, muestras consecutivas durante un período de tiempo con un nivel de índice por encima de un umbral valor, p. ej., con un valor de índice mayor que 0,9, mayor que 1,0, mayor que 1,1, mayor que 1,2, mayor que 1,3, mayor que 1,4 o mayor que 1,5.

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

título de anticuerpos puede medirse por "nOD" o "índice". "nOD" es el valor de densidad óptica normalizado en una prueba, tal como una prueba ELISA, para la detección de anticuerpos anti-VJC. El valor "índice" es el valor de densidad óptica de la muestra dividido por la densidad óptica del control positivo en un inmunoensayo, tal como el ensayo ELISA.

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, tienen un riesgo más bajo de desarrollar LMP, que los pacientes que no cumplen con estos dos criterios. Además, los pacientes que tienen el riesgo más bajo son aquellos que cumplen estos dos criterios y que también son negativos para VJC, p. ej., pacientes que no dan positivo para anticuerpos anti-VJC o ácido nucleico de VJC, p. ej., ADN de VJC. Anteriormente se desconocía que cada uno de estos tres factores de riesgo ((i) la cantidad de tiempo que el paciente haya recibido previamente una terapia anti-VLA-4; (ii) si un paciente ha recibido previamente o no un tratamiento con un inmunosupresor que no sea un la terapia anti-VLA-4 y (iii) el estado de VJC) contribuyen de forma independiente al riesgo de LMP de un paciente. Las invenciones descritas en este documento pueden usarse en general para pacientes tratados con un inhibidor de VLA-4. La capacidad de identificar subpoblaciones de pacientes con riesgos de LMP claramente diferentes permite una mejor caracterización del riesgo que los métodos anteriores (es decir, el riesgo global de LMP) y debería ayudar a los profesionales sanitarios y a los pacientes a tomar decisiones de tratamiento de beneficio-riesgo más informadas. Estos criterios de evaluación de riesgos se describen en las solicitudes provisionales de EE.UU. 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 este documento dirigidos al título de anticuerpos anti-VJC (p. ej., medido por nOD o nivel de índice) y, opcionalmente, el porcentaje de inhibición puede considerarse en combinación con los factores de riesgo descritos en las solicitudes provisionales de copropiedad anteriores.

Los métodos para determinar el riesgo de LMP pueden requerir la adquisición de una, dos o las tres clasificaciones de VJC para un paciente (p. ej., Título de anticuerpos anti-VJC, tal como medido por nOD o nivel de índice y, opcionalmente, porcentaje de inhibición), historial de terapia anti-VLA-4 previo para el paciente e historial de terapia inmunosupresora previa (diferente a la terapia anti-VLA-4) para el paciente. En respuesta a estas clasificaciones, a un paciente se le puede asignar una clasificación de adecuación al tratamiento. A los pacientes que se determina que tienen un riesgo bajo de desarrollar LMP se les puede asignar una clasificación de tratamiento positiva, y a los pacientes que tienen un riesgo relativo más alto 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 para un tratamiento adicional o para iniciar el tratamiento con una terapia anti-VLA-4. Un paciente que recibe una clasificación de tratamiento negativa puede recibir una recomendación para finalizar el tratamiento con un anti-VLA-4, una recomendación para iniciar el tratamiento con una terapia no anti-VLA-4, una recomendación para continuar o iniciar la terapia anti-VLA4 con un aumento vigilancia de signos y síntomas de LMP.

Una recomendación para un tratamiento adicional con una terapia anti-VLA-4 puede ir acompañada de instrucciones o requisitos adicionales para que el paciente reciba control adicional o mejorado, como si uno o más factores indican que el paciente puede tener un riesgo más alto de 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 que no sea una terapia anti-VLA-4.

Puede determinarse que un paciente ha recibido previamente una terapia anti-VLA-4 o una terapia inmunosupresora que no sea una terapia anti-VLA-4 a través de la auto información del paciente, o mediante información (verbal o escrita) proporcionado por un padre, médico, asistente médico, enfermera u otro proveedor de atención médica. La información también puede obtenerse a través de una base de datos, como una base de datos médica o una base de datos de ensayos clínicos.

Las terapias inmunosupresoras previas, distintas de la terapia anti-VLA-4, que serán indicativas de un riesgo más alto de LMP pueden incluir el tratamiento previo con antineoplásicos, inmunosupresores o inmunomoduladores, tales como uno o más beta-interferón 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 mofetilo. También se pronosticará que el tratamiento previo con otras terapias

inmunosupresoras como se describe a continuación aumentará el riesgo de LMP de un paciente después de la administración adicional de una terapia anti-VLA-4. En general, una determinación del uso previo de inmunosupresores es un uso específico que puede ser cualquier uso previo de un inmunosupresor que no sea un inhibidor de VLA-4 (p. ej., un anticuerpo anti-VLA-4) (p. ej., en la vida del paciente) o uso anterior dentro de un período de tiempo específico, p. ej., dentro de los 1, 2, 3, 5 o 10 años anteriores a la evaluación del riesgo de LMP.

Si se identifica la presencia de un marcador de células B en una muestra biológica de un paciente, p. ej., uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, proteínas Notch1, Jag1 y C3b, péptidos o ácidos nucleicos, se determina que el paciente es "marcador de células B positivo". Una clasificación positiva de marcadores de células B corresponde a la presencia de uno o más marcadores de células B en la muestra biológica, p. ej., uno o más niveles de expresión de marcadores de células B que son iguales o mayores que un criterio preseleccionado. El criterio preseleccionado es típicamente un valor cualitativo, p. ej., una cantidad "detectable" de proteína, péptido o ácido nucleico según un ensayo particular, p. ej., un inmunoensayo.

Los métodos descritos en este documento para determinar el riesgo de LMP pueden ser útiles para cualquier sujeto humano, incluyendo un sujeto que esté 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-CD 11a (p. ej., efalizumab) o micofenolato de mofetilo; en un sujeto que actualmente está siendo tratado con un inmunomodulador; o un sujeto que ha interrumpido el tratamiento con un inmunomodulador. El método puede ser útil para otras personas que pueden ser susceptibles a LMP, tales como individuos que tienen trastornos linfoproliferativos, tales como mieloma múltiple o linfoma; individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o que hayan adquirido el síndrome de inmunodeficiencia (SIDA), neoplasias hematológicas o una enfermedad autoinmune como el lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad inflamatoria intestinal, como la enfermedad de Crohn (EC) o ulcerativa colitis, esclerosis múltiple (EM) o artritis, p. ej., artritis reumatoide (AR). El método de evaluación de riesgos también puede ser útil para sujetos que reciben terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras, tales como los pacientes trasplantados. Las terapias inmunosupresoras o inmunomoduladoras ejemplares incluyen natalizumab, rituximab, efalizumab, y micofenolato mofetilo. El método puede ser útil para evaluar el riesgo en un sujeto que tiene un trastorno o que está siendo tratado con un medicamento, descrito en Piccinni et al. "Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents" Eur. J. Clin. Pharmacol 66:199-206, 2010.

#### *Definiciones*

Tal como se emplean en este documento, los artículos «un» y «una» hacen referencia a uno o más de uno (p. ej., a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo.

Generalmente «alrededor de» y «aproximadamente» significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Los grados de error de ejemplo se encuentran entre 20 por ciento (%), normalmente, en el 10% y más comúnmente, en el 5% de un valor o intervalo de valores dado.

"Adquirir" o "que adquiere" como se usan los términos en este documento, se refieren a obtener la posesión de una entidad física, o un valor, p. ej., un valor numérico, al "adquirir directamente" o "adquirir indirectamente" la entidad física o el valor. "Adquirir directamente" significa realizar un proceso físico (p. ej., realizar un método sintético o analítico) para obtener la entidad o valor físico. "Adquirir indirectamente" se refiere a recibir la entidad o valor físico de otra parte o fuente (p. ej., un laboratorio externo que adquirió directamente la entidad o el valor físico). La adquisición directa de una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, p. ej., un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen hacer 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, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Adquirir directamente un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (a veces denominado en este documento como "análisis físico"), realizando un método analítico, p. ej., un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, p. ej., un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinando un analito, o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, p. ej., un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, 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 del mismo, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

"Adquirir una muestra" como se usa el término en este documento, se refiere a obtener posesión de una muestra, p. ej., una muestra de tejido o muestra de proteína o muestra de ácido nucleico, "adquiriendo directamente" o "adquiriendo indirectamente" la muestra. "Adquirir directamente una muestra" significa realizar un proceso (p. ej., realizar un método físico como una cirugía o extracción) para obtener la muestra. "Adquirir indirectamente una muestra" se refiere a recibir la muestra de otra parte o fuente (p. ej., un laboratorio externo que adquirió la muestra directamente). Adquirir directamente una muestra incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una

sustancia física, p. ej., un material de partida, como un tejido, p. ej., un tejido en un paciente humano o un tejido que se ha aislado previamente de un paciente. Los cambios ejemplares incluyen hacer una entidad física a partir de un material de partida, disecar o raspar un tejido; separar o purificar una sustancia (p. ej., una muestra de tejido o una muestra de proteína o una muestra de ácido nucleico); combinar dos o más entidades separadas en una mezcla; realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Adquirir directamente una muestra incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., como se describió anteriormente.

Como se usa en este documento, el término "sonda" se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse selectivamente a una molécula objetivo específicamente prevista, por ejemplo, un producto de transcripción, p. ej., un ARNm o ADNc, o un producto de traducción, p. ej., un polipéptido o proteína. Las sondas pueden ser sintetizadas por un experto en la técnica o derivadas de preparaciones biológicas apropiadas. Para fines de detección de la molécula objetivo, las sondas pueden diseñarse específicamente para ser marcadas, como se describe en este documento. Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, entre otras, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y monómeros orgánicos.

"Muestra", "muestra de tejido", "muestra de sujeto o paciente", "célula de sujeto o paciente o muestra de tejido" o "espécimen" se refieren a una muestra biológica obtenida de un tejido, p. ej., un fluido corporal, de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido a partir de un producto fresco, congelado y/o órgano conservado, muestra de tejido, biopsia o aspirado; sangre o cualquier componente sanguíneo (p. ej., suero, plasma); fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, sangre completa, plasma y suero. La muestra puede incluir una fracción no celular (por ejemplo, plasma, suero, u otro fluido corporal no celular). En una realización, la muestra es una muestra de suero. En otras realizaciones, el fluido corporal del que se obtiene la muestra de un individuo comprende sangre (p. ej., sangre completa). En ciertas realizaciones, la sangre puede procesarse adicionalmente para obtener plasma o suero. En otra realización, la muestra contiene un tejido, células (p. ej., células mononucleares de sangre periférica (PBMC)). En una realización, la muestra incluye células B. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de biopsia con aguja fina, una muestra de archivo (p. ej., una muestra de archivo con un diagnóstico conocido y/o historial de tratamiento), una sección histológica (p. ej., una sección congelada o fijada con formalina, p. ej., después de un almacenamiento prolongado), entre otros. El término muestra incluye cualquier material obtenido y/o derivado de una muestra biológica, que incluye un polipéptido, y ácido nucleico (p. ej., ADN genómico, ADNc, ARN) purificado o procesado a partir de la muestra. Purificar y/o el procesar la muestra puede implicar una o más de extracción, concentración, aislamiento de anticuerpos, clasificación, concentración, fijación, adición de reactivos y similares. La muestra puede contener compuestos que no se entremezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza, como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

#### *Sondas y métodos para la detección de productos de traducción*

Los métodos basados en sondas para la detección de productos de traducción incluyen, pero no se limitan a: transferencia Western, inmunotransferencia, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón de superficie, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis de inmunohistoquímica, cromatografía líquida, espectrometría de masas (LC-MS), espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistido por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, microarrays, microscopía, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), citometría de flujo, citometría de escaneo láser, analizador de hematología y ensayos basados en una propiedad de la proteína que incluye pero no se limita a la unión de ADN, unión de ligando, o interacción con otras proteínas asociadas.

El producto de traducción o polipéptido puede detectarse y cuantificarse mediante cualquiera de varios medios bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos pueden incluir métodos bioquímicos analíticos como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, y similares, o varios métodos inmunológicos tales como reacciones de precipitación en fluidos o gel, inmunodifusión (simple o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, transferencia Western, inmunohistoquímica y similares. Un técnico experto puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteína anticuerpo para usar en la determinación del nivel de expresión de uno o más biomarcadores en una muestra de suero.

Una sonda útil para detectar un polipéptido es un anticuerpo capaz de unirse al polipéptido, p. ej., un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (p. ej., Fab o F(ab')<sub>2</sub>). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcado directo de la sonda o anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado final de una sonda de ADN con biotina de modo que pueda detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Una sonda de anticuerpo puede marcarse, p. ej., un anticuerpo marcado radioactivamente, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima. En otra realización, un derivado de anticuerpo (p. ej., un anticuerpo

conjugado con un sustrato o con la proteína o ligando de un par proteína-ligando {p. ej., biotina-estreptavidina}), o un fragmento de anticuerpo (p. ej., un anticuerpo de cadena sencilla, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.) que se une específicamente con una proteína correspondiente al marcador, tal como la proteína codificada por el marco de lectura abierto correspondiente al marcador o tal como una proteína que ha sufrido la totalidad o una parte de su modificación postraduccional normal.

La inmunohistoquímica o IHC se refiere al proceso de localizar antígenos (p. ej., proteínas), p. ej., en células de una sección de tejido u otra muestra, aprovechando el principio de unión de anticuerpos específicamente a antígenos en tejidos biológicos. Los marcadores moleculares específicos son característicos de eventos celulares particulares como la proliferación o la muerte celular (apoptosis). La visualización de una interacción anticuerpo-antígeno puede lograrse de varias formas. En el caso más común, un anticuerpo se conjuga con una enzima, como la peroxidasa, que puede catalizar una reacción productora de color. Alternativamente, el anticuerpo también puede etiquetarse a un fluoróforo, como fluoresceína, rodamina, DyLight Fluor o Alexa Fluor.

Las proteínas de muestras de tejido, p. ej., células, pueden aislarse usando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados pueden ser, p. ej., los descritos en Harlow y Lane (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

En un formato, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, pueden usarse como sondas en métodos tales como transferencias de Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, uno puede inmovilizar el anticuerpo o las proteínas en un soporte sólido. Los soportes o vehículos en fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o un anticuerpo. Los sustratos conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales o modificadas, poli(acrilamidas, agarosa y magnetita.

Un experto en la técnica conocerá otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos o antígenos y podrá adaptar dicho soporte para usar con la presente invención. Por ejemplo, proteínas aisladas a partir de células pueden realizarse en un gel de poli(acrilamida e inmovilizarse sobre un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte puede lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. El soporte de fase sólida puede lavarse con el tampón por segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcador unido sobre el soporte sólido puede detectarse luego por medios convencionales. Los medios de detección de proteínas usando técnicas electroforéticas son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase en general, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY.; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology* vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., NY.).

En otra realización, el análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) se usa para detectar y cuantificar la presencia de un polipéptido en la muestra. La técnica comprende generalmente separar las proteínas de la muestra mediante electroforesis en gel basado en el peso molecular, transferir las proteínas separadas en un soporte sólido adecuado (tales como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o un filtro derivado de nailon), e incubar la muestra con anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de interés. Los anticuerpos se unen específicamente al polipéptido de interés en el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o alternativamente pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (p. ej., anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente a los anti-polipéptidos.

En otra realización, el polipéptido se detecta usando un inmunoensayo. Como se usa en este documento, un inmunoensayo es un ensayo que utiliza un anticuerpo para unirse específicamente al analito. El inmunoensayo se caracteriza así mediante la detección de la unión específica de un polipéptido a un anti-anticuerpo en oposición al uso de otras propiedades físicas o químicas para aislar, identificar y cuantificar el analito.

El polipéptido se detecta y/o cuantifica usando cualquiera de los números de ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos (véase, p. ej., los documentos de Patente de EE.UU. Nos. 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; y 4,837,168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase también Asai (1993) *Methods in Cell Biology* Volume 37: *Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. Nueva York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology* 7th Edition.

En otra realización, se detecta y/o cuantifica el polipéptido utilizando la tecnología de ensayo Luminex™. El ensayo Luminex™ separa microsferas codificadas por colores en, p. ej., conjuntos distintos que se recubren cada uno con un reactivo para un bioensayo particular, lo que permite la captura y detección de analitos específicos de una muestra de manera múltiple. La tecnología de ensayo Luminex™ puede compararse con un ensayo ELISA múltiple que utiliza citometría de fluorescencia basada en perlas para detectar analitos tales como biomarcadores.

En otra realización, se detecta y/o cuantifica el polipéptido utilizando enfoque isoelectrico (IEF). La tecnología IEF separa moléculas, p. ej., proteínas, basándose en diferencias en su punto isoelectrico (pI), p. ej., que generalmente se correlaciona con el contenido relativo de residuos ácidos y básicos en la proteína. Las proteínas pueden separarse por enfoque isoelectrico como primera etapa en la electroforesis en gel bidimensional, y pueden separarse más en función del peso molecular, p. ej., a través de SDS-PAGE.

- 5 ensayos de unión inmunológica (o inmunoensayos) normalmente utilizan un "agente de captura" para unirse específicamente y a menudo inmovilizar el analito (polipéptido o subsecuencia). El agente de captura es un resto que se une específicamente al analito. En otra realización, el agente de captura es un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido. El anticuerpo (anti-péptido) puede producirse mediante cualquiera de varios medios bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 10 inmunoensayos también utilizan a menudo un agente de marcaje para unir y marcar específicamente el complejo de enlace formado por el agente de captura y el analito. El reactivo marcado puede ser él mismo una de las partes que comprenden el complejo agente de captura/analito. Por lo tanto, el agente de marcaje puede ser un polipéptido marcado o un anti-anticuerpo marcado. Alternativamente, el reactivo marcado puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo, que se une específicamente al complejo anticuerpo/polipéptido.
- 15 En una realización, el agente de marcaje es un segundo anticuerpo humano que lleva un marcador. Alternativamente, al segundo anticuerpo le puede faltar un marcador, pero puede, en su lugar, unirse mediante un tercer anticuerpo específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo puede modificarse con un resto detectable, p. ej., como biotina, a la que puede unirse específicamente una tercera molécula marcada, tal como estreptavidina marcada con enzima.
- 20 También pueden usarse como agente marcado otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de la inmunoglobulina, tales como la proteína A o la proteína G. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de las bacterias estreptocócicas. Presentan una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de la inmunoglobulina de diversas especies (véase, p. ej., Kronval et al., (1973) J. Immunol. 111: 1401-1406, y Akerstrom (1985) J. Immunol., 135: 2589-2542).
- Como se indicó anteriormente, los inmunoensayos para la detección y/o cuantificación de un polipéptido puede adoptar una amplia variedad de formatos bien conocidos por los expertos en la técnica.
- 25 inmunoensayos ejemplares para detectar un polipéptido pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de analito capturado se mide directamente. En un ensayo "sándwich", por ejemplo, el agente de captura (anticuerpos anti-péptido) puede unirse directamente a un sustrato sólido donde están inmovilizados. Estos anticuerpos inmovilizados capturan el polipéptido presente en la muestra de prueba. El polipéptido inmovilizado de este modo se une luego a un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo humano que lleva un marcador.
- 30 En ensayos competitivos, la cantidad de analito (polipéptido) presente en una muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de analito (polipéptido) añadido (exógeno) desplazado (o desplazado por competición) del agente de captura (anticuerpo anti-péptido) por el analito presente en la muestra. En un ensayo competitivo, se añade una cantidad conocida de, en este caso, un polipéptido a la muestra y luego la muestra se pone en contacto con un agente de captura. La cantidad de polipéptido unido al agente de captura es inversamente proporcional a la concentración de polipéptido presente en la muestra.
- 35 En otra realización, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de polipéptido unido al anticuerpo puede determinarse midiendo la cantidad de polipéptido presente en un complejo polipéptido/anticuerpo, o alternativamente midiendo la cantidad de polipéptido no complejado restante. La cantidad de polipéptido puede detectarse proporcionando un polipéptido marcado.
- 40 Los ensayos descritos en este documento se califican (como positivo o negativo o cantidad de polipéptido) según métodos estándar bien conocidos por los expertos en la materia. El método particular de puntuación dependerá del formato del ensayo y la elección del marcador. Por ejemplo, puede calificarse un ensayo de transferencia Western visualizando el producto coloreado producido por el marcador enzimático. Una banda o mancha de color claramente visible con el peso molecular correcto se califica como resultado positivo, mientras que la ausencia de una mancha o banda claramente visible se califica como negativa. La intensidad de la banda o mancha puede proporcionar una medida cuantitativa del polipéptido.
- 45 En otra realización, el nivel (actividad) se analiza midiendo la actividad enzimática del producto génico. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de ensayo de la actividad de una enzima.
- 50 Las técnicas in vivo para la detección de una proteína marcadora incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra la proteína. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de formación de imágenes estándar.
- 55 Ciertos marcadores identificados por los métodos de la invención pueden ser proteínas secretadas. Es una cuestión sencilla para el experto en la materia determinar si alguna proteína marcadora particular es una proteína secretada. Para hacer esta determinación, la proteína marcadora se expresa en, por ejemplo, una célula de mamífero, p. ej., una línea celular humana, se recoge líquido extracelular y se evalúa la presencia o ausencia de la proteína en el líquido extracelular (p. ej., usando un anticuerpo marcado que se une específicamente con la proteína).

Los anticuerpos pueden usarse como sondas para productos de traducción. Los términos "anticuerpo" y "sustancia de anticuerpo" como se usan indistintamente en este documento se refieren a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno, tal como un polipéptido de la invención. Una molécula que se une específicamente a un polipéptido dado es una molécula que se une al polipéptido, pero no se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, p. ej., una muestra biológica, que contiene naturalmente el polipéptido. Los ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F (ab) y F (ab')<sub>2</sub> que pueden generarse tratando el anticuerpo con una enzima tal como pepsina. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie de un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epitopo particular.

Puede usarse un anticuerpo dirigido contra un polipéptido para aislar el polipéptido mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, dicho anticuerpo puede usarse para detectar el marcador (p. ej., en un lisado celular o sobrenadante celular) para evaluar el nivel y el patrón de expresión del marcador. Los anticuerpos también pueden usarse de forma diagnóstica para controlar los niveles de proteínas en tejidos o fluidos corporales (p. ej., en un fluido corporal que contiene células tumorales) como parte de un procedimiento de prueba clínica, p. ej., para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a, varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye, pero no se limita a, luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de materiales <sup>125</sup>I <sup>131</sup>I <sup>35</sup>S <sup>3</sup> radioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a I, I, S o H.

#### *Sondas y métodos para la detección de productos de transcripción*

La expresión transcripcional puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen métodos de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

En ciertas realizaciones, la actividad de un gen particular se caracteriza por una medida de transcripción génica (p. ej., ARNm). La detección puede implicar la cuantificación del nivel de expresión génica (p. ej., ADNc, ARNm) o, como alternativa, puede ser una evaluación cualitativa del nivel de expresión génica, en particular en comparación con un nivel de control. El tipo de nivel que se detecta quedará claro en el contexto.

Los métodos de detección y/o cuantificación de transcripción del gen (ARNm o ADNc hecho a partir de la misma) usando técnicas de hibridación de ácido nucleico son conocidas por aquellos expertos en la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al. supra). Por ejemplo, un método para evaluar la presencia, ausencia o cantidad de ADNc implica una transferencia Southern como se describió anteriormente. Brevemente, el ARNm se aísla (p. ej., usando un método de extracción con ácido guanidinio-fenol-cloroformo, Sambrook et al. Supra.) y se transcribe de forma inversa para producir ADNc. El ADNc se digiere luego opcionalmente y se procesa en un gel en tampón y se transfiere a membranas. Luego se lleva a cabo la hibridación utilizando las sondas de ácido nucleico específicas para el ADNc objetivo.

Un principio general de tales ensayos de diagnóstico y pronóstico implica la preparación de una muestra o mezcla de reacción que puede contener un marcador y una sonda, en condiciones apropiadas y durante un tiempo suficiente para permitir que el marcador y la sonda interactúen y se unan, formando así un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden realizarse de varias maneras.

por ejemplo, un método para realizar dicho ensayo implicaría anclar el marcador o la sonda en un soporte de fase sólida, también denominado sustrato, y detectar el complejo marcador/sonda objetivo anclados en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho método, una muestra de un sujeto, que se analizará para determinar su presencia y/o concentración de marcador, puede anclarse en un soporte o soporte de fase sólida. En otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda puede anclarse a una fase sólida y puede permitirse que una muestra de un sujeto reaccione como un componente no anclado del ensayo.

Existen muchos métodos establecidos para anclar los componentes del ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas marcadoras o de sonda que se inmovilizan a través de la conjugación de biotina y estreptavidina. Tales componentes de ensayo biotinilados pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL) e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). En determinadas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados pueden prepararse con antelación y almacenar.

Otros portadores adecuados o soportes de fase sólida para tales ensayos incluyen cualquier material capaz de unirse a la clase de molécula a la que pertenece el marcador o sonda. Los soportes o vehículos conocidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales o modificadas, poliacrilamidas, agarosa y magnetita.

- 5 Para realizar ensayos con los enfoques mencionados anteriormente, el componente no inmovilizado se añade a la fase sólida sobre la que se ancla el segundo componente. Una vez que se completa la reacción, los componentes no complejados pueden eliminarse (p. ej., mediante lavado) bajo condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado en la fase sólida. La detección de complejos marcador/sonda anclados a la fase sólida pueden lograrse mediante varios métodos destacados en este documento.
- 10 En otra realización, la sonda, cuando es el componente de ensayo no anclado, puede marcarse con el propósito de detección y lectura del ensayo, directa o indirectamente, con marcadores detectables discutidas en este documento y que son bien conocidas por un experto en la técnica.

También es posible detectar directamente la formación del complejo marcador/sonda sin manipulación o marcado adicional de ninguno de los componentes (marcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (véase, por ejemplo, Lakowicz et al., patente de EE.UU. No. 5,631,169; Stavrianopoulos, et al., patente de EE.UU. No. 4,868,103). Se selecciona un marcador de fluoróforo en la primera molécula 'donante' de tal manera que, tras la excitación con luz incidente de longitud de onda apropiada, su energía fluorescente emitida será absorbida por un marcador fluorescente en una segunda molécula 'aceptora', que a su vez puede fluorescer debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína 'donante' puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen marcadores que emiten diferentes longitudes de onda de luz, tal que el marcador de la molécula 'aceptora' se pueda diferenciar de la del 'donante'. Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores está relacionada con la distancia que separa las moléculas, pueden evaluarse las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la que se produce la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcador de la molécula 'aceptora' en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión a FET puede medirse convenientemente a través de medios de detección fluorométricos estándar bien conocidos en la técnica (p. ej., usando un fluorímetro).

En otra realización, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un marcador puede lograrse sin marcar ninguno de los componentes del ensayo (sonda o marcador) utilizando una tecnología como el Análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, p. ej., Sjolander, S. y Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345 y Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). Como se usa en este documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin etiquetar ninguno de los interactuantes (p. ej., BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (que indican una instancia de unión) provocan modificaciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR)), provocando una señal detectable que puede usarse como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

Alternativamente, en otra realización, pueden realizarse ensayos de diagnóstico y pronóstico análogos con marcador y sonda como solutos en una fase líquida. En tal ensayo, el marcador y la sonda complejo se separan de los componentes no complejados mediante cualquiera de varias técnicas estándar, que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En centrifugación diferencial, los complejos marcador/sonda pueden separarse de los componentes de ensayo no complejados a través de una serie de etapas centrífugas, debido a los diferentes equilibrios de sedimentación de los complejos en función de sus diferentes tamaños y densidades (véase, p. ej., Rivas, G. y Minton, A.P., 1993, *Trends Biochem Sci.* 18(8):284-7). También pueden utilizarse técnicas cromatográficas estándar para separar moléculas complejadas de las no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa las moléculas en función del tamaño, y mediante la utilización de una resina de filtración en gel apropiada en un formato de columna, por ejemplo, el complejo relativamente más grande puede separarse de los componentes no complejados relativamente más pequeños. De manera similar, las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo marcador/sonda en comparación con los componentes no complejados pueden aprovecharse para diferenciar el complejo de los componentes no complejados, por ejemplo, mediante la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Tales resinas y técnicas cromatográficas son bien conocidas por un experto en la materia (véase, p. ej., Heegaard, NH, 1998, *J. Mol. Recognit.* Winter 11 (1-6): 141-8; Hage, DS y Tweed, SA *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Oct 10;699(1-2):499-525). La electroforesis en gel también puede emplearse para separar los componentes de ensayo complejados de los componentes no unidos (véase, p. ej., Ausubel et al., Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987-1999). En esta técnica, los complejos de proteínas o ácidos nucleicos se separan según el tamaño o la carga, por ejemplo. Para mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, son típicos los materiales de matriz de gel no desnaturizantes y las condiciones en ausencia de agente reductor. Las condiciones apropiadas para el ensayo particular y los componentes del mismo serán bien conocidos por un experto en la técnica.

En una realización particular, el nivel de ARNm correspondiente al marcador puede determinarse tanto mediante formatos *in situ* como *in vitro* en una muestra biológica usando métodos conocidos en la técnica. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células, fluidos biológicos y aislados de los mismos, aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Muchos métodos de detección de expresión usan ARN aislado.

Para los métodos in vitro, puede utilizarse cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se seleccione en contra del aislamiento de ARNm para la purificación de ARN a partir de células tumorales (véase, por ej., Ausubel et ál., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York 1987-1999). Además, pueden procesarse fácilmente un gran número de muestras de tejido utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de una sola etapa de Chomczynski (1989, U.S. Patent No. 4.843.155).

El ácido nucleico aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y sondas de matriz. Un método de diagnóstico para la detección de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones estrictas para un ARNm o ADN genómico que codifica un marcador de la presente invención. En este documento se describen otras sondas adecuadas para usar en los ensayos de diagnóstico de la invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión se está expresando.

En un formato, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo, ejecutando el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como la nitrocelulosa. En un formato alternativo, la(s) sonda(s) se inmoviliza, por ejemplo, en un array de chips de genes Affymetrix. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para usar en la detección del nivel de ARNm codificado por los marcadores de la presente invención.

Las sondas pueden ser de longitud completa o menos que la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. Las sondas más cortas se prueban empíricamente para determinar su especificidad. Las sondas de ácido nucleico ejemplares tienen 20 bases o más de longitud (véase, p. ej., Sambrook et al. para métodos de selección de secuencias de sonda de ácido nucleico para usar en la hibridación de ácidos nucleicos). La visualización de las porciones hibridadas permite la determinación cualitativa de la presencia o ausencia de ADNc.

Un método alternativo para determinar el nivel de una transcripción implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, p. ej., por PCRt (la realización experimental establecida en Mullis, 1987, Patente de EE.UU. No. 4,683,202), reacción en cadena de ligasa (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), replicasa Q-Beta (Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197), replicación en círculo rodante (Lizardi et al., U.S. Patent No. 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas porque aquellos expertos en la técnica. La PCRt fluorogénica también puede usarse en los métodos de la invención. En la PCRt fluorogénica, la cuantificación se basa en la cantidad de señales de fluorescencia, p. ej., TaqMan y Sybr green. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en este documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden hibridarse en regiones 5' o 3' de un gen (hebras más y menos, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta en el medio. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos in situ, no es necesario aislar el ARNm de las células antes de la detección. En tales métodos, una muestra de células o tejidos se prepara/procesa utilizando métodos histológicos conocidos. Luego, la muestra se inmoviliza en un soporte, típicamente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridar con el ARNm que codifica el marcador.

Como alternativa a hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluto del marcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, p. ej., un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de actina o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, p. ej., una muestra de sujeto, con otra muestra, p. ej., un sujeto sano, o entre muestras de diferentes fuentes.

Alternativamente, el nivel de expresión puede proporcionarse como un nivel de expresión relativo. Para determinar un nivel de expresión relativo de un marcador, el nivel de expresión del marcador se determina para 10 o más muestras de aislados normales frente a LMP, o incluso 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión medio de cada uno de los genes analizados en el mayor número de muestras y se utiliza como nivel de expresión de referencia para el marcador. El nivel de expresión del marcador determinado para la muestra de prueba (nivel absoluto de expresión) se divide luego por el valor de expresión medio obtenido para ese marcador. Esto proporciona un nivel de expresión relativo.

En determinadas realizaciones, las muestras utilizadas en la determinación de la línea de base serán de muestras derivadas de un sujeto que tiene LMP frente a muestras de un sujeto sano del mismo tipo de tejido. La elección de la fuente de la celda depende del uso del nivel de expresión relativo. El uso de la expresión encontrada en tejidos normales como una puntuación de expresión media ayuda a validar si el marcador ensayado es específico del tejido del que se derivó la célula (frente a células normales). Además, a medida que se acumulan más datos, puede revisarse el valor medio de expresión, proporcionando valores de expresión relativos mejorados basados en datos acumulados. Los datos de expresión de las células normales proporcionan un medio para calificar el riesgo de LMP.

En otra realización, la expresión de un marcador se evalúa preparando ARNm/ADNc (es decir, un polinucleótido transcrito) de células en una muestra de sujeto, y al hibridar el ADN genómico o ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia que es un complemento de un polinucleótido que comprende el marcador, y fragmentos del mismo. El ADNc puede, opcionalmente, amplificarse usando cualquiera de una variedad de métodos de reacción en cadena de la polimerasa antes de la hibridación con el polinucleótido de referencia. La expresión de uno o más marcadores también puede detectarse usando PCR cuantitativa (QPCR) para evaluar el nivel de expresión de los marcadores. Alternativamente, cualquiera de los muchos métodos conocidos para detectar mutaciones o variantes (p. ej., polimorfismos de un solo nucleótido, deleciones, etc.) de un marcador de la invención puede usarse para detectar la aparición de un marcador mutado en un sujeto.

En una realización relacionada, una mezcla de polinucleótidos transcritos obtenida de la muestra se pone en contacto con un sustrato que tiene fijado al mismo un polinucleótido complementario u homólogo con al menos una porción (p. ej., al menos 7, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 500, o más residuos de nucleótidos) de un marcador de la invención. Si los polinucleótidos complementarios u homólogos con un marcador de la invención son detectables diferencialmente en el sustrato (p. ej., detectables usando diferentes cromóforos o fluoróforos, o fijados a diferentes posiciones seleccionadas), entonces los niveles de expresión de una pluralidad de marcadores pueden evaluarse simultáneamente usando un solo sustrato (p. ej., un microarray de "chip genético" de polinucleótidos fijados en posiciones seleccionadas). Cuando se usa un método para evaluar la expresión del marcador que implica la hibridación de un ácido nucleico con otro, la hibridación puede realizarse bajo condiciones de hibridación rigurosas.

En otra realización, se utiliza una combinación de métodos para evaluar la expresión de un marcador.

Debido a que las composiciones, kits y métodos de la invención se basan en la detección de una diferencia en los niveles de expresión de uno o más marcadores de la invención, en ciertas realizaciones, el nivel de expresión del marcador es significativamente mayor que el límite mínimo de detección del método se usa para evaluar la expresión en al menos una de una muestra biológica de un sujeto con LMP, en riesgo de LMP o un control saludable.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc, ARNm o ADN genómico como molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados según técnicas de amplificación por PCR estándar. Las moléculas de ácido nucleico así amplificadas pueden clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a la totalidad o una parte de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden prepararse mediante técnicas sintéticas estándar, p. ej., usando un sintetizador de ADN automatizado.

Las sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención pueden usarse para detectar transcripciones (p. ej., ARNm) o secuencias genómicas correspondientes a uno o más marcadores de la invención. La sonda comprende un grupo marcador unido a ella, p. ej., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Tales sondas pueden usarse como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan incorrectamente la proteína, midiendo los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un sujeto, p. ej., detectando ARNm niveles o determinando si un gen que codifica la proteína ha sido mutado o eliminado.

Los métodos descritos en este documento también pueden incluir moléculas de ácido nucleico de baliza molecular que tienen al menos una región que es complementaria a una molécula de ácido nucleico de la invención, de modo que la baliza molecular es útil para cuantificar la presencia de la molécula de ácido nucleico de la invención en una muestra. Un ácido nucleico de "baliza molecular" es una molécula de ácido nucleico que comprende un par de regiones complementarias y que tiene un fluoróforo y un quencher fluorescente asociado con el mismo. El fluoróforo y el quencher están asociados con diferentes porciones del ácido nucleico en una orientación tal que cuando las regiones complementarias se hibridan entre sí, el quencher apaga la fluorescencia del fluoróforo. Cuando las regiones complementarias de las moléculas de ácido nucleico no se hibridan entre sí, la fluorescencia del fluoróforo se apaga en menor grado. Las moléculas de ácido nucleico de baliza molecular se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de EE.UU. 5,876,930.

"Bajo condiciones eficaces para permitir la formación compleja" generalmente significa condiciones en las que los reactivos se han diluido para reducir el ruido y proporcionar lecturas de resultados que se encuentran dentro de un intervalo específico. Los diluyentes pueden incluir, en ejemplos no limitantes, soluciones que incluyen BSA, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o PBS que contiene Tween.

Las condiciones "adecuadas" también incluyen condiciones que se encuentran a una temperatura y/o por un período de tiempo suficiente para permitir una 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 realizarse durante la noche a aproximadamente 4 °C. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que pueden ser adecuadas otras condiciones.

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

Una muestra de referencia puede ser del mismo material biológico (p. ej., sangre, plasma, suero, orina o LCR) aislado de un individuo. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo es LMP positivo. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo es LMP negativo. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo no se trata con una terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo es VJC negativo. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo es VJC positivo. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo no se trata con terapia inmunosupresora previa. En algunas realizaciones, se conoce que el individuo ha sido tratado con terapia inmunosupresora previa.

En una realización, el ensayo se realiza en un consultorio médico, tal como un proveedor de atención médica, p.ej., un médico, una enfermera o un técnico, que trabaja en una instalación donde la muestra biológica se obtiene de un paciente. En otra realización, la muestra biológica obtenida de un paciente se transporta a otra instalación, p. ej., a una instalación externa, donde se realiza el ensayo. En este último caso, los resultados del ensayo pueden informarse al proveedor de atención médica, tal como a través de un formulario, que puede enviarse por correo o electrónicamente (p. ej., por fax o correo electrónico) o a través de una base de datos en línea. En una realización, los resultados del ensayo (incluyendo el ensayo de detección y, opcionalmente, un ensayo confirmatorio) pueden almacenarse en una base de datos y un proveedor de atención médica puede acceder a ellos, como a través de la web mundial.

#### *Métodos de evaluación de muestras y/o sujetos*

Como se usa en este documento, los métodos para evaluar o analizar un sujeto o una muestra biológica de un sujeto incluyen uno o más de realizar el análisis de la muestra, solicitar el análisis de la muestra, solicitar resultados del análisis de la muestra, o recibir los resultados del análisis de la muestra. (Generalmente en este documento, determinación (o que determina), análisis o evaluación (o que evalúa) puede incluir uno o ambos de realizar el método subyacente o recibir datos de otra persona que haya realizado el método subyacente).

El análisis o evaluación requiere una transformación de material, p. ej., material biológico o componentes de ensayo. Por ejemplo, una muestra biológica (p. ej., sangre completa, suero o plasma) puede evaluarse para detectar la presencia de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). La evaluación puede realizarse antes o después o al mismo tiempo que el paciente está recibiendo tratamiento, tal como para la 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. En una realización, la muestra incluye una fracción no celular (p. ej., plasma, suero u otro fluido corporal no celular). En una realización, la muestra es una muestra de suero. En otras realizaciones, la muestra biológica obtenida de un paciente comprende sangre (p. ej., sangre completa). En ciertas realizaciones, la sangre puede procesarse adicionalmente para obtener plasma o suero.

La presencia de uno o más marcadores de células B puede determinarse por contacto con un agente de unión específico, p. ej., un agente de unión a marcadores de células B (p. ej., un agente de unión descrito en este documento, p. ej., mediante un método descrito en este documento).

En una realización, la muestra se analiza para determinar el nivel de ácido nucleico marcador de células B presente en la muestra, p. ej., mediante un método descrito en este documento. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse de la muestra y usarse para la amplificación por PCR o una técnica de secuenciación de próxima generación (Nex-Gen). En una realización, un lisado crudo de la muestra biológica se somete a un método de amplificación, tal como PCR, y el producto amplificado se analiza mediante una o más de electroforesis, mapeo de fragmentos de restricción, hibridación o secuenciación para identificar si el ADN o ARN marcador de células B está presente en la muestra y cuánto hay en la muestra.

La muestra biológica puede extraerse del paciente y analizarse.

En algunas realizaciones, la muestra del paciente, p. ej., una muestra de suero o plasma o sangre completa o LCR, puede almacenarse antes de analizar la presencia de uno o más marcadores de células B, p. ej., para proteínas o ácido nucleico marcadoras de células B. La muestra del paciente, p. ej., la muestra del paciente que contiene proteína o ácido nucleico marcadora de células B, puede almacenarse 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., de una a tres semanas o de una a dos semanas o más (p. ej., hasta una semana, hasta dos semanas, hasta tres semanas, hasta seis semanas o más); o de uno a seis meses, p. ej., de uno a tres meses o de uno a dos meses o más (p. ej., hasta un mes, hasta dos meses, hasta tres meses, hasta seis meses o más). La muestra puede

almacenarse, p. ej., congelada (p. ej., a -80 °C a -20 °C), a 2-8 °C, a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) o más caliente, p. ej., a 37 °C.

Como se usa en este documento, el término "adquirir" o "que adquiere" se refiere a obtener la posesión de una entidad física, o un valor, p. ej., un valor numérico, mediante "adquirir directamente" o "adquirir indirectamente" la entidad física o valor, p. ej., el estado de un paciente, tal como la exposición previa a la terapia anti-VLA-4 u otros inmunosupresores, el estado de JVC o el estado de expresión del marcador de células B. "Adquirir directamente" significa realizar un proceso (p. ej., realizar un método sintético o analítico) para obtener la entidad física o el valor. "Adquirir indirectamente" se refiere a recibir la entidad o valor físico de otra parte o fuente (p. ej., un laboratorio externo que adquirió directamente la entidad o el valor físico). Adquirir directamente una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, p. ej., un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cizallar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, realizar una reacción química que incluye romper o formar un covalente o no enlace covalente. Adquirir directamente un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (a veces referido en este documento como "análisis físico"), realizar un método analítico, p. ej., un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, p. ej., un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinando un analito, o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, p. ej., un tampón, disolvente o reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, 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 del mismo, 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 determinar el estado de un paciente (p. ej., estado del marcador de células B), o un nivel de actividad, y determinar si el estado tiene una relación preseleccionada con un estándar de referencia, incluye uno o más de analizar una muestra, solicitar el análisis de la muestra, solicitar resultados del análisis de la muestra o recibir los resultados del análisis de la muestra. (Generalmente, el análisis puede incluir uno o ambos de realizar el método subyacente (p. ej., un inmunoensayo) o recibir datos de otro que haya realizado el método subyacente).

VLA-4 se expresa en varios leucocitos, incluyendo determinadas poblaciones de células B y sus precursores. VLA-4 desempeña un papel en la adhesión de las células B progenitoras a las células del estroma de la médula ósea y es importante para la maduración de las células B progenitoras en células precursoras (Ryan DH et al. J Clin Invest 88(3):995 1991. También se ha demostrado que VLA-4 es importante para la activación de las células B de la memoria humana (Silvy et al. Eur J Immunol 27(11):2757 1997). En algunas realizaciones, el nivel de expresión de VLA-4, p. ej., proteína VLA-4 y/o el nivel de ácido nucleico, se determina en una muestra. En una realización, se determina un nivel de expresión de VLA-4 en un subconjunto específico de células B presentes en una muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se determina un nivel de expresión de VLA-4 en combinación con un nivel de expresión de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento.

#### *Terapia anti-VLA-4*

Una terapia anti-VLA-4 es una molécula, p. ej., un compuesto de molécula pequeña o un biológico proteico (p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como un fragmento de unión a antígeno del mismo) 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 VLA-4 de la unión a un ligando y/o receptor. Una terapia anti-VLA-4 puede ser un anticuerpo (p. ej., natalizumab (TYSABRI®)) o un fragmento del mismo, o una forma soluble de un ligando. Las formas solubles de las proteínas del ligando para las integrinas  $\alpha 4$  incluyen VCAM-I solubles o péptidos de fibronectina, proteínas de fusión VCAM-I o proteínas de fusión VCAM-I/Ig bifuncionales. Por ejemplo, puede administrarse una forma soluble de un ligando de VLA-4 o un fragmento del mismo para unirse a VLA-4 y, en algunos casos, competir por un sitio de unión de VLA-4 en las células, lo que conduce a efectos similares a la administración de antagonistas como los anticuerpos anti-VLA-4. Por ejemplo, los mutantes solubles de integrina VLA-4 que se unen al ligando de VLA-4 pero no provocan señalización dependiente de integrina son adecuados para usar en los métodos descritos. Tales mutantes pueden actuar como inhibidores competitivos de la proteína integrina de tipo salvaje y se consideran "antagonistas". Otros antagonistas adecuados son las "moléculas pequeñas".

Las "moléculas pequeñas" son agentes que imitan la acción de los péptidos para interrumpir las interacciones VLA-4/ligando, p. ej., uniendo VLA-4 y bloqueando la interacción con un ligando de VLA-4 (p. ej., VCAM-I o fibronectina), o uniendo 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 se une al dominio de unión a ligando de VLA-4. (Véase, Devlin et al., Science 249: 400-406 (1990); Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990); y el documento de Patente de EE.UU. No. 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. Aunque el peso molecular de las moléculas

pequeñas es generalmente inferior a 2000 Dalton, esta cifra no pretende ser un límite superior absoluto del peso molecular.

*Terapia combinada o alternativas a la terapia anti-VLA-4*

5 En algunas realizaciones, la terapia anti-VLA-4, p. ej., natalizumab, se administra con un segundo agente, o puede administrarse una terapia alternativa en lugar de la terapia anti-VLA-4, tal como cuando se determina que un paciente está en riesgo más alto de LMP.

10 Los ejemplos no limitantes de segundos agentes para tratar la esclerosis múltiple en combinación con la terapia anti-VLA-4, o agentes alternativos para usar en lugar de la terapia anti-VLA-4, incluyen: sales de ácido fumárico, tales como dimetilfumurato (p. ej., Tecfidera®) o monometilfumurato; antagonistas de esfingosina 1-fosfato (S1P), tales como el anticuerpo bloqueador de S1B Sphingomab; interferones, tales como interferón humano beta-1a (p. ej., AVONEX® o Rebif®) e interferón  $\beta$ -1b (interferón  $\beta$  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 del mismo (tal como un fragmento de unión al antígeno del mismo), tal como un anticuerpo anti-CD20, p. ej., Rituxan® (rituximab), o un anticuerpo o fragmento del mismo que compite o se une a un epítipo superpuesto con rituximab; mixtoxantrona (NOVANTRONE®, Lederle); un agente quimioterapéutico, tal como clabribina (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.

20 El acetato de glatiramer es una proteína formada a partir de una cadena aleatoria de aminoácidos (ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina (de ahí GLATiramer)). Glatiramer acetato puede sintetizarse en solución a partir de estos aminoácidos en una relación aproximadamente de 5 partes de alanina a 3 partes de lisina, 1,5 partes de ácido glutámico y 1 parte de tirosina usando anhídridos de ácido caboxiamino.

25 Los segundos agentes adicionales, o agentes para usar 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-CSF, FGF, y PDGF. Todavía otros segundos agentes ejemplares incluyen anticuerpos contra moléculas de la 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.

30 Aún otros anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos que proporcionan una actividad de un agente descrito en este documento, tal como un anticuerpo que se acopla a un receptor de interferón, p. ej., un receptor beta de interferón. Normalmente, en implementaciones en las que el segundo agente incluye un anticuerpo, se une a una proteína objetivo que no sea VLA-4 o que no sea una integrina  $\alpha$ 4, o al menos un epítipo en VLA-4 que no sea uno reconocido por natalizumab.

35 Aún otros segundos agentes ejemplares adicionales incluyen: FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), 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 este documento, inhibidores de la enzima convertidora IL-1 $\beta$  (p. ej., Vx740), anti-P7s, PSGL, inhibidores TACE, inhibidores de señalización de linfocitos T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de la metaloproteínasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensinas, receptores de citocinas solubles y sus derivados, como se describe en este documento y citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).

45 En algunas realizaciones, puede usarse un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos secundarios de la EM. Tales agentes incluyen, p. ej., amantadina, baclofeno, papaverina, meclizina, hidroxicina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantroleno, desmopresina, dexametasona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, bisacodilo, venlafaxina, amitriptilina, metenamina, clonazepam, isoniazida, verdenafil, nitrofurantoína, mucilloide hidrófilo de psyllium, alprostadil, gabapentina, nortriptilina, paroxetina, bromuro de propranolol, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropina y sertral. Muchos segundos agentes que son moléculas pequeñas tienen un peso molecular entre 150 y 5000 Daltons.

50 Ejemplos de antagonistas de TNF incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados in vitro (o fragmentos de unión a antígeno del mismo) a TNF (p. ej., TNF  $\alpha$  humano), tal como D2E7 (anticuerpo TNF $\alpha$  humano, documento de Patente de EE.UU. No. 6,258,562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticuerpo anti-TNF $\alpha$  quimérico; REMICADE™, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (p. ej., CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, p. ej., receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados de los mismos, p. ej., TNFR-IgG 75kD (proteína de fusión del receptor-IgG de TNF 75 kD, ENBREL™; Immunex; véase, p. ej., Arthritis & Rheumatism 37:S295, 1994; J. Invest. Medicina. 44:235A, 1996), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG proteína de fusión (LENERCEPT™)); antagonistas enzimáticos, p. ej., inhibidores de la enzima convertidora de TNF $\alpha$  (TACE) (p. ej., un derivado del ácido alfa-sulfonil hidroxámico,

documento WO 01/55112, e inhibidor de TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005 o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína de unión a TNF soluble; véase, p. ej., *Arthritis & Reumatismo* 39:S284, 1996; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* 268:37-42, 1995)

5 En una implementación, la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se proporcionan como una co-formulación, y la co-formulación se administra al sujeto. Además, es posible, p. ej., al menos 24 horas antes o después de administrar la co-formulación, administrar por separado una dosis de la formulación de terapia anti-VLA-4 y luego 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 administración incluye administrar secuencialmente la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente. Las administraciones secuenciales pueden proporcionarse el mismo día (p. ej., dentro de una hora una de la otra o al menos con 3, 6 o 12 horas de diferencia) o en días diferentes.

10 La terapia anti-VLA-4 y el segundo agente pueden administrarse como una pluralidad de dosis por separado en el tiempo. Normalmente, la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se administran cada uno según un régimen. El régimen para uno o ambos puede tener una periodicidad regular. El régimen para la terapia anti-VLA-4 puede tener una periodicidad diferente del régimen para el segundo agente, p. ej., uno puede administrarse con más frecuencia que el otro. En una implementación, una de la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se administran una vez a la semana y el otro una vez al mes. En otra implementación, una de la terapia anti-VLA-4 y el segundo agente se administran continuamente, p. ej., durante 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 pueden administrarse por cualquier método apropiado, p. ej., por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.

15 En algunas realizaciones, cada una de las terapias anti-VLA-4 y el segundo agente se administran a la misma dosis que cada uno se prescribe para la monoterapia. En otras realizaciones, la terapia anti-VLA-4 se administra en una dosis que es igual o menor que la cantidad requerida para la eficacia si se administra sola. Del mismo modo, el segundo agente puede administrarse a una dosis que sea igual o menor que la cantidad requerida para la eficacia si se administra solo.

#### 25 *Kits*

Los reactivos para realizar un ensayo de marcador de células B pueden proporcionarse en forma de un kit. A excepción de la muestra del paciente, algunos o todos los materiales necesarios para el ensayo pueden proporcionarse en el kit. Un kit es cualquier fabricación (p. ej., un paquete o recipiente) que comprende al menos un reactivo, p. ej., una sonda, p. ej., una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo, para detectar específicamente un producto de traducción o transcripción descrito aquí.

30 En este documento se describen kits que tienen sondas para detectar la presencia de un polipéptido o ácido nucleico en una muestra biológica, p. ej., una muestra que contiene tejido, sangre completa, suero, plasma, raspado bucal, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, y médula ósea. Por ejemplo, el kit puede comprender un compuesto marcado o un agente capaz de detectar un polipéptido o un ARNm que codifica un polipéptido en una muestra biológica y un medio para determinar la cantidad del polipéptido o ARNm en la muestra (p. ej., un anticuerpo que se une al polipéptido o una sonda de oligonucleótidos que se une al ADN o ARNm que codifica el polipéptido). Los kits también pueden incluir instrucciones para interpretar los resultados obtenidos usando el kit.

Un kit puede incluir una pluralidad de sondas para detectar una pluralidad de productos de traducción o transcripción. Si se van a analizar una pluralidad de productos de expresión, el kit puede comprender una sonda para cada uno.

40 El kit puede comprender una o más sondas capaces de identificar uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). Las sondas adecuadas para un polipéptido incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares. Las sondas adecuadas para un producto de transcripción incluyen un ácido nucleico que incluye ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, un kit puede incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas de baliza molecular, y similares.

50 Los kits descritos en este documento pueden comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos de la invención. A modo de ejemplo, el kit puede comprender fluidos (p. ej., tampón SSC) adecuados para recoger ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína con la que se une específicamente, uno o más compartimentos de muestra, un material de instrucción que describe el rendimiento de un método de la invención, una muestra de referencia para comparar los niveles de expresión de los biomarcadores descritos en este documento, y similares.

Un kit puede incluir un dispositivo descrito en este documento.

55 Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (p. ej., unido a un soporte sólido) que se une a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención; y, opcionalmente, (2)

un segundo anticuerpo diferente que se une al polipéptido o al primer anticuerpo y se conjuga con un marcador detectable.

Para los kits basados en oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, p. ej., un oligonucleótido marcado de forma detectable, que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico correspondiente a un marcador de la invención. El kit también puede comprender, p. ej., un agente tamponador, un conservante o un agente estabilizante de proteínas. El kit puede comprender además componentes necesarios para detectar el marcador detectable (p. ej., una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden analizarse y compararse con la muestra de prueba. Cada componente del kit puede incluirse dentro de un recipiente individual y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de un solo paquete, junto con las instrucciones para interpretar los resultados de las pruebas realizadas con el kit.

Un kit puede incluir, por ejemplo, un sustrato, tal como una placa con pocillos recubiertos con un agente capaz de unirse a uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch 1, Jag1 y C3b). La placa puede ser, por ejemplo, una placa de 6 pocillos, una placa de 12 pocillos, una placa de 24 pocillos, una placa de 48 pocillos, una placa de 96 pocillos o una placa de 384 pocillos. Las placas proporcionadas en un kit pueden recubrirse previamente con un agente capaz de unirse a uno o más marcadores de células B. En un caso, el kit incluye materiales y reactivos para usar con sistemas de alto rendimiento, tales como puntas SPR (Receptáculo de fase sólida) para usar con sistemas bioMerieux. El kit también puede incluir una proteína o ácido nucleico correspondiente a uno o más marcadores de células B, un sustrato capaz de unirse a uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento (p. ej., uno o más de IGHM, CD22, CD72, FCRLA, FCRL3, IGHD, IGKC, CCL21, CXCL12, BCMA, IgM, IgG, FCGR2A/B, SIGLEC-3, SIGLEC-9, IGFBP7, Notch1, Jag1 y C3b). En un caso, el kit contiene un control positivo de marcadores de células B. En un caso, el kit contiene un control negativo de marcadores de células B. Las soluciones que contienen proteínas, ácidos nucleicos, y muestras, p. ej., suero, pueden incluir un conservante, tal como azida sódica, p. ej., 0,05%, 0,1%, 1,5%, y 2% de azida sódica. En un caso, un kit descrito puede incluir uno o más reactivos para detectar un complejo que contiene marcadores de células B unidos a un agente de detección. Los reactivos para detectar el complejo incluyen, por ejemplo, un reactivo detectable, tal como TMB (tetrametilbencidina), un tampón de lavado y un reactivo de parada.

#### *Informe de resultados*

Los resultados del análisis de evaluación de riesgos pueden informarse, tales como a un centro de tratamiento, a un proveedor de atención médica, o a un proveedor de seguros. En una realización, los resultados de la evaluación de riesgos se almacenan en una base de datos.

En una realización, se proporciona material informativo para realizar e interpretar la evaluación de riesgos. El material informativo puede proporcionar orientación sobre dónde informar los resultados de la evaluación, como a un centro de tratamiento o proveedor de atención médica o proveedor de base de datos. El material informativo puede proporcionarse en un kit o un paquete, y puede incluir formularios para informar los resultados de la evaluación, incluyendo el nivel de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento, y dirección e información de contacto sobre dónde 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 aplicación en línea (p. ej., una "aplicación"). En otra realización, el material informativo puede incluir orientación sobre si un paciente debe recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, dependiendo del riesgo del paciente de LMP según los resultados de la evaluación del riesgo.

El kit o paquete también puede incluir instrucciones y artículos para la recolección o transporte de una muestra de un paciente a un proveedor de atención médica, o para recibir una muestra de un proveedor de atención médica, o para realizar los métodos de evaluación descritos en este documento. Por ejemplo, además de la información instructiva, un kit o paquete descrito puede incluir uno o más de un hisopo o raspador, o un vaso (p. ej., una taza, un tubo de ensayo, una ampolla o una bolsa) para recolectar, almacenar y transportar una muestra biológica. El kit o paquete también puede contener suministros para realizar un inmunoensayo o un ensayo de secuenciación para la detección de proteínas marcadoras de células B o ácidos nucleicos, respectivamente.

Un kit puede incluir uno o más recipientes para los reactivos requeridos para un ensayo, p. ej., un ensayo de detección de marcador de células B. Los reactivos pueden proporcionarse en una concentración adecuada para usar en el ensayo o con instrucciones de dilución para usar en el ensayo. En algunos casos, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para los componentes del ensayo y el material informativo. Por ejemplo, los componentes del ensayo pueden estar contenidos en una botella o vial, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otros casos, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un recipiente único, no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en un bote o vial jeringa que está unido al material informativo en forma de una etiqueta. En algunos casos, el kit incluye una pluralidad (p. ej., un paquete) de recipientes individuales, cada uno contiene una o más formas unitarias (p. ej., para usar con un ensayo) de un

componente de ensayo. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de ampollas, paquetes de aluminio o paquetes de blister, conteniendo cada uno una unidad única de un reactivo para usar en un ensayo de cribado o confirmatorio. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos y/o impermeable. El recipiente puede etiquetarse para usar.

5 El material informativo de un kit o paquete no se limita en su forma. En muchos casos, el material informativo, p. ej., instrucciones, se proporciona en forma impresa, p. ej., un texto impreso, una figura, y/o una fotografía, p. ej., una etiqueta o lámina impresa. Sin embargo, el material informativo también puede estar proporcionado en otros formatos, tales como material legible por ordenador, grabación de video o grabación de audio. En otro caso, el material informativo del kit es información de contacto, p. ej., una dirección física, dirección de correo electrónico, sitio web o número de teléfono, donde un usuario del kit o paquete puede obtener información sustantiva sobre cómo encontrar la información requerida para el análisis de evaluación de riesgos, p. ej., dónde y cómo identificar tratamientos previos administrados a un sujeto, y cómo realizar un ensayo para determinar el estado del marcador de células B de un paciente. Claramente, el material informativo también puede proporcionarse en cualquier combinación de formatos.

15 En algunas realizaciones, se proporciona una muestra biológica a un proveedor de análisis, p. ej., un proveedor de servicios (tal como una instalación externa) o un proveedor de atención médica, que evalúa la muestra en un análisis y proporciona una lectura. Por ejemplo, en una realización, un proveedor de ensayos recibe una muestra biológica de un sujeto, tal como una muestra de plasma, sangre o suero, y evalúa la muestra usando un ensayo descrito en este documento, y determina que la muestra contiene uno o más marcadores de células B proteínas o ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el proveedor del ensayo, p. ej., un proveedor de servicios o un proveedor de atención médica, puede determinar además, p. ej., contactando a un proveedor de atención médica 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 tratamiento previamente con un inmunomodulador. El proveedor del ensayo puede determinar además que el sujeto no es candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab, o que el sujeto es candidato para recibir tratamiento con un inmunomodulador, o que el sujeto puede ser un candidato que debería tener un control mejorado en comparación con un sujeto que se determina que tiene un estado de marcador de células B positivo (p. ej., que da positivo en un nivel predeterminado de proteína y/o ácido nucleico de uno o más marcadores de células B, p. ej., uno o más marcadores de células B descritos en este documento). Por ejemplo, un candidato que se determina que es positivo para el marcador de células B puede seleccionarse como candidato para recibir la terapia anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un candidato que ha recibido tratamiento previo con una terapia anti-VLA-4, p. ej., durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o más meses, y que se determina que es un marcador de células B positivo puede seleccionarse como candidato para recibir más anti-VLA-4 terapia. En algunas realizaciones, un candidato que ha recibido terapia previa con un inmunosupresor, y que se determina que es un marcador de células B positivo puede seleccionarse como candidato para recibir terapia adicional anti-VLA-4. En algunas realizaciones, un candidato que se determina que es positivo para VJC, pero que se determina que es positivo para el marcador de células B, puede seleccionarse como candidato para recibir terapia anti-VLA-4 adicional. En algunas realizaciones, un sujeto puede seleccionarse como candidato para recibir más terapia anti-VLA-4, pero con una recomendación para controlar al paciente con mayor frecuencia para el desarrollo de síntomas adversos, tales como síntomas que pueden indicar el desarrollo de LMP.

40 En una realización, el proveedor del ensayo realiza una evaluación del riesgo de LMP como se describe en este documento y determina que el sujeto es candidato para recibir tratamiento con una terapia anti-VLA-4, tal como natalizumab. En una realización, el proveedor del ensayo informa a un proveedor de atención médica que el sujeto es candidato para el 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 tiene un riesgo más bajo de LMP y, posteriormente, informar al proveedor de atención médica sobre la determinación del riesgo más bajo y que el sujeto es candidato para el tratamiento con la terapia anti-VLA-4.

45 En otro ejemplo, el proveedor del análisis determina que un paciente tiene un riesgo más alto de LMP y posteriormente informa a un proveedor de atención médica sobre la determinación del riesgo más alto y recomienda que el paciente sea candidato para el tratamiento con el terapia anti-VLA-4, pero que el paciente debe someterse a un aumento de las pruebas de LMP y, opcionalmente, del estado de los marcadores de células B. En una realización, el proveedor del ensayo informa al proveedor de atención médica que el paciente tiene un riesgo más alto de LMP y, por lo tanto, el paciente debe recibir una alternativa a la terapia anti-VLA-4, o el paciente es un candidato para recibir la terapia anti-VLA-4 con un aumento de las pruebas de LMP y, opcionalmente, el estado de los marcadores de células B.

55 El proveedor del ensayo puede proporcionar los resultados de la evaluación de riesgos y, opcionalmente, las conclusiones con respecto a uno o más de las opciones de diagnóstico, pronóstico o terapia adecuada a, por ejemplo, un proveedor de atención médica, un paciente o una compañía de seguros, en cualquier formato adecuado, tal como por mail o electrónicamente, o mediante una base de datos en línea. La información recopilada y proporcionada por el proveedor del ensayo puede almacenarse en una base de datos.

En una realización, un proveedor de atención médica o proveedor de seguros u otra entidad recomienda, p. ej., al paciente o a un segundo proveedor de atención médica, que un paciente se someta a una evaluación de riesgo de LMP como se describe en este documento.

Las herramientas de estratificación del riesgo de LMP son útiles como un componente en la toma de decisiones de tratamiento de beneficio-riesgo individuales para los pacientes que toman o están considerando tomar un inhibidor de VLA4 u otros tratamientos que se conoce que aumentan el riesgo de desarrollar LMP. La cuantificación del riesgo de LMP de un paciente puede usarse, p. ej., en el análisis de riesgo-beneficio.

- 5 Los encabezados, p. ej., (A), (B), (i), etc., se presentan simplemente para facilitar la lectura de la especificación 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 que se presentan.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes adicionales.

## 10 Ejemplos

### **Ejemplo 1. La señal específica de células B en sangre completa y suero de pacientes con LMP tratados con natalizumab se revela usando transcripción y perfil de proteínas**

Tysabri es una terapia altamente eficaz para pacientes con esclerosis múltiple recurrente (EM), sin embargo, el tratamiento con natalizumab se asocia con un riesgo más alto de LMP. Por lo tanto, es necesario comprender el riesgo relativo de LMP para tomar decisiones informadas sobre la evaluación de riesgo-beneficio y el tratamiento. La presencia de anticuerpos anti-VJC en suero, el uso de inmunosupresores antes del tratamiento con natalizumab y la duración del tratamiento con natalizumab son factores de riesgo conocidos para el desarrollo de LMP. Los factores de riesgo adicionales pueden mejorar aún más el algoritmo de estratificación de riesgo. El riesgo de LMP puede estar asociado con cambios intrínsecos o inducidos en la respuesta inmune celular o/y humoral. En el presente ejemplo, con el fin de identificar nuevos biomarcadores sanguíneos de riesgo de LMP, comparamos perfiles de expresión génica global de sangre completa y perfiles de proteínas de muestras de suero entre pacientes con LMP tratados con natalizumab y controles emparejados sin LMP.

*Firma de expresión génica para riesgo de LMP*

#### Muestras

25 Se recogió sangre completa de pacientes con EM que tomaban natalizumab en tubos paxgene y se almacenó a -80 °C hasta el análisis usando microarrays Affymetrix U133. Las muestras se recogieron como parte de los ensayos clínicos de Biogen Idec o en un entorno posterior a la comercialización. Realizamos el experimento inicial utilizando 18 muestras de 10 sujetos con LMP con natalizumab (8 de los sujetos tenían dos puntos de tiempo, todos prediagnóstico de LMP) y 192 muestras de 96 controles emparejados. Para tener en cuenta la variación aleatoria en la expresión génica, seleccionamos dos puntos de tiempo con 6 meses de diferencia después del inicio del tratamiento con natalizumab. Todas las muestras de pacientes con LMP se recogieron antes del intercambio de plasma.

#### Procedimiento

Para identificar las diferencias de expresión génica entre los pacientes con EM que luego desarrollaron LMP mientras tomaban natalizumab y aquellos que no desarrollaron LMP, estimamos la expresión génica en los microarrays mediante modelado lineal y medimos las diferencias entre los dos grupos mediante MANOVA. Hay 56.000 transcripciones en la microarray, por lo que para tener en cuenta los efectos del ensayo aleatorio y las pruebas múltiples, establecimos un límite para los cambios de expresión génica de 1,3 veces o más con un valor p de  $10^{-4}$  o más bajo. Los genes expresados diferencialmente identificados a partir de los microarrays se probaron en ensayos QRT-PCR independientes en el mismo conjunto de muestras para confirmar la expresión diferencial. QRT-PCR incluyó genes seleccionados expresados diferencialmente basados en el perfil de microarrays y transcripciones adicionales relacionadas con los genes expresados diferencialmente. Para confirmar los hallazgos, se analizó un conjunto independiente de 18 muestras de 8 pacientes con LMP y 114 muestras de 54 pacientes con MS-natalizumab sin LMP en el ensayo QRT-PCR. Al igual que con el primer conjunto de muestras, este segundo conjunto incluyó múltiples puntos de tiempo para algunos de los pacientes pre-LMP y dos puntos de tiempo para los sujetos sin LMP. Dado que solo se probaron 13 genes en el segundo conjunto de muestras, no se aplicaron correcciones de prueba múltiples, y se consideró significativa la expresión génica diferencial de 1,3 a un valor de  $p < 0,05$ .

#### Análisis de las muestras:

##### *Extracción de ARN y CC*

400 µl de sangre conservada Paxgene se colocaron en placas de pocillos profundos para la extracción automática de ARN. Las extracciones de ARN se completaron en Arrayplex (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) usando el kit Agencourt RNAdvance Blood (número de lote A35604) según las especificaciones del fabricante. La integridad del ARN se evaluó usando el kit de reactivo de ARN HT (número de lote 760410, Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) usando un LabChip GX (PerkinElmer, Waltham, MA). Las muestras de ARN con una puntuación RQS de  $> 8,0$  se consideraron de alta calidad para el procesamiento de microarrays aguas abajo.

*Etiquetado, hibridación y escaneo de muestras de microarrays*

Se llevaron a cabo amplificaciones automatizadas de muestras y marcaje con biotina usando el sistema de amplificación de ARN NuGEN Ovation V2 (Cat.# 3100), reactivo Ovation WB (Cat # 1300) y el módulo de biotina Encore (Cat # 4200) (NuGEN Technologies, Inc, San Carlos, CA) según las recomendaciones del fabricante utilizando un manipulador automático de líquidos Arrayplex (Beckman Coulter, Indianápolis, IN). 2 ug de sonda de ssADNc marcada con biotina se hibridaron con matrices de placas Affymetrix GeneChip HT HG-U133 + PM con condiciones modificadas como se describe en Allaire et al. El lavado y la tinción de las matrices hibridadas se completaron como se describe en el manual técnico de análisis de expresión de GeneChip para matrices de placas HT utilizando Genechip® Array Station (Affymetrix, Santa Clara, CA) con modificaciones como se describe en Allaire et al. Las matrices de placas GeneChip® procesadas se escanearon con el escáner GeneTitan (Affymetrix, Santa Clara, CA).

*Cebador qPCR y diseño de sonda*

Los conjuntos de sondas de PCR en tiempo real se diseñaron utilizando Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) usando la configuración predeterminada de TaqMan MGB Quantification.

*RT*

El ARN total (1,0-5,0 µg) se transcribió de forma inversa en 20-50 µl usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) usando hexámeros aleatorios. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C y finalmente durante 5 minutos a 85 °C, según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Las reacciones de RT se diluyeron 5-10 veces antes de qPCR.

*qPCR de alto rendimiento*

Las matrices dinámicas 96.96 para el sistema de microfluidos BioMark™ (Fluidigm Corporation, CA, EE. UU.) se usaron para estudiar la expresión génica en 6,5 ng de ADNc como se describe a continuación.

*Amplificación específica del objetivo*

La preamplificación de ADNc (producida de 25 a 65 ng de ARN total) se realizó en el termociclador Tetrad [at 95 °C durante una etapa de activación de 10 min seguido de 14 ciclos: 95 °C, (15 s), 60 °C, (4 min)] en un volumen total de 5 µl en presencia de todos los cebadores a una concentración de 50 nM. Después de la amplificación previa, se añadieron 20 µl de tampón TE con bajo contenido de EDTA [Tris 10 mM pH8 (Ambion), EDTA 0,1 mM pH8 (Sigma)] a cada muestra.

*Mezcla de muestra para análisis BioMark*

La mezcla previa a la muestra contenía 66,7% 2X Taqman® mezcla maestra de expresión genética (Applied Biosystems), 6,67% de reactivo de carga de muestra de tinte de unión a ADN 20X (Fluidigm), 6,67% 20X EvaGreen™ (Biotium), 20% de tampón TE de EDTA bajo. La mezcla de muestra se obtuvo mezclando 5,6 µl de la mezcla previa a la muestra con 1,9 µl de ADNc diluido.

*Mezcla de ensayo*

Se mezcló una cantidad de 3,8 µl de reactivo de carga de ensayo 2X (Fluidigm) y 1,9 µl de tampón TE de EDTA bajo con 1,9 µl de cebadores (20 µM de cada cebador directo e inverso).

*Condiciones de qPCR*

Después de cebar la matriz dinámica 96.96 en el controlador NanoFlex™ de 4 circuitos fluidicos integrados (IFC) (Fluidigm), se añadieron 5 µl de cada muestra y 5 µl de cada mezcla de ensayo a pocillos dedicados. La matriz dinámica se colocó nuevamente en el controlador IFC para cargar y mezclar en las siguientes condiciones: 50 °C (2 min); 70 °C (30 min) y 25 °C (10 min). La matriz dinámica cargado se transfirió al instrumento de PCR en tiempo real BioMark™. Después de la incubación inicial a 50 °C (2 min) y la activación de la enzima Hotstart a 95 °C (10 min) se realizó un ciclo utilizando 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min) durante 35 ciclos, seguido por análisis de la curva de fusión (1°C/3 s).

*Análisis de datos*

El análisis de datos inicial se realizó con el software de análisis de PCR en tiempo real Fluidigm v. 3.0.2 con corrección de línea base derivada lineal y una corrección de calidad establecida en 0,65.

*Análisis de datos de microarrays*

Se evaluó la calidad de los datos sin procesar en archivos .CEL y se analizaron utilizando R (versión 2.9) y el paquete Bioconductor LIMMA (ref: Smyth GK, et al., 2004). La evaluación del control de calidad mostró que todas las matrices eran de calidad aceptable. Las matrices se normalizaron con el algoritmo Guanine Cytosine Robust Multi-Array

Analysis (GCRMA), que realiza una corrección de ruido basada en guanina/citosina, realiza una normalización de cuantiles entre matrices y resume las múltiples sondas en un valor de conjunto de sondas utilizando un algoritmo de pulido medio (ref: Wu e Irizarry, 2005). La expresión génica diferencial se midió mediante estadísticas t empíricas de Bayes y los valores p se ajustaron para corregir la tasa de descubrimiento falso. Las transcripciones también se filtraron a las consideradas presentes en al menos un 50% en las muestras del mismo grupo fenotípico.

*Análisis de datos de Fluidigm*

Los datos de Fluidigm se sometieron a control de calidad y se normalizaron en función de los niveles de expresión de los genes de mantenimiento. El nivel de expresión de los genes de mantenimiento en todas las muestras de cada placa se representó mediante gráficos de dispersión con líneas conectadas. Las estadísticas de los genes de mantenimiento se muestran mediante diagramas de caja. Los diagramas de caja también se dibujan para la calidad del pocillo de muestra y la calidad del ensayo para filtrar cualquier muestra y ensayo con puntuaciones de baja calidad. Se dibujaron y examinaron gráficos de CC para cada placa. La variabilidad dentro y entre placas se evaluó mediante el CV vs. Gráficos CT.

Después de filtrar los fallos de CC, normalizamos los datos utilizando el método delta (ref: Livak y Schmittgen, 2001). Este método comparó los valores de Ct de las muestras de interés con controles humanos universales (UHCC) como un calibrado. Los valores de Ct tanto del calibrado como de las muestras de interés se normalizaron a un gen de mantenimiento endógeno adecuado. El valor de umbral (CT) registra el número de ciclo fraccional en el que la fluorescencia alcanza un umbral fijo (véase la sección 1). Por lo tanto,  $X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{CT}$ ,  $X = X_T / K_X$  donde XT es el número umbral de moléculas objetivo, CT; X es el valor CT de lectura y KX es una constante.

$$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$$

La cantidad de objetivo, normalizada a la referencia endógena y relativa a una muestra de referencia, viene dada por: cantidad de objetivo =  $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Luego, los valores de Ct delta normalizados se analizaron en JMP® 9.0.3 para evaluar cualquier cambio significativo en la expresión de los genes.

**Resultados**

De las 56.000 transcripciones de la matriz affymetrix u133, sorprendentemente menos de veinte cumplieron con nuestros criterios de expresión diferencial de |cambio de veces| > 0,3 y valor p < 10<sup>-3</sup>. Varios genes que se expresaron a niveles más bajos en sujetos pre-LMP en comparación sin LMP, incluidos CD22, CD72 e IgHM, son específicos de las células B. Si bien las diferencias en el nivel de expresión fueron modestas (regulación negativa 1,5 -2,0 veces), la expresión del gen diferencial se replicó mediante QRT-PCR para seis transcripciones, primero en el mismo conjunto de muestras que se utilizó para los microarrays, y luego en un conjunto independiente de muestras.

Curiosamente, las seis transcripciones expresadas diferencialmente fueron reguladas negativamente en sujetos que desarrollaron LMP. Se conoce que varias de estas transcripciones están enriquecidas en células B ingenuas, lo que sugiere que estas células pueden ser deficientes o defectuosas en pacientes que desarrollan LMP mientras toman natalizumab (véase Tabla 1). La Figura 1 representa ejemplos de transcripciones expresadas diferencialmente en pacientes con LMP frente a pacientes sin LMP.

**Tabla 1. Resultados del perfil transcrito de sangre completa.**

Símbolo del Gen	Descripción del Gen	Conjunto 1: Genoma-Amplio		Conjunto 1: qPCR de Fluidigm		Conjunto 2: qPCTR de Fluidigm	
		P valor	Veces PML/sin PML	P valor	Veces PML/sin PML	P valor	Veces PML/sin PML
IGHM	Constante de inmunoglobulina pesada de mu	5,79E-07	-1,53	1,25E-05	-1,57	8,90E-04	-1,58
CD22	Molécula CD22	2,25E-04	-1,6	4,05E-04	-1,38	3,18E-03	-1,4
CD72	Molécula CD72	4,14E-06	-1,73	4,10E-06	-1,56	1,49E-03	-1,44
FCRLA	Receptor Fc-similar a A	5,02E-05	-1,64	3,78E-05	-1,54	3,96E-04	-1,56

FCRL3	Receptor Fc-similar a 3	1,59E-08	-1,55	2,64E-05	-1,65	4,59E-01	-1,09
IGHD	Constante de inmunoglobulina pesada de delta	n/a	n/a	2,64E-05	-1,73	1,38E-02	-1,42
IGKC	Constante de inmunoglobulina pesada de kappa	n/a	n/a	2,37E-02	-1,57	1,84E-03	-1,46
PARP15	Familia de poli (ADP-ribosa) polimerasa, miembro 15	9,61E-04	-1,51E+00	1,57E-04	-1,41	4,16E-01	-1,07
TRD@	Receptor local delta de células T	1,13E-04	-1,42E+00	9,78E-05	-1,53	7,31E-01	1,05
IGHA1	Constante de inmunoglobulina pesada de alfa 1	5,34E-06	1,01E+00	8,38E-01	-1,03	5,63E-02	-1,39
TMEM158	Proteína 158 de transmembrana (gen/pseudogen)	9,55E-04	1,39E+00	1,05E-03	1,67	8,88E-02	1,04
CLEC4D	Familia 4 del dominio C-tipo lectina, miembro D	3,21E-05	1,56E+00	3,20E-02	1,28	5,34E-01	-1,07
PLSCR1	fosfolipido escramblasa 1	2,81E-06	1,33E+00	3,59E-01	1,11	6,05E-01	-1,06

#### *Firma de expresión de proteína de suero para riesgo de LMP*

##### Muestras

- 5 Se usaron muestras de suero de pacientes con natalizumab LMP y controles emparejados sin LMP para los experimentos de perfil de psroteínas. Para el perfil de Somascan se usaron 82 muestras de suero de 22 pacientes con LMP y 73 muestras de suero de 24 pacientes sin LMP (controles). Se recogieron muestras en uno o más puntos de tiempo, y para los pacientes con múltiples puntos de tiempo, se recogieron muestras tanto antes del inicio del tratamiento con natalizumab, como aproximadamente a los 1, 2 y 3 años de tratamiento. La mayoría de los pacientes también tenían muestras recogidas en el momento del diagnóstico de LMP.
- 10 Para el análisis del isotipo de inmunoglobulina (IgG), se usaron 143 muestras de suero de 63 pacientes con LMP y 124 muestras de suero de 62 pacientes sin LMP. Esas muestras incluidas se describen en el experimento de perfil de proteínas, y muestras transversales adicionales de 41 pacientes. Todas las muestras proceden de ensayos clínicos de Biogen Idec o de un entorno posterior a la comercialización.

##### Análisis de muestras

##### 15 *Análisis de perfiles de proteínas Somascan*

Las muestras de suero (65 µl) se analizaron usando la plataforma de descubrimiento SOMAscan (SomaLogic Inc, Boulder, CO) que consistió en 1128 reactivos SOMAmer™ (SOMAmers). Los resultados se informaron en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Los datos de la muestra se normalizaron primero para eliminar los artefactos de hibridación dentro de una serie, seguido de la normalización media para eliminar otros sesgos de ensayo dentro de la serie y finalmente se calibraron para eliminar las diferencias de ensayo entre las series.

##### *Concentración de suero de isotipos de Ig*

25 Los ensayos para cuantificar IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM en muestras de suero fueron realizados por IBT/Viracor Laboratorios (Lenexa, KS) que utilizan la plataforma de nefelometría Beckman Coulter IMAGE® y kits disponibles comercialmente (Binding Sites, Reino Unido). El método implica la interacción de Ig con un antisuero de oveja específico para formar complejos insolubles y el control de la dispersión de la luz de la suspensión, que es una función de la concentración de Ig en la muestra de prueba. La capacidad de dispersión de la luz de los complejos anticuerpo-Ig se mejoró revistiendo las partículas de látex con anticuerpos anti-Ig. Los controles y los materiales del paciente se diluyeron previamente con el instrumento IMAGE® antes del análisis. Los calibrados y controles preparados a partir de suero humano normal agrupado delipidado y suministrados en forma líquida estabilizada, se diluyeron 1:5 y 1:50, respectivamente según las instrucciones suministradas con el kit. Se construyó una curva de calibración trazada contra los puntos de ajuste de calibración y las concentraciones de IgG4 en las muestras se intrapolaron a partir de la curva. El método fue validado por el laboratorio de referencia IBT/Viracor.

##### Análisis de datos

La expresión diferencial de proteínas de suero entre muestras de LMP y sin LMP se realizó por primera vez en puntos de tiempo transversales. Los valores atípicos de la muestra fueron detectados por PCA en niveles de proteína transformada log2. Se estimó un modelo lineal para cada proteína y se calculó la significación utilizando una estadística t moderada. El análisis diferencial se realizó utilizando el paquete R "limma".

5 Los perfiles de expresión longitudinal se compararon entre pacientes con LMP y sin LMP utilizando un modelo de efectos lineales mixtos donde los efectos fijos fueron el grupo y el número de infusiones de Tysabri y el efecto aleatorio fue cada paciente. El efecto aditivo en el modelo estimó la significación general entre los grupos durante todo el curso del tratamiento con Tysabri y el efecto de interacción en el modelo estimó la significación entre los grupos de una manera dependiente de la dosis.

10 **Resultados**

perfil proteómico del suero usando la plataforma SomaScan reveló una serie de proteínas que diferían en la expresión entre pacientes con LMP y sin LMP. Una mayoría de los marcadores estaban regulados negativamente en pacientes con LMP en comparación con los controles sin LMP. Se conoce que varios de los marcadores regulados negativamente detectados se expresan en las células B o en la función relacionada de las células B (véase Tabla 2).

15 Las Figuras 2, 3 y 4 representan ejemplos de proteínas expresadas diferencialmente.

**Tabla 2. Resultados del perfil proteómico de Somascan en suero**

Proteína	Pre-Tysabri		1 año con Tysabri		1-2 años antes de LMP		En el diagnóstico de LMP	
	P valor	Veces	P valor	Veces	P valor	Veces	P valor	Veces
<b>CCL21</b>	5,35E-03	-1,338	6,85E-04	-1,499	-	-	1,60E-02	-1,338
<b>CXCL12</b>	-	-	-	-	-	-	5,27E-05	-1,447
<b>BCMA</b>	1,46E-02	-1,380	3,56E-02	-0,302	-	-	3,25E-04	-1,422
<b>IgM</b>	3,72E-02	-1,333	-	-	2,14E-03	-2,348	1,28E-04	-2,106
<b>IgG</b>			-	-			1,42E-03	-1,507
<b>FCGR2A/B</b>	-	-	1,42E-02	-1,888			-	-
<b>SIGLEC-3</b>	1,59E-02	-1,368	1,88E-02	-2,087	2,18E-02	1,673	8,81E-03	-1,600
<b>SIGLEC-9</b>	-	-	-	-	-	-	6,87E-03	-4,381
<b>IGFBP7</b>	-	-	-	-	-	-	2,93E-05	-0,756
<b>Notch1</b>	-	-	-	-	-	-	3,41E-03	-1,198
<b>Jag1</b>	-	-	-	-	-	-	3,65E-03	-1,413
<b>C3b</b>	-	-	-	-	2,32E-02	2,866	2,79E-02	2,995

20 Se analizaron muestras de suero adicionales para determinar los niveles de subclases de Ig utilizando un ensayo validado basado en nefelometría. Como resultado, se observó que las concentraciones de varios isotipos de Ig tienden a ser más bajas en pacientes con LMP en comparación con los controles sin LMP (Tabla 3). Por ejemplo, las concentraciones de IgM medidas antes del inicio de los tratamientos con Tysabri fueron más bajas en pacientes con LMP en comparación con sin LMP. Además, las concentraciones de IgG1 parecieron disminuir durante el tratamiento con Tysabri en pacientes que posteriormente desarrollaron LMP. En general, los pacientes que desarrollaron LMP parecían tener concentraciones de IgM e IgG más cercanas o inferiores al intervalo de referencia normal más bajo, lo que sugiere cierto grado de supresión inmune.

25

**Tabla 3. Niveles de subclase de IgG.**

	BL		6 meses		36 meses.		48 meses		+ de 48 meses	
	p valor	Veces	p valor	Veces	p valor	Veces	p valor	Veces	p valor	Veces
IgG1							1,84E-02	-0,387	1,93E-02	-0,412
IgG2	4,63E-02	-0,293			2,73E-02	-0,479			3,69E-03	-0,603
IgG3			8,37E-03	-0,955						
IgG4									2,58E-02	-0,860
IgM	3,72E-02	-0,414								

*Discusión*

5 Nuestros resultados revelan que los pacientes con natalizumab que desarrollan LMP muestran diferencias sutiles pero reproducibles en varias transcripciones de genes y proteínas en comparación con los pacientes que no desarrollan LMP. Esas transcripciones y proteínas expresadas diferencialmente se enriquecen en marcadores relacionados con células B, específicamente células B ingenuas, lo que sugiere que los cambios en el compartimento de células B del sistema inmune pueden desempeñar un papel en la susceptibilidad de los pacientes a LMP.

10 La transcripción extensa y el perfil de proteínas de la sangre también muestran que la transcripción general y los marcadores de proteínas son relativamente estables entre los pacientes con LMP y sin LMP, con sorprendentemente pocos cambios en la expresión génica y los niveles de proteína, incluyendo ningún signo de cambios en la mayoría tipos de células inmunes y sin respuestas antivirales clásicas en la periferia. Incluso las diferencias observadas en los marcadores de células B son sutiles y pueden limitarse a subconjuntos específicos. En todos los datos de microarrays del genoma, no hay signos de diferencias en los marcadores de células pan-B como CD19, sino solo cambios en un subconjunto muy pequeño de genes asociados con células B ingenuas.

15 Además, se demostró que las concentraciones de varios marcadores de proteínas, incluyendo las Igs, fueron más bajas en pacientes con LMP en comparación con los controles sin LMP. Esos pueden usarse para controlar a los pacientes en busca de cambios en el estado inmune que puedan correlacionarse con el riesgo de desarrollar LMP. Curiosamente, se conoce que natalizumab causa un aumento en los linfocitos circulantes, observándose los cambios más pronunciados para las células B. Esto puede sugerir que la perturbación en el equilibrio de las células inmunes puede conducir al agotamiento o la disfunción funcional de cierto tipo de células B.

20 Se analizará un panel más grande de muestras de suero para ver los isotipos de Ig total y específicos de VJC y para otros marcadores expresados diferencialmente, como se identifica en los experimentos del perfil. Además, se realizarán varios experimentos adicionales, tal como inmunofenotipado completo de células de sangre periférica, secuenciación de repertorio de BCR y TCR, secuenciación de transcripción de células de sangre periférica y evaluación de Igs y bandas oligoclonales en LCR.

**Tabla 4. Marcadores de células B.**

<u>Proteína</u>	<u>Entrezid</u>	<u>Registro</u>
CCL21	6366	CAG29322
CXCL12	6387	CAG29279
BCMA	608	BAB60895
IgM	3507	AAC37537
IgG	Ninguna	AAA02914

<u>Proteína</u>	<u>Entrezid</u>	<u>Registro</u>
FCGR2A	2212	AAH20823
FCGR2B	2213	AAI48274
SIGLEC3	945	AAH28152
SIGLEC9	27180	AAQ89272
IGFBP7	3490	NP_001544, NP_001240764
NOTCH 1	4851	CAG33502
JAG1	182	AAC51731
C3B	718	NP_000055
CXCL13	10563	NP_006410.1
<u>Gen</u>	<u>Entrezid</u>	<u>Registro</u>
IGHM	3507	AAC37537.1
IGHD	3495	CAA69680.1
IGHK	50802	AAH62704.1
FCRLA	84824	AAL23899.1
FCRL3	115352	AAH28933.1
CD72	971	NP_001773.1
CD22	933	NP_001762.2
TMEM158	25907	AAH57390.1

**Tabla 5. Muestras de pacientes con LMP de Tysabri Start (54 muestras LMP previa de 22 sujetos con LMP).**

ID del sujeto:	BL	6meses	12meses	24meses	36meses	48meses
142-101	x		x	x	x	
197-119	x		x	x	x	
2009BI016462					x	
454-110	x	x				
2009BI018360					x	

ES 2 818 823 T3

ID del sujeto:	BL	6meses	12meses	24meses	36meses	48meses
2009BI018270			x			
2009BI027516			x			
400-005	x		x	x		
2010BI005566			x	x	x	
2010BI003117	x		x	x		
2010BI025351			x			
449-012	x		x	x		
428-005	x	x				
446-021	x		x			
429-006	x	x				
2011BI031122	x		x	x		x
441-007	x		x	x		
661-106	x		x	x		
754-110	x		x	x		
402-006	x		x	x		
454-109			x	x		
2012BI051723						x
Total	14	3	16	12	5	2

**Tabla 6. Análisis diferencial transversal de SOMAlogic (BL: inicio de Tysabri)**

-	<u>exp2</u>	-	<u>BL</u>	-	<u>6 meses</u>	-
<u>Gen</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>
SIGLEC-3(CD33)	8,81E-03	-0,678	1,59E-02	-0,452	1,88E-02	-1,062
6Cinas (CCL21)	1,60E-02	-0,420	5,35E-03	-0,351		
BCMA (TNFRSF17)	3,25E-04	-0,508	1,46E-02	-0,464		
FCG2A/B					3,24E-02	-0,938
MAP2K4	4,80E-03	-0,659			7,69E-03	0,623

ES 2 818 823 T3

-	<u>exp2</u>	-	<u>BL</u>	-	<u>6 meses</u>	-
<u>Gen</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>
IgG	1,87E-03	-0,409	3,81E-02	-0,204		
CD5L	3,20E-02	-0,386	2,98E-02	-0,423		
IL-17 sR (IL17RA)	2,55E-02	-0,451				
CK-MB (CKB, CKM)	5,81E-03	-0,786				
C3b	2,79E-02	1,583				
-	<u>12 meses</u>	-	<u>24meses</u>	-	<u>36 meses.</u>	-
<u>Gen</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>	<u>p valor</u>	<u>Veces</u>
SIGLEC3(CD33)			4,12E-02	-0,351		
6Cinas (CCL21)	6,85E-04	-0,584				
BCMA (TNFRSF17)	3,56E-02	-0,381				
FCG2A/B	1,42E-02	-0,917	3,02E-02	-0,806		
MAP2K4	3,48E-03	-0,886				
IgG					3,62E-02	-0,886
CD5L					4,46E-02	-0,616
IL-17 sR (IL17RA)			4,74E-02	-0,424	2,88E-02	-0,854
CK-MB (CKB, CKM)			4,22E-02	-0,651	4,12E-02	-1,670
C3b			2,32E-02	1,519	1,34E-02	2,625

## REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar LMP, comprendiendo el método: determinar los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B en una muestra biológica del paciente, en donde si hay una diferencia significativa en los niveles de expresión en comparación con un estándar de referencia, se determina que el paciente tiene un riesgo más alto de desarrollar LMP, y en donde si los niveles de expresión son iguales o sustancialmente similares al estándar de referencia, se determina que el paciente tiene un riesgo más bajo de desarrollar LMP, en donde el uno o más se selecciona más marcador de células B del grupo que consiste en IgM e IgG1, en donde los niveles de expresión de uno o más de IgM e IgG1 son niveles de expresión total, opcionalmente en donde la muestra biológica es una muestra de sangre completa, suero o plasma.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde el estándar de referencia son los niveles de expresión de uno o más marcadores de células B en un paciente tratado con un anticuerpo anti-VLA4 que no desarrolla LMP, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-VLA4 es natalizumab.
3. El método de la reivindicación 1, en donde:
- (a) la muestra biológica comprende una fracción no celular;
- 15 (b) la muestra biológica es una muestra de suero; o
- (c) la muestra biológica es sangre, en donde opcionalmente la sangre se procesa adicionalmente para obtener plasma o suero.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además obtener un ácido nucleico o proteína de la muestra para determinar los niveles de expresión del marcador de células B, opcionalmente en donde:
- 20 (a) el ácido nucleico es ADN genómico, ADNc o ARN;
- (b) se determina la cantidad de proteína marcadora de células B, opcionalmente usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), una transferencia Western y un método inmunohistoquímico; o
- (c) se determina la cantidad de ácido nucleico marcador de células B, opcionalmente en donde
- 25 (i) el ácido nucleico es ARNm; o
- (ii) la cantidad de ácido nucleico marcador de células B se determina usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en transferencia Northern, RT-PCR y un biochip.
5. El método de la reivindicación 1, en donde se determina el nivel de expresión de IgM, opcionalmente en donde se determina el nivel de expresión de proteína IgM o el nivel de expresión de ácido nucleico de IgM.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en donde se determina que el paciente:
- (a) tienen un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de IgM determinados están por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo, opcionalmente en donde
- (i) el nivel umbral de expresión de la proteína de riesgo más bajo de IgM es superior a 250 mg/dL; o
- (ii) en donde el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más bajo para IgM es superior a 4 log<sub>2</sub>;
- 35 (b) tienen un riesgo más alto de LMP si los niveles de IgM según lo determinado están por debajo de un nivel umbral de expresión de riesgo más alto, opcionalmente en donde
- (i) el nivel umbral de expresión de proteínas de riesgo más alto de IgM es inferior a 50 mg/dL; o
- (ii) el nivel umbral de ácido nucleico de riesgo más alto de IgM es 3 log<sub>2</sub> o menor; o
- (c) tienen un riesgo intermedio de LMP si el paciente tiene niveles de IgM entre el nivel umbral de expresión de riesgo más bajo y el nivel umbral de expresión de riesgo más alto, opcionalmente en el que el paciente está sujeto a una evaluación adicional del riesgo de LMP.
- 40 7. El método de la reivindicación 5, en donde:
- (a) se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de proteína IgM están entre 50 y 250 mg/dL;
- 45 (b) se identifica que el paciente tiene un riesgo más alto de desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva, si hay una disminución de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 veces o más en los niveles de expresión de IgM en

comparación con el estándar de referencia, opcionalmente en el que se determina el nivel de expresión de proteína IgM o el nivel de expresión de ácido nucleico IgM; o

(c) se determina que el paciente tiene un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de ácido nucleico de IgM están entre 3 log<sub>2</sub> y 4,5 log<sub>2</sub>.

5 8. El método de la reivindicación 1, en donde:

(a) el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4 o

(b) el paciente ha estado recibiendo la administración del anticuerpo anti-VLA durante al menos una semana, dos semanas, un mes, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 meses, 1, 2 o 3 años en el momento de la determinación.

9. El método de la reivindicación 8, en donde se determina que el paciente:

10 (a) tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgM según lo determinado están por encima de un nivel umbral de expresión de riesgo más bajo de 200 mg/dL;

(b) tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgM según lo determinado están por debajo de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto de 100 mg/dL o menor; o

15 (c) tener un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de expresión de la proteína IgM están entre 100 y 200 mg/dL.

10. El método de la reivindicación 1, en donde se determina el nivel de expresión de IgG1, opcionalmente en donde se determina el nivel de expresión de proteína IgG1 o el nivel de expresión de ácido nucleico de IgG1.

11. El método de la reivindicación 10, en donde se determina que el paciente:

20 (a) tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de IgG1 según lo determinado están por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo, opcionalmente en el que el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más bajo de IgG1 es superior a 1100 mg/dL;

(b) tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de IgG1 según lo determinado están por debajo de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, opcionalmente en el que el nivel de umbral de expresión de proteína de riesgo más alto de IgG1 está por debajo de 240 mg/dL;

25 (c) tiene un riesgo intermedio de LMP si el paciente tiene niveles de IgG1 entre el nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo y el nivel de umbral de expresión de riesgo más alto, opcionalmente en donde el paciente está sujeto a una evaluación adicional del riesgo de LMP; o

(d) tener un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de proteína IgG1 están entre 240 y 1100 mg/dL.

30 12. El método de la reivindicación 10, en donde el paciente no ha recibido tratamiento con un anticuerpo anti-VLA4.

13. El método de la reivindicación 12, en donde se determina que el paciente:

(a) tiene un riesgo más bajo de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgG1 según lo determinado están por encima de un nivel de umbral de expresión de riesgo más bajo de 600 mg/dL;

35 (b) tiene un riesgo más alto de LMP si los niveles de expresión de la proteína IgG1 según lo determinado están por debajo de un nivel de umbral de expresión de riesgo más alto de 400 mg/dL o bajo; o

(c) tener un riesgo intermedio de desarrollar LMP si se determina que los niveles de expresión de la proteína IgG1 están entre 400 y 600 mg/dL.

40 14. Un anticuerpo anti-VLA-4 para usar en un método de tratamiento de un paciente con esclerosis múltiple, en donde el paciente ha sido evaluado por un método de la reivindicación 1 para tener un riesgo más bajo de desarrollar LMP, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-VLA-4 es natalizumab.

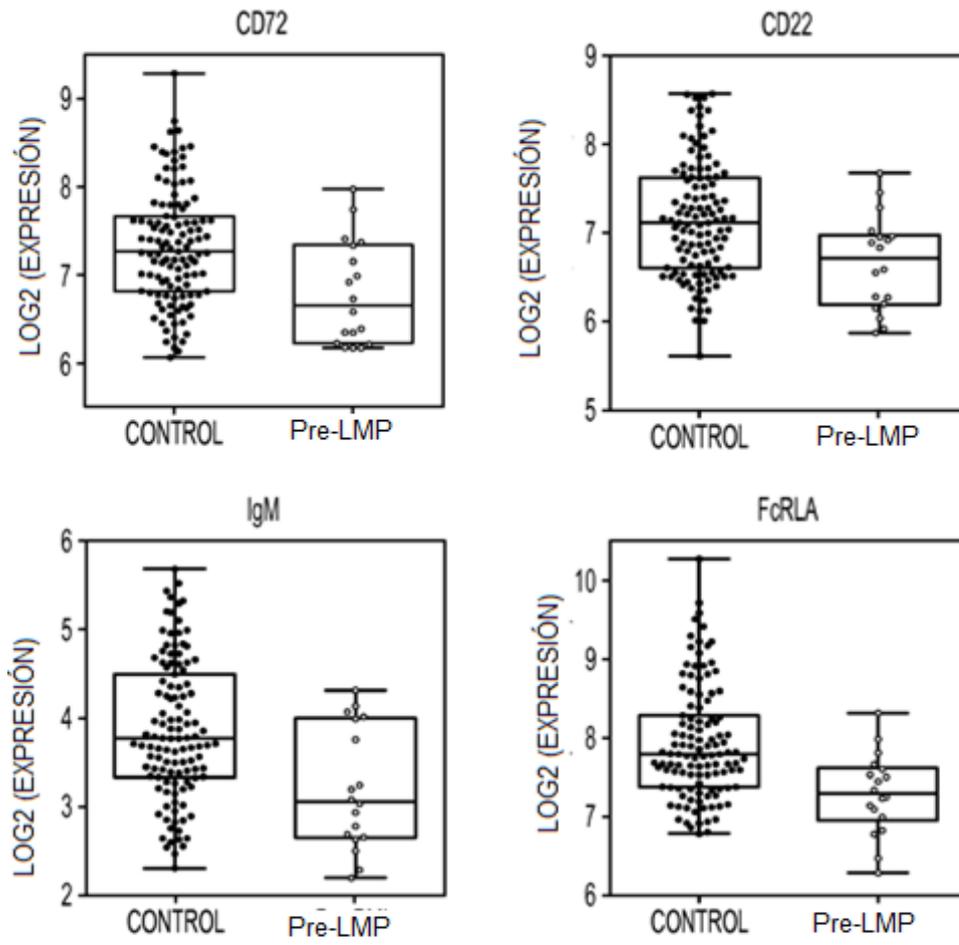


FIG. 1

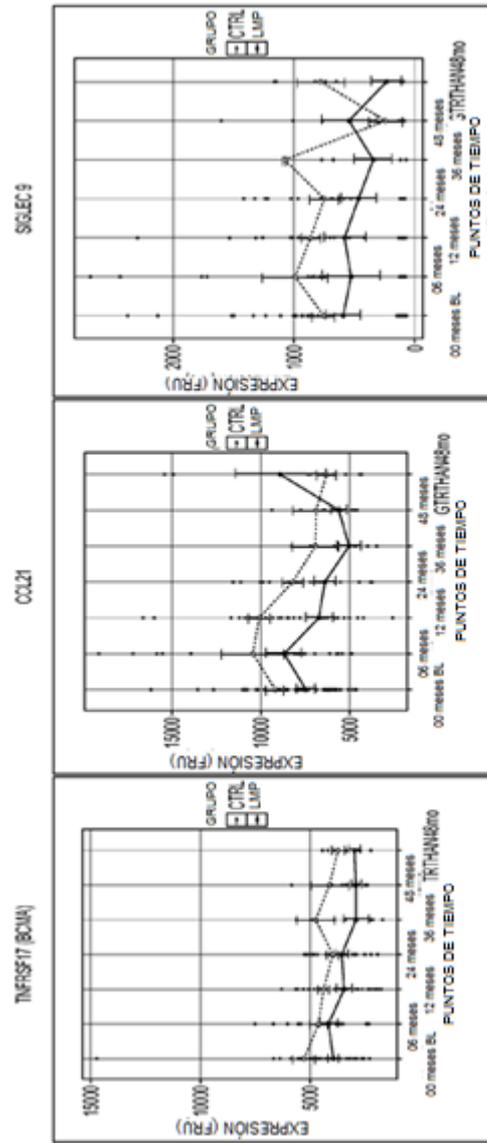


FIG. 2

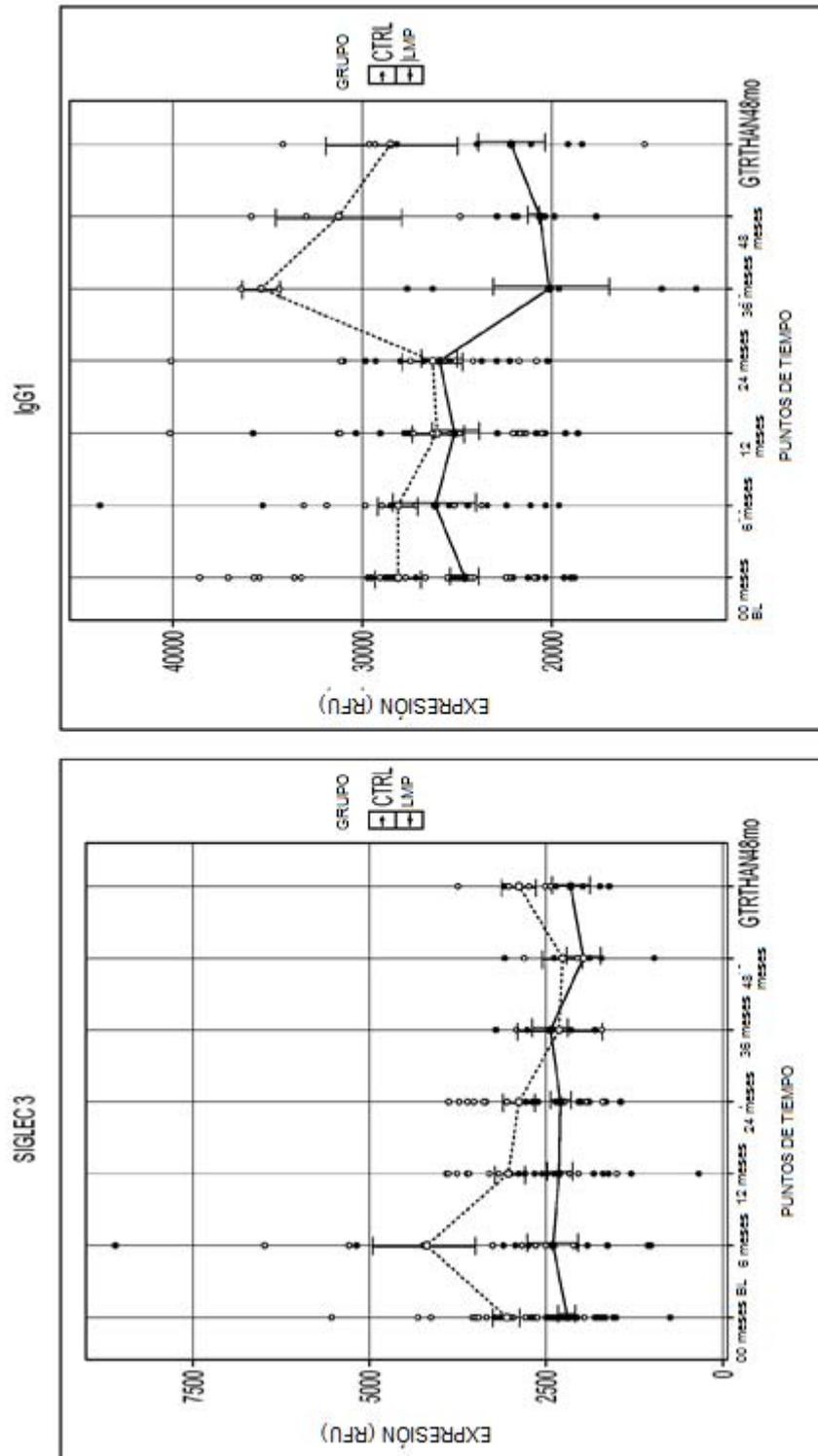


FIG. 3

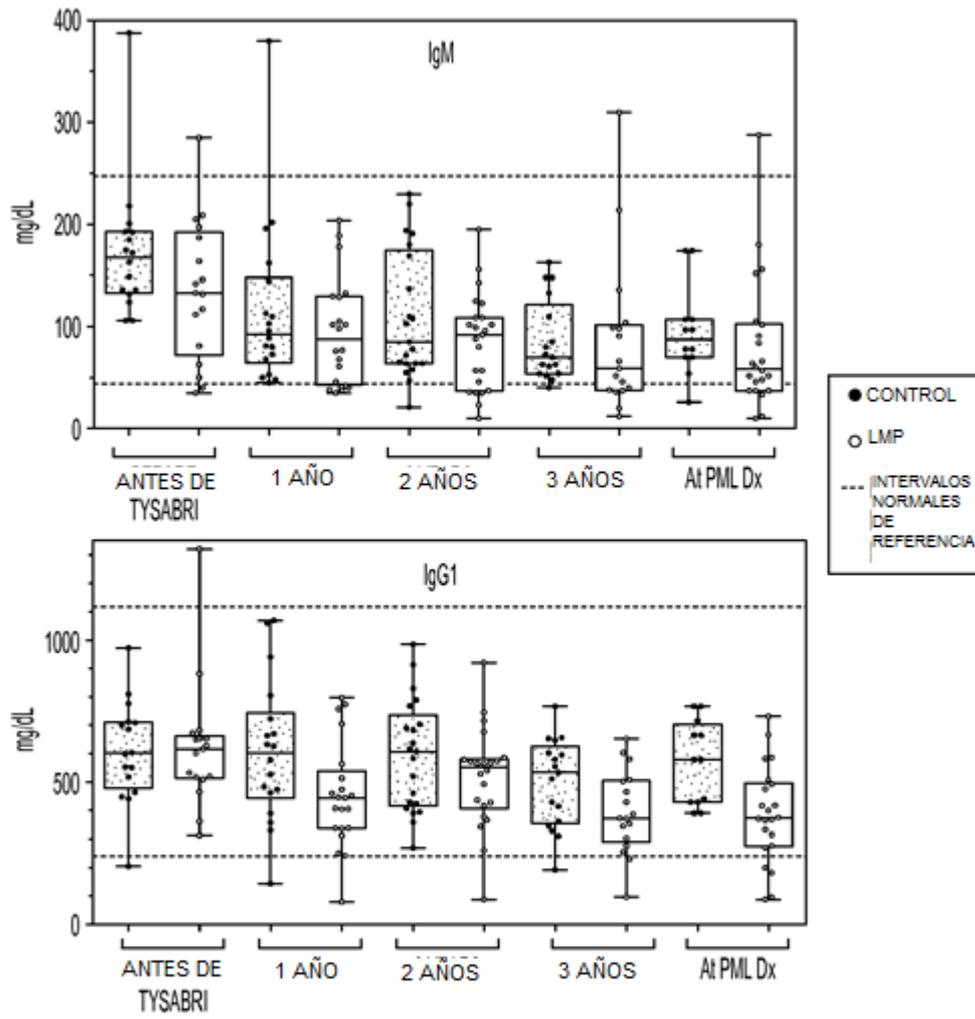


FIG. 4