

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 440**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2006** **E 10196249 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 2306202**

54 Título: **Método de detección o seguimiento de una enfermedad maligna de las células plasmáticas**

30 Prioridad:

27.01.2005 GB 0501741

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

15.04.2014

73 Titular/es:

**THE BINDING SITE GROUP LIMITED (100.0%)
PO Box 11712
Birmingham West Midlands B14 4ZB, GB**

72 Inventor/es:

BRADWELL, ARTHUR

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 455 440 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 detección o seguimiento de una enfermedad maligna de las células plasmáticas

- 5 **[0001]** La invención se refiere a ensayos y métodos para la detección o seguimiento de enfermedades malignas de las células plasmáticas.
- 10 **[0002]** Las moléculas de anticuerpo (también conocidas como inmunoglobulinas) presentan una simetría binaria y están compuestas de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, conteniendo cada una dominios variable y constante. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras se combinan formando un sitio de unión a antígeno, de manera que ambas cadenas contribuyen a la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo. La estructura tetramérica básica de los anticuerpos comprende dos cadenas pesadas unidas covalentemente mediante un enlace disulfuro. Cada cadena pesada, a su vez, se encuentra unida a una cadena ligera, nuevamente mediante un enlace disulfuro. Lo anterior resulta en una molécula sustancialmente en forma de "Y". Se muestra esto esquemáticamente en la figura 1.
- 15 **[0003]** Las cadenas pesadas son las mayores de los dos tipos de cadena presentes en los anticuerpos, con una masa molecular típica de entre 50.000 Da y 77.000 Da, en comparación con las cadenas ligeras, que son menores (25.000 Da).
- 20 **[0004]** Existen cinco clases principales de cadena pesada, que son γ , α , μ , δ y ϵ , que son las cadenas pesadas constituyentes de: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, respectivamente. IgG es la inmunoglobulina principal del suero humano normal, constituyendo entre 70% y 75% del total de inmunoglobulinas. Es el anticuerpo principal de las respuestas inmunológicas secundarias. Forma un único tetrámero de dos cadenas pesadas más dos cadenas ligeras.
- 25 **[0005]** IgM constituye aproximadamente 10% del total de inmunoglobulinas. Las moléculas, conjuntamente con las cadenas J, forman un pentámero de cinco de las estructuras básicas de 4 cadenas. Las cadenas pesadas individuales presentan un peso molecular de aproximadamente 65.000 y la molécula completa presenta un peso molecular de aproximadamente 970.000. IgM se encuentran mayoritariamente restringida al conjunto intravascular de inmunoglobulinas y es el anticuerpo temprano predominante.
- 30 **[0006]** IgA representa 15% a 20% del conjunto de inmunoglobulinas séricas en el ser humano. Más de 80% de la IgA se encuentra en forma de monómero. Sin embargo, algunas de las IgA (IgA secretorias) existen en forma dimérica.
- 35 **[0007]** IgD constituye menos de 1% del total de inmunoglobulinas plasmáticas.
- 40 **[0008]** IgE, aunque escaso en el suero normal, se encuentra sobre la membrana superficial de basófilos y mastocitos. Se asocia a enfermedades alérgicas tales como el asma y la fiebre del heno.
- 45 **[0009]** Además de las cinco clases principales o clases, existen cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Además, existen dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2).
- 50 **[0010]** Existen dos tipos de cadena ligera: lambda (λ) y kappa (κ). En el ser humano se produce aproximadamente el doble de moléculas de κ que de λ , aunque ello difiere bastante en algunos mamíferos. Cada cadena contiene aproximadamente 220 aminoácidos en una única cadena polipeptídica que se pliega formando un dominio constante y un dominio variable. Las células plasmáticas producen uno de los cinco tipos de cadena pesada conjuntamente con las moléculas κ ó λ . Normalmente se produce un exceso de aproximadamente 40% de cadenas ligeras libres respecto a la síntesis de cadenas pesadas. Las moléculas de cadena ligera que no se unen a moléculas de cadena pesada se conocen como "moléculas de cadena ligera libres". Las cadenas ligeras κ habitualmente se encuentran en forma de monómero. Las cadenas ligeras λ tienden a formar dímeros.
- 55 **[0011]** Existen varias enfermedades proliferativas asociadas a las células productoras de anticuerpos. La figura 2 muestra el desarrollo del linaje de células B y las enfermedades asociadas. Estas enfermedades se conocen como enfermedades malignas de las células plasmáticas. Se resumen en detalle en la obra "Serum-free Light Chain Analysis", A.R. Bradwell, disponible de The Binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido (ISBN: 07044 24541).
- 60 **[0012]** En muchas de dichas enfermedades proliferativas, una célula plasmática prolifera formando un tumor monoclonal de células plasmáticas idénticas. Ello resulta en la producción de grandes cantidades de inmunoglobulinas idénticas y se conoce como gammopatía monoclonal.
- [0013]** Algunas enfermedades tales como el mieloma y la amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL) constituyen aproximadamente 1,5% y 0,3% respectivamente de las muertes por cáncer en el Reino Unido. El mieloma múltiple es la segunda forma más común de malignidad hematológica tras el linfoma no de Hodgkin. En las poblaciones

caucásicas, la incidencia es de aproximadamente 40 por millón al año. Convencionalmente el diagnóstico del mieloma múltiple se ha basado en la presencia de un exceso de células plasmáticas monoclonales en la médula ósea, inmunoglobulinas monoclonales en el suero o en la orina y alteraciones relacionadas en órganos o tejidos, tales como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas. El contenido normal de las células plasmáticas de la médula ósea es de aproximadamente 1%, mientras que en el mieloma múltiple el contenido típicamente es superior al 30%, pero puede ser superior al 90%.

[0014] La amiloidosis AL es un trastorno de la conformación de las proteínas caracterizado por la acumulación de fragmentos de cadena monoclonal libre en forma de depósitos de amiloide. Típicamente, estos pacientes se presentan con insuficiencia cardíaca o renal, aunque pueden encontrarse implicados nervios periféricos y otros órganos.

[0015] Existen algunas otras enfermedades que pueden identificarse a partir de la presencia de inmunoglobulinas monoclonales en el torrente sanguíneo, o efectivamente en la orina, de un paciente. Entre ellas se incluyen el plasmacitoma y el plasmacitoma extramedular, un tumor de células plasmáticas que aparece fuera de la médula ósea y que puede producirse en cualquier órgano. En este tumor la proteína monoclonal típicamente es IgA. Pueden producirse múltiples plasmacitomas solitarios, con o sin evidencia de mieloma múltiple. La macroglobulinemia de Waldenström es un trastorno linfoproliferativo de grado bajo que se asocia a la producción de IgM monoclonal. Aparecen aproximadamente 1.500 nuevos casos cada año en los Estados Unidos, y 300 en el Reino Unido. La cuantificación de la IgM sérica resulta importante tanto para el diagnóstico como el seguimiento. Los linfomas no de Hodgkin de las células B causan aproximadamente 2,6% del total de muertes por cáncer en el Reino Unido, y se han identificado inmunoglobulinas monoclonales en el suero de aproximadamente 10% a 15% de los pacientes mediante métodos estándares de electroforesis. Los informes iniciales indican que las cadenas ligeras monoclonales libres pueden detectarse en la orina de 60% a 70% de los pacientes. En la leucemia linfocítica crónica de las células B, se han identificado proteínas monoclonales mediante el inmunoensayo de las cadenas ligeras libres.

[0016] Además, existen condiciones denominadas MGUS. Éstas son gammopatías monoclonales de significación indeterminada. Este término se refiere a la presencia inesperada de una inmunoglobulina monoclonal intacta en individuos que no presentan indicios de mieloma múltiple, amiloidosis AL, macroglobulinemia de Waldenström, etc. Las MGUS pueden encontrarse en 1% de la población de más de 50 años, en 3% de las de más de 70 años y hasta 10% de la de más de 80 años de edad. La mayoría de ellas se relacionan con IgG o IgM, aunque más raramente pueden relacionarse con IgA o ser biclonales. Aunque la mayoría de personas con MGUS muere de enfermedades no relacionadas, MGUS puede transformarse en una gammopatía monoclonal maligna.

[0017] En por lo menos algunos casos de las enfermedades subrayadas anteriormente, las enfermedades se presentan con concentraciones anormales de inmunoglobulinas monoclonales o de cadenas ligeras libres. En el caso de que una enfermedad comporte la replicación anormal de las células plasmáticas, con frecuencia ello resulta en la producción de más inmunoglobulinas por este tipo de célula debido a que dicho "monoclón" se multiplica y aparece en la sangre.

[0018] La identificación de las inmunoglobulinas monoclonales, y de las cadenas pesadas y ligeras que forman dichas inmunoglobulinas puede llevarse a cabo de varias maneras. La electroforesis de proteínas séricas (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE) han sido utilizadas durante algunos años para identificar la presencia de proteínas monoclonales en el suero. La electroforesis de proteínas séricas es el método estándar para el cribado para el mieloma múltiple de inmunoglobulinas intactas y se basa en el escaneo de geles en los que se han separado proteínas séricas, la fijación y la tinción. Existen limitaciones asociadas a este método, incluyendo que algunas muestras de pacientes con mielomas presentan una apariencia normal en la electroforesis. Esto resulta en la posibilidad de que se pasen por alto algunos pacientes y del diagnóstico erróneo de la enfermedad. Además, la técnica no permite obtener con facilidad una determinación cuantitativa exacta de las diversas proteínas identificadas, particularmente a concentraciones bajas. La electroforesis del suero puede utilizarse para identificar la presencia de cadenas ligeras libres, pero el límite de detección se encuentra comprendido entre 500 mg/l y 2.000 mg/l, dependiendo de si la proteína monoclonal migra en paralelo con las proteínas β . La electroforesis de proteínas séricas es negativa para las cadenas ligeras libres en todos los pacientes que presentan mieloma no secretorio.

[0019] La electroforesis de inmunofijación utiliza un anticuerpo precipitador contra las moléculas de inmunoglobulina. Aunque esto mejora la sensibilidad del ensayo, no puede utilizarse para cuantificar las inmunoglobulinas monoclonales debido a la presencia del anticuerpo precipitador. La electroforesis de inmunofijación también resulta laboriosa y la interpretación puede resultar difícil. En muchos laboratorios clínicos se utiliza la electroforesis de zona capilar para la separación de las proteínas séricas y es capaz de detectar la mayor parte de las inmunoglobulinas monoclonales. Sin embargo, en comparación con la inmunofijación, la electroforesis de zona capilar no consigue detectar las proteínas monoclonales en 5% de las muestras. Estos resultados denominados "falsos negativos" incluyen las proteínas monoclonales presentes a baja concentración.

[0020] Se han creado ensayos del total de κ y λ . Sin embargo, los ensayos del total de κ y λ no son

suficientemente sensibles para detectar inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras libres. Ello se debe a las elevadas concentraciones de fondo de cadenas ligeras policlonales unidas, que interfieren con dichos ensayos.

5 **[0021]** Más recientemente, los solicitantes han desarrollado un ensayo sensible que puede detectar las cadenas ligeras κ libres y, separadamente, las cadenas ligeras λ libres. Este método utiliza un anticuerpo policlonal dirigido contra las cadenas ligeras κ libres o las cadenas ligeras λ libres. Esto se comenta en detalle en la obra de A.R. Bradwell. La posibilidad de cultivar dichos anticuerpos también se comenta como una de entre varias especificidades diferentes posibles en la patente WO n° 97/17372. Este documento da a conocer métodos para hacer tolerante a un animal y permitir que produzca los anticuerpos deseados, siendo estos anticuerpos más específicos que los que pueden producir los métodos de la técnica anterior. El ensayo de cadenas ligeras libres utiliza anticuerpos para unirlos a cadenas ligeras λ libres y κ libres. Se determina la concentración de las cadenas ligeras libres mediante nefelometría o turbidimetría. Esto implica la adición de la muestra de ensayo a una solución que contiene el anticuerpo apropiado en un recipiente de reacción o cubeta. Se hace pasar un haz de luz a través de la cubeta y a medida que se produce la reacción de antígeno-anticuerpo, se dispersa crecientemente la luz que pasa a través de la cubeta, al formarse los complejos inmunológicos, que son insolubles. En la nefelometría, se realiza un seguimiento de la dispersión lumínica mediante la medición de la intensidad de la luz en un ángulo diferente del de la luz incidente, mientras que en la turbidimetría, se realiza un seguimiento de la dispersión lumínica mediante la medición de la reducción de intensidad del haz incidente de luz. Inicialmente se somete a ensayo una serie de calibradores de antígeno conocido (es decir, κ libre ó λ libre) con el fin de producir una curva de calibración de dispersión lumínica medida frente a concentración de antígeno.

[0022] Se ha encontrado que dicha forma de ensayo detecta con éxito las concentraciones de cadena ligera libre. Además, la sensibilidad de la técnica es muy elevada.

25 **[0023]** Debido a que las células plasmáticas monoclonales del tipo que causa, por ejemplo, el mieloma múltiple producen únicamente un tipo de anticuerpo con una cadena ligera λ ó una cadena ligera κ , cambia la proporción relativa de λ ó de κ .

30 **[0024]** En el caso de que se conozcan las cantidades de cadena ligera λ libre y de cadena ligera κ libre, resulta posible calcular la proporción entre las cadenas ligeras λ libres y las cadenas ligeras κ libres. Un ejemplo de los resultados en forma de gráfico de concentraciones de λ sérico frente a las de κ sérico para pacientes con diferentes enfermedades se muestra en la figura 3. Las cantidades de λ y κ libres se encuentran sesgadas respecto a las concentraciones normales debido a la naturaleza monoclonal de muchas de estas enfermedades. La medición de la proporción $\kappa:\lambda$ para las cadenas ligeras libres ayuda en el diagnóstico de enfermedades. Además, en el caso de que la enfermedad se trate, por ejemplo, mediante quimioterapia o radioterapia, la técnica permite realizar un seguimiento de la enfermedad. En el caso de que la enfermedad se esté tratando con éxito, las concentraciones de cadenas ligeras libres, que presentan un tiempo de vida relativamente corto en sangre, resultarán modificadas y se acercarán a las concentraciones normales observadas en sueros normales. Además, en las enfermedades malignas de las células plasmáticas, con frecuencia se produce la supresión de la producción de la cadena ligera opuesta, de manera que la proporción $\kappa:\lambda$ podría ser más sensible que las mediciones individuales de las FLC.

[0025] Haraldsson A. *et al.* (Ann. Clin. Biochem. 28(5):461-466, 1991) dan a conocer ensayos ELISA para la determinación de proporciones de kappa y lambda respecto al total de IgG, IgA e IgM.

45 **[0026]** Chi S.A. *et al.* (J. Clin. Immunol. 11(4):219-223, 1991) dan a conocer el estudio de pacientes con nefropatía de IgA primaria con un kit ELISA. El ensayo ELISA utiliza anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgA1 humana a modo de captura de fase sólida y anticuerpos anti-kappa y anti-lambda marcados con peroxidasa. La nefropatía de IgA es una enfermedad renal causada por la acumulación de IgA en forma de depósitos en los riñones y aparentemente presenta un componente familiar.

50 **[0027]** Girkontaite I., 1996, en la tesis doctoral titulada "The investigation of antigenic Structure of human immunoglobulins using monoclonal antibodies" [Investigación de la estructura antigénica de las inmunoglobulinas humanas utilizando anticuerpos monoclonales] describe un ensayo ELISA no cuantitativo.

55 **[0028]** La figura 4 indica que no todas estas enfermedades producen cadenas ligeras libres. Por lo tanto, la utilización de las cadenas ligeras libres como marcador de las enfermedades no presenta un éxito del 100%.

60 **[0029]** Los inventores han advertido que resulta posible producir anticuerpos y ensayos que podrían distinguir entre, por ejemplo, IgG- λ e IgG- κ . Por lo tanto, intentaron producir anticuerpos que fuesen específicos para inmunoglobulinas y que presentasen especificidad para tanto una clase de cadena pesada como un tipo de cadena ligera. Han tenido éxito en este intento. También han podido generar ensayos que permiten la rápida medición cuantitativa de, por ejemplo, proporciones de IgG- λ e IgG- κ que permiten la rápida identificación y/o seguimiento del avance de una enfermedad monoclonal asociada a la producción de una clase específica de cadena pesada, o incluso de una subclase de cadena pesada, conjuntamente con una cadena λ ó κ unida.

5 **[0030]** Mediante la determinación de la composición de inmunoglobulinas utilizando un anticuerpo específico de una clase de cadena pesada y simultáneamente de un tipo de cadena ligera, o mediante la utilización de un primer anticuerpo contra una clase de cadena pesada y un segundo anticuerpo para determinar el tipo de cadena ligera unido a la cadena pesada, los inventores han producido un ensayo sensible para las enfermedades malignas de las células plasmáticas. Los ensayos desarrollados permiten un seguimiento más sensible de la enfermedad que, por ejemplo, SPE. La mayor sensibilidad permite la detección del clon, por ejemplo en el caso de que las concentraciones de la proteína monoclonal caigan a niveles inferiores a los límites de detección de SPE. Además, ello presenta el potencial de identificar algunas enfermedades biclonales, que podrían presentar proporciones de cadena ligera normales.

15 **[0031]** Además, una ventaja adicional es que dicho ensayo no resulta afectado por la función renal. Las cadenas λ y κ libres son eliminadas mediante filtración a través de los riñones, y su concentración se encuentra afectada por la tasa de filtración. Debido a su tamaño, la inmunoglobulina intacta resulta eliminada por otros mecanismos. De esta manera, los niveles crecientes de cadena ligera libre pero la falta de cambio de la cantidad de inmunoglobulinas detectados mediante la presente invención pueden utilizarse a modo de indicadores de cambios en la eliminación renal únicamente, especialmente en el caso de que no se observen cambios de la proporción $\kappa:\lambda$.

20 **[0032]** Entre los ensayos utilizados se incluyen ELISA, nefelometría, turbidimetría y citometría de flujo. Sin embargo, la invención no se encuentra limitada a dichos ensayos.

[0033] La invención en su forma más amplia se define en la reivindicación 1:

25 1. Método de detección o seguimiento de una enfermedad de las células plasmáticas, que comprende detectar en una muestra la proporción entre las cantidades relativas de inmunoglobulinas, que presenta:

(i) una clase de cadena pesada unida a cadenas ligeras λ , e

(ii) inmunoglobulinas que presentan la misma clase de cadena pesada, aunque unida a cadenas ligeras κ , comprendiendo el método la detección cuantitativa de dichas inmunoglobulinas mediante un ensayo de inmunosorción que comprende:

30 (i) la unión de dichas inmunoglobulinas a un anticuerpo de unión específico para la inmunoglobulina inmovilizada sobre un sustrato o unido a una perla,
 (ii) el lavado de las inmunoglobulinas no unidas, y
 35 (iii) la utilización de un anticuerpo de detección marcado que detecta las inmunoglobulinas que quedan unidas a dicho anticuerpo de unión, en el que la enfermedad maligna de las células plasmáticas se selecciona de entre: mieloma múltiple, amiloidosis AL, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenström, linfomas no de Hodgkin de células B, leucemia linfocítica crónica de las células B o MGUS (gammapatía monoclonal de significado indeterminado).

40 **[0034]** Se definen las realizaciones preferentes en las reivindicaciones 2 a 8.

[0035] El método mide cuantitativamente las cantidades de las dos inmunoglobulinas en la muestra.

45 **[0036]** Preferentemente la muestra se obtiene de un animal, tal como un mamífero, preferentemente un ser humano. Preferentemente la muestra se somete a ensayo in vitro.

[0037] La clase detectada puede seleccionarse de entre IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. Los anticuerpos también pueden ser específicos de subclase.

50 **[0038]** En un aspecto de la invención, se encuentran unidas dos partes diferentes de la inmunoglobulina que debe detectarse mediante los anticuerpos utilizados en el ensayo. Un anticuerpo se une a una parte de la cadena pesada responsable de la determinación de la clase de cadena pesada. El segundo se une a una parte de la cadena ligera responsable de la identificación como cadena κ o λ .

55 **[0039]** Por lo tanto, preferentemente la proporción se determina utilizando:

(i) por lo menos un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para la clase de cadena pesada,

(ii) un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para cadenas ligeras λ , e

(iii) un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para las cadenas ligeras κ .

60 **[0040]** La presencia de los anticuerpos específicos unidos a dichas inmunoglobulinas puede determinarse utilizando un segundo anticuerpo marcado. Por ejemplo, el anticuerpo de unión puede ser un anticuerpo de oveja. Las inmunoglobulinas detectadas pueden ser inmunoglobulinas humanas. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos de oveja unidos a la inmunoglobulina humana puede determinarse utilizando anticuerpos anti-anticuerpo de oveja, por

ejemplo de conejo o de caballo.

5 **[0041]** La utilización de dichos anticuerpos permite caracterizar los clones producidos por las enfermedades malignas de células plasmáticas, aunque no produzcan diferentes proporciones de cadenas ligeras libres. Además, en lugar de sólo medir las cadenas λ ó κ libres, este ensayo es más específico debido a que también identifica la clase de cadena pesada. Esto mejora la caracterización de las células plasmáticas monoclonales.

10 **[0042]** Los resultados producidos por los inventores indican que algunos tumores que no producen proporciones anormales de cadenas κ libres: cadenas λ libres pueden identificarse debido a la observación de la diferencia en la proporción de, por ejemplo, IgG- κ e IgG- λ ó IgA- κ ó IgA- λ .

15 **[0043]** La medición de la pareja específica cadena pesada-cadena ligera puede automatizarse. Además, la técnica es más sensible y permite la determinación cuantitativa de las cantidades de las diferentes inmunoglobulinas. Puede utilizarse tanto para ayudar al diagnóstico de la enfermedad como también para realizar un seguimiento de la respuesta de la enfermedad al tratamiento.

20 **[0044]** Los anticuerpos utilizados en el ensayo pueden ser específicos de subclase de cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IgA (IgA1 e IgA2) y anti-IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3 ó IgG4) son producidos por The Binding Site, Birmingham, Reino Unido. Esto proporciona información más detallada sobre la enfermedad que se está detectando.

25 **[0045]** Preferentemente se utilizan anticuerpos policlonales. Ello permite producir un ensayo mejorado para el seguimiento de diferentes inmunoglobulinas de, por ejemplo, la misma clase. Los anticuerpos policlonales permiten detectar cierta variabilidad entre las diferentes cadenas pesadas de la misma clase debido a que se preparan contra varias partes de la cadena pesada.

30 **[0046]** El método de la invención también puede utilizarse utilizando uno o más de los métodos siguientes, en el que la unión de los anticuerpos a las inmunoglobulinas en la muestra se determina mediante la utilización de un nefelómetro, un turbidímetro, citometría de flujo, ELISA o perlas marcadas fluorescentemente, tales como las perlas LuminexTM. Alternativamente puede producirse un ensayo de micromatrices utilizando los anticuerpos.

35 **[0047]** Preferentemente la proporción se determina mediante inmunoensayo, más preferentemente mediante un ensayo de inmunosorción tal como el ELISA (ensayo de inmunosorción ligada a enzima). Los ensayos de tipo ELISA per se son bien conocidos de la técnica. Utilizan anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, para detectar grupos sanguíneos, marcadores de superficie celular, fármacos y toxinas. En el caso de la presente invención, este tipo de ensayo ha sido utilizado para el método de la invención.

40 **[0048]** Los inventores han encontrado que resulta posible producir ensayos ELISA por lo menos tan sensibles como la electroforesis de proteínas séricas y, por lo menos en algunos casos, más sensibles que la utilización de la electroforesis de inmunofijación (IFE), FREEL-ITETM (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) o la obtención de la concentración total de una clase de cadena pesada mediante nefelometría.

45 **[0049]** El ensayo ELISA utiliza anticuerpos para detectar antígenos específicos. Puede marcarse uno o más de los anticuerpos utilizados en el ensayo con un enzima capaz de convertir un sustrato en un analito detectable. Entre dichos enzimas se incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina u otros enzimas conocidos de la técnica. Alternativamente pueden utilizarse otras etiquetas o marcajes detectables en lugar, o conjuntamente con los enzimas. Entre ellos se incluyen los isótopos radioactivos, un amplio abanico de marcajes de color y fluorescentes conocidos de la técnica, incluyendo fluoresceína, Alexa fluor, verde Oregon, BODIPY, rojo rodamina, azul Cascade, azul Marina, azul Pacific, amarillo Cascade, dorado; y conjugados tales como biotina (disponible de, por ejemplo, Invitrogen Ltd., Reino Unido). También pueden utilizarse soluciones de pigmento, soluciones metálicas o látex de color. Puede utilizarse uno o más de dichos marcajes en los ensayos ELISA según las diversas invenciones indicadas en la presente memoria, o alternativamente, en los otros ensayos, anticuerpos marcados o kits indicados en la presente memoria.

55 **[0050]** La propia construcción de ensayos de tipo ELISA es bien conocida de la técnica. Por ejemplo, un "anticuerpo de unión" específico para la inmunoglobulina se inmoviliza sobre un sustrato. En este caso, la inmunoglobulina comprende una cadena pesada de una clase, o subclase, particular unida a una cadena ligera λ o a una cadena ligera κ . El "anticuerpo de unión" puede inmovilizarse sobre el sustrato mediante métodos que son bien conocidos de la técnica. Las inmunoglobulinas en la muestra se unen al "anticuerpo de unión", que une la inmunoglobulina al sustrato a través del "anticuerpo de unión".

60

[0051] En ensayos ELISA puede determinarse la presencia de inmunoglobulinas unidas mediante la utilización de un "anticuerpo de detección" marcado específico de una parte de la inmunoglobulina de interés diferente de la del

anticuerpo de unión.

5 **[0052]** Preferentemente se utiliza la citometría de flujo para detectar la unión de las inmunoglobulinas de interés y para medir las proporciones. Esta técnica es bien conocida de la técnica para, por ejemplo, la separación celular. Sin embargo, también puede utilizarse para detectar partículas marcadas, tales como perlas, y para medir su tamaño. Numerosos libros de texto describen la citometría de flujo, tales como Practical Flow Cytometry, 3a edición, 1994, H. Shapiro, Alan R. Liss, New York, y Flow Cytometry, First Principles (2a edición), 2001, A.L. Given, Wiley Liss.

10 **[0053]** Uno de los anticuerpos de unión, tal como el anticuerpo específico para la clase de cadena pesada, se une a una perla, tal como una perla de poliestireno o de látex. Las perlas se mezclan con la muestra y el segundo anticuerpo de detección, tal como un anticuerpo específico para las cadenas ligeras λ . El anticuerpo de detección preferentemente se marca con un marcaje detectable, que se une a la inmunoglobulina que debe detectarse en la muestra. Esto resulta en una perla marcada en el caso de que se encuentre presente la inmunoglobulina que debe someterse a ensayo.

15 **[0054]** De esta manera pueden detectarse mediante citometría de flujo las perlas marcadas. Pueden utilizarse diferentes marcajes, tales como diferentes marcajes fluorescentes, por ejemplo los anticuerpos anti- λ y anti- κ . Esto permite determinar simultáneamente la cantidad de cada tipo de inmunoglobulina unida y la rápida identificación de la proporción κ/λ para una clase de cadena pesada dada.

20 **[0055]** Alternativamente, o adicionalmente, pueden utilizarse perlas de diferentes tamaños para diferentes anticuerpos, por ejemplo para diferentes anticuerpos específicos de clase. La citometría de flujo puede distinguir entre diferentes tamaños de perla y por lo tanto puede determinar rápidamente la cantidad de cada clase de cada pesada en una muestra.

25 **[0056]** La citometría de flujo permite la rápida identificación de las proporciones κ/λ para una clase o subclase dada de cadena pesada. Esto también reduce la necesidad de realización de ensayos de inmunofijación.

30 **[0057]** Un método alternativo utiliza los anticuerpos unidos a, por ejemplo, perlas marcadas fluorescentemente tales como las perlas Luminex™ disponibles comercialmente. Se utilizan diferentes perlas con diferentes anticuerpos. Se marcan diferentes perlas con diferentes mezclas de fluoróforos, permitiendo de esta manera determinar la proporción λ/κ para una clase o subclase particular de cadena pesada a partir de la longitud de onda fluorescente. Las perlas Luminex se encuentran disponibles de Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos.

35 **[0058]** Las proteínas monoclonales en una muestra pueden caracterizarse adicionalmente a partir de la cantidad de cadenas ligeras λ ó κ libres en la muestra. Esto preferentemente se lleva a cabo utilizando anticuerpos específicos para cadenas ligeras λ ó κ libres, tales como las comercializadas bajo la marca comercial FREELITE por The Binding Site Ltd., Birmingham, Reino Unido.

40 **[0059]** En efecto, los fragmentos de anticuerpo utilizados en la invención también pueden ser fragmentos Fab o $F(ab')_2$.

45 **[0060]** Preferentemente, el anticuerpo o fragmento es un anticuerpo policlonal. Los anticuerpos policlonales permiten generar una pluralidad de anticuerpos diferentes contra diferentes epítomos para la combinación específica de cadena pesada-cadena ligera. Ello permite ligeras variaciones entre las diferentes inmunoglobulinas, pero que de todas maneras comprenden la misma combinación de cadena pesada-cadena ligera.

50 **[0061]** Los anticuerpos policlonales utilizados en los diversos aspectos de la invención pueden ser producidos mediante el método mostrado en la patente WO n° 97/17372. Ello permite la producción de anticuerpos policlonales altamente específicos.

55 **[0062]** Los anticuerpos o fragmentos pueden inmovilizarse sobre un sustrato mediante técnicas bien conocidas de la técnica. El sustrato puede ser, por ejemplo, una micromatriz o una placa de microtitulación. Alternativamente, el sustrato puede ser una perla de poliestireno y/o de látex. Esto permite utilizar los anticuerpos en varios ensayos diferentes que son bien conocidos de la técnica, por ejemplo tal como se muestra en la patente EP n° 0291194 o en ensayos ELISA. El anticuerpo también puede marcarse, por ejemplo con un marcaje indicado anteriormente para ELISA. Puede ser cualquier entidad la presencia de la cual pueda detectarse con facilidad. El marcaje puede ser un marcaje visible, es decir una entidad que, en su estado natural, sea fácilmente visible para el ojo desnudo o con ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, tal como luz UV, para producir fluorescencia. Por ejemplo, pueden utilizarse partículas coloreadas muy pequeñas, tales como soluciones de pigmento, soluciones metálicas (por ejemplo de oro) o partículas de látex de color.

60 **[0063]** Pueden utilizarse marcajes indirectos tales como enzimas (por ejemplo fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante), así como los marcajes radioactivos tales como ^{35}S .

[0064] Son bien conocidos de la técnica los ensayos que utilizan anticuerpos.

[0065] Preferentemente, los ensayos de inmunosorción, tales como los ensayos ELISA según los diversos aspectos de la invención comprenden un anticuerpo específico para las cadenas ligeras λ y un segundo anticuerpo específico para las cadenas ligeras κ , más un anticuerpo específico para la clase de cadena pesada. Dichos ensayos pueden utilizar, por ejemplo, una capa cautiva específica para la clase de cadena pesada, tal como IgG o IgA, más anticuerpos de detección (anti- λ y anti- κ). Alternativamente, puede utilizarse anti-cadena ligera (por ejemplo anti- κ) como capa cautiva con un anticuerpo específico de clase (por ejemplo anti-IgA).

[0066] Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se inmoviliza sobre un soporte sólido mediante técnicas bien conocidas de la técnica. El método puede proporcionar adicionalmente las etapas de proporcionar un reactivo de marcaje capaz de unirse no específicamente a la molécula de inmunoglobulina que debe someterse a ensayo, y de detectar la presencia de la inmunoglobulina marcada unida al anticuerpo o fragmento. El reactivo de marcaje puede ser él mismo otro anticuerpo dirigido contra una parte diferente de la molécula de inmunoglobulina, marcando el anticuerpo separado con un marcaje por ejemplo del tipo comentado anteriormente. La presencia del marcaje permite la producción de, por ejemplo, un ensayo sándwich y la identificación de la unión de la inmunoglobulina marcada a la molécula que debe someterse a ensayo y su unión al anticuerpo específico según la invención.

[0067] Los métodos detectan y cuantifican la presencia de una segunda molécula de inmunoglobulina que presenta la misma clase específica de cadena pesada que la primera molécula de inmunoglobulina, aunque se mide un tipo diferente de cadena ligera. Ello permite determinar la proporción entre las cantidades de la primera molécula de inmunoglobulina y la segunda molécula de inmunoglobulina, por ejemplo para identificar la proporción entre IgG λ e IgG κ . Lo anterior permite realizar un seguimiento del avance de una enfermedad o, alternativamente, del tratamiento de una enfermedad.

[0068] La invención comprende además un método de diagnóstico de una enfermedad maligna de las células plasmáticas en un paciente, que comprende la utilización de un método según la invención. Se somete a ensayo sangre, orina o suero.

[0069] La enfermedad maligna de las células plasmáticas se selecciona de entre: mieloma múltiple, amiloidosis AL, plasmacitoma solitario, plasmacitoma extramedular, plasmacitomas solitarios múltiples, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma no de Hodgkin de las células B, leucemia linfocítica crónica de las células B o MGUS.

[0070] A continuación, se describe la invención únicamente a título de ejemplo, haciendo referencia a las figuras siguientes:

La **figura 1** muestra un diagrama esquemático de un anticuerpo.

La **figura 2** muestra el desarrollo del linaje de células B y enfermedades asociadas. MGUS se refiere a gammopatía monoclonal de significación indeterminada.

La **figura 3** muestra un gráfico de κ y uno de λ de las cadenas ligeras libres de suero, que muestra muestras que serían identificadas erróneamente como negativas utilizando la electroforesis de proteínas séricas (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE); LCMM se refiere a mieloma múltiple de cadenas ligeras; NSMM se refiere a mieloma múltiple no secretorio; IMM se refiere a mieloma múltiple de inmunoglobulinas intactas (Drayson M., Tang L.X., Drew R., Mead G.P., Carr-Smith H., Bradwell A.R. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood 97:2900-2902, 2001; Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Harvey T.C., Drayson M.T. Serum test assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet 361:489-491, 2003; Mead G.P., Carr-Smith H.D., Drayson M.T., Morgan G.J., Child J.A., Bradwell, A.R. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Haematol. 126:348-354, 2004; Lachmann H.J., Gallimore R., Gillmore J.D., Carr-Smith H.D., Bradwell A.R., Pepys M.B., Hawkins P.N. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. Brit. J. Haematol. 1223:78-84, 2003).

La **figura 4** muestra la frecuencia de concentraciones anormales de cadenas libres de suero en pacientes con diferentes tipos de mieloma múltiple y macroglobulinemia de Waldenström (WM). LCMM se refiere a mieloma múltiple de cadenas ligeras; NSMM se refiere al mieloma múltiple no secretorio (Drayson M., Tang L.X., Drew R., Mead G.P., Carr-Smith, H., Bradwell A.R. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. Blood 97:2900-2902, 2001; Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Harvey T.C., Drayson M.T. Serum test assessment of patients with Bence Jones myeloma. Lancet 361:489-491, 2003; Mead G.P., Carr-Smith H.D., Drayson M.T., Morgan G.J., Child

J.A., Bradwell A.R. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. Brit. J. Haematol. 126:348-354, 2004).

5 La **figura 5** muestra curvas estándares para (a) IgA1-κ y (b) IgA1λ, para ensayos ELISA producidos mediante el método descrito a continuación:

10 Las **figuras 6 a 15** muestran la proporción κ/λ de IgA medida mediante ELISA, tal como se describe posteriormente (-▲-); proporciones κ/λ determinadas a partir de las cadenas ligeras libres en la muestra, no unidas a cadenas pesadas (-◆-), y el total de IgA en la muestra (-●-). También se presentan las puntuaciones de la SPE (electroforesis de proteínas séricas) para cada paciente para cada día en el que se obtuvieron muestras.

Figura 6	paciente nº 7148
Figura 7	paciente nº 7273
Figura 8	paciente nº 7283
15 Figura 9	paciente nº 7255
Figura 10	paciente nº 7401
Figura 11	paciente nº 70236
Figura 12	paciente nº 70338
Figura 13	paciente nº 70382
20 Figura 14	paciente nº 70392
Figura 15	paciente nº 70052

25 La **figura 16** muestra la inmunolectroforesis (IEP) de anti-IgG-κ (A). La fotografía indica que el anticuerpo reacciona bien con IgG-κ en suero y con IgG-κ puro. También presenta un resultado negativo contra IgG-λ e IgM-κ e IgA-κ. Todos los antisueros de control reaccionaron positivamente con las proteínas diana.

Desarrollo y análisis de un sistema de ensayo ELISA de κ/λ de IgA para el seguimiento del mieloma múltiple

30 Introducción

[0071] El mieloma múltiple (MM) es un trastorno maligno de las células plasmáticas que explica aproximadamente 10% de las malignidades hematológicas. La enfermedad se caracteriza por una proliferación clonal de las células plasmáticas que produce una inmunoglobulina monoclonal intacta y/o cadenas ligeras libres (FLC). La inmunoglobulina monoclonal se observa en el suero y/o orina de todos los pacientes excepto en 1%-2% con mieloma no secretorio. Algunos pacientes muestran una frecuencia incrementada de cadenas ligeras libres monoclonales. Además de utilizarse para ayudar a la identificación de las gammopatías monoclonales tales como MM, la inmunoglobulina monoclonal puede detectarse y utilizarse para el seguimiento de la enfermedad. En la actualidad se utilizan diversos métodos para identificar y caracterizar las inmunoglobulinas monoclonales. La electroforesis de proteínas séricas (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE) son dos métodos de este tipo utilizados. La SPE permite el análisis cuantitativo de inmunoglobulinas monoclonales, mientras que la IFE es un método cualitativo. Más recientemente se ha desarrollado FREELITE™, que permite el análisis nefelométrico de las cadenas ligeras libres. Este sistema de ensayo permite el ensayo rápido de muestras en comparación con SPE e IFE y además es cuantitativo, permitiendo calcular las proporciones de FLC. En la actualidad no existe ningún sistema de ensayo comparable para investigar las cadenas ligeras monoclonales unidas a cadenas pesadas en el MM. Este informe describe un ensayo preliminar desarrollado para evaluar la capacidad de detectar las proporciones anormales de cadenas ligeras monoclonales unidas a cadenas pesadas. El ensayo descrito es un sistema de ensayo ELISA para la detección de IgA-κ e IgA-λ, permitiendo la cuantificación de las proporciones de IgA κ/λ.

50 [0072] FREELITE es una marca comercial de The Binding Site (TBS) Ltd., Reino Unido.

Métodos

55 *Recubrimiento de placas de 96 pocillos con anticuerpo de captura*

[0073] Se diluyeron anticuerpos de oveja anti-IgA humana (código de producto de TBS nº AU010, purificado mediante afinidad) hasta una concentración de 5 µg/ml en 1xPBS (pH 7,2). Se recubrieron placas de microtitulación (High bind, Greiner Bio-one) mediante la adición de 100 µl del antisuero diluido en cada pocillo. Se introdujeron las placas en una atmósfera humidificada a 4°C durante 18 horas. Se extrajo el contenido de los pocillos y se añadieron 60 110 µl/pocillo de Stabilcoat al 50% [v/v] (estabilizador biomolecular/agente de bloqueo) durante 30 minutos para bloquear las regiones no recubiertas de los pocillos. Tras la eliminación de la solución de bloqueo, se introdujeron las placas en un secador de vacío durante 1 hora. Se sellaron las placas en bolsas de aluminio que contenían desecante y se almacenaron a 4°C.

Determinación de la dilución de conjugado

[0074] Se diluyeron anticuerpos de oveja anti-kappa humana-peroxidasa de rábano picante (HRP), purificados mediante afinidad, o anticuerpos de oveja anti-lambda humana-HRP purificados mediante afinidad, en diversas diluciones con diluyente de conjugado (NaCl 130 nM, estabilizador de conjugado HRP al 10% [v/v], Proclin 300 (conservante) al 0,045% [v/v]). Se incubaron dos placas recubiertas de anticuerpos de oveja anti-IgA humana con controles de IgA de concentración conocida (control de RID, NL de IgA: 3,963 mg/ml, control de RID, ML de IgA: 0,05 mg/ml y control de RID, UL de IgA: 0,18 mg/ml), diluidos 1/50 en diluyente de muestra (1xPBS más Stabilguard (estabilizador biomolecular/agente de bloqueo) al 2% [v/v], albúmina de suero bovino al 1% [p/v] (BSA), Tween-20 al 0,05% [v/v] y Kathon (biocida) al 0,02% [v/v], pH 7,2) durante 30 minutos. Se lavaron las placas 3 veces con tampón de lavado (16x PBS más Tween-20 al 1% [v/v] y Kathon al 0,02% [v/v], pH 7,2). Se incubó una placa con 100 µl/pocillo de las diversas diluciones de anticuerpo anti-kappa humana-HRP y la segunda placa con 100 µl/pocillo de conjugado de anticuerpo anti-lambda humana-HRP a diversas diluciones durante 30 minutos. Las placas se lavaron nuevamente 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl/pocillo de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) durante 30 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 100 µl/pocillo de ácido fosfórico 3 M. Se midieron las absorbancias a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA Biotek. Se seleccionó una dilución de conjugado de 1/8.000 para los ensayos siguientes debido a que proporcionaba el intervalo de absorbancias más amplio para los tres controles del ensayo de IgA.

Curvas estándares de IgA-κ e IgA-λ

[0075] Se utilizaron los sueros IgA-κ e IgA-λ para evaluar la sensibilidad del ensayo ELISA de IgA en la determinación de las concentraciones de IgA-κ e IgA-λ. Se diluyeron en serie sueros purificados de IgA-κ humana (5,14 mg/ml) e IgA-λ humana (1,85 mg/ml) utilizando diluciones por triplicado para permitir la determinación del intervalo de concentraciones detectables. El método de ensayo ELISA utilizado fue el indicado anteriormente. Brevemente, se añadieron sueros de IgA-κ o de IgA-λ de diversas diluciones, o controles de IgA (tales como los indicados anteriormente) a los pocillos en una cantidad de 100 µl/pocillo por duplicado. Tras el lavado, se añadió conjugado de anticuerpo anti-kappa humana-HRP (para la placa de suero con IgA-κ) o conjugado de anticuerpo anti-lambda humana-HRP (para la placa de suero con IgA-λ), se incubaron las placas y se lavaron, seguido de la adición de sustrato TMB y ácido fosfórico 3 M.

Efecto de la competición sobre las curvas estándares de IgA-κ y de IgA-λ

[0076] Con el fin de evaluar el efecto de la presencia de IgA-λ sobre el ensayo de IgA-κ y viceversa, se llevó a cabo una dilución en serie de suero con IgA-λ ó con IgA-κ en diferentes columnas de una placa recubierta con anti-IgA, mientras que se diluyeron en serie suero con IgA-κ ó con IgA-λ, respectivamente, en diferentes filas. Se llevó a cabo el método ELISA tal como se ha indicado anteriormente.

Determinación de las proporciones κ/λ de muestras de suero procedentes de pacientes adultos

[0077] Se determinaron separadamente los valores de IgA-κ e IgA-λ, a partir de los cuales se calcularon las proporciones κ/λ. Se incubaron dos placas recubiertas de anticuerpos de oveja anti-IgA humana con 100 µl/pocillo de los controles de IgA indicados anteriormente (diluidos 1/800 en diluyente para muestras), sueros de IgA-κ o IgA-λ de diversas diluciones, y muestras de suero de adultos sanos diluidas 1/4.000 en diluyente para muestras durante 30 minutos. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl/pocillo de conjugado de anticuerpo anti-kappa humana-HRP o conjugado anti-lambda humana-HRP a 1/8.000 durante 30 minutos. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl/pocillo de sustrato TMB durante 3 minutos. Se terminó la reacción mediante la adición de 100 µl/pocillo de ácido fosfórico 3 M. Se midieron las absorbancias a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA Biotek. Se analizaron los resultados utilizando software KCR.

Determinación de las proporciones κ/λ de muestras de suero consecutivas de pacientes con mieloma

[0078] Se llevaron a cabo los ensayos de IgA-κ y de IgA-λ tal como se ha indicado anteriormente, con la adición de muestras de suero de paciente con mieloma diluidas 1/4.000 en diluyente para muestras.

Resultados y comentario*Curvas estándares de IgA-κ y de IgA-λ*

[0079] Se determinó que el intervalo lineal de detección de los ensayos era de 0,22 a 2,2 µg/ml para IgA-κ (figura 5a) y de 0,22 a 3,2 µg/ml para IgA-λ (figura 5b). Para confirmar el intervalo de concentraciones de las curvas estándares, también se llevaron a cabo diluciones en serie del control NL de RID IgA y se sometieron a ensayo. El intervalo de concentraciones detectables del ensayo concordaba con el obtenido para IgA-κ y para IgA-λ (datos no

mostrados). Se concluyó que las muestras de suero que debían someterse a ensayo requerirían una dilución 1/4.000 para encontrarse dentro del intervalo lineal de las curvas estandarizadas de IgA- κ y de IgA- λ .

Efecto de la competición sobre las curvas estándares de IgA- κ y de IgA- λ

5 **[0080]** El estudio de los efectos de la competición de IgA- λ sobre el ensayo de IgA- κ y viceversa demostró que IgA- λ provocaba interferencia con la curva estándar de IgA- κ (conduciendo a una reducción de la absorbancia) a concentraciones de IgA- λ de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ y superiores. IgA- κ provocó interferencia con la curva estándar de IgA- λ a concentraciones de 5,35 $\mu\text{g/ml}$ y superiores. Estos resultados indican que el sistema requiere una optimización
10 adicional, pero que todos los ensayos de pacientes informados en la presente memoria se llevaron a cabo a diluciones apropiadas para garantizar que no se producía interferencia debido a la competición.

Determinación de las proporciones κ/λ de muestras de suero procedentes de adultos sanos

15 **[0081]** Se sometieron a ensayo por duplicado 18 muestras de suero procedentes de adultos sanos, obtenidas del Blood Transfusion Services, para determinar las proporciones κ/λ de IgA normales en el ensayo ELISA. Los resultados proporcionaron un intervalo normal de 0,6 a 1,2. Estos valores eran similares a los valores en la literatura, que indicaban proporciones κ/λ de IgA de entre 0,8 y 1,5 según el ELISA (Haraldsson *et al.*, 1991) y de 1,1 a 1,8 según la nefelometría (Chui *et al.*, 1991).

Determinación de las proporciones κ/λ de muestras consecutivas de suero de pacientes con mieloma

20 **[0082]** Se obtuvieron 99 muestras de suero de pacientes con mieloma del Dept. Clinical Immunology, University of Birmingham. Estas muestras de suero consistían de 10 conjuntos de muestras de pacientes, en la que se seguía el estado de enfermedad desde la presentación, durante el tratamiento y, en algunos casos, hasta la recaída. Para la mayoría de muestras, se habían obtenido previamente los resultados de SPE, las proporciones κ/λ de las cadenas ligeras libres (FLC) mediante FREELITE™ (intervalo normal: 0,26 a 1,65) y los valores totales de IgA mediante nefelometría (intervalo normal: 0,7 a 3,6 g/l). Se obtuvieron proporciones κ/λ de IgA en el presente estudio mediante ensayos ELISA de IgA- κ y de IgA- λ tal como se describe en la sección de métodos. Los resultados obtenidos, y las comparaciones con los demás métodos utilizados para el seguimiento de la enfermedad, se comentan posteriormente para cada paciente. En algunos casos, en el caso de discrepancias entre resultados con diferentes métodos, también se produjeron geles de IFE (Sebia) para la clarificación del estado de la enfermedad.

Paciente número 7148

35 **[0083]** Las proporciones κ/λ de IgA producidas concordaban con la línea de tendencia observada para las proporciones κ/λ de las FLCs (figura 6). La mayoría de los valores de IgA total también se correlacionaban, excepto de la muestra obtenida 36 días después de la presentación, para la que el valor de IgA total se encontraba dentro del intervalo normal pero en la que las proporciones κ/λ de IgA y de las FLCs se encontraban elevadas, con una puntuación de SPE de +/- . La IFE de esta muestra indicaba la presencia de una banda de IgA- κ . Los resultados de este paciente indican que los ensayos ELISA de κ/λ de IgA pueden presentar una sensibilidad similar a FREELITE™ y a IFE, y pueden presentar una sensibilidad incrementada con respecto a la SPE y los valores de IgA total obtenidos mediante nefelometría.

Paciente número 7273

45 **[0084]** Las proporciones κ/λ de IgA calculadas concuerdan con las líneas de tendencia observadas para las proporciones de las FLCs y con los valores totales de IgA (figura 7). Las puntuaciones de la SPE se corresponden con la mayoría de valores obtenidos mediante los demás métodos, excepto para la muestra obtenida 501 días después de la presentación. Para esta muestra, la puntuación de SPE es +/- pero los valores se encuentran dentro de los intervalos normales para todos los demás métodos. La IFE de esta muestra indica la ausencia de bandas monoclonales. Estos resultados muestran que los ensayos ELISA de κ/λ de IgA podrían resultar útiles al obtener puntuaciones de SPE situadas en el límite.

Paciente número 7283

55 **[0085]** La línea de tendencia de las proporciones κ/λ de IgA obtenidas para las muestras de este paciente se corresponde con la observada para las proporciones κ/λ de las FLCs y concuerda con la mayoría de las puntuaciones de la SPE (figura 8). El valor de IgA total se encuentra suprimido para la muestra obtenida 23 días después de la presentación, aunque todos los demás resultados se encuentran elevados. Para la muestra obtenida 49 días después de la presentación, se encontraba suprimido el valor de IgA total, la puntuación de la SPE era negativa, pero la proporción κ/λ de IgA era anormal (la proporción κ/λ de las FLCs no era conocida para esta muestra). La IFE de esta muestra indicaba la presencia de una banda de IgA- κ , mostrando que la proporción κ/λ presentaba una sensibilidad similar a la IFE.

Paciente número 7255

5 **[0086]** Las proporciones κ/λ de IgA concuerdan con la mayoría, aunque no todos, los datos obtenidos utilizando los demás métodos de detección (figura 9). No se registraron puntuaciones de SPE para estas muestras. Las proporciones κ/λ de IgA eran superiores al intervalo normal para las muestras obtenidas 1.493, 1.576 y 2.255 días después de la presentación. Sin embargo, los valores de IgA total se encontraban dentro del intervalo normal para las primeras dos de dichas muestras y las proporciones κ/λ de las FLCs se encontraban dentro del intervalo normal para la totalidad de las tres muestras. La IFE confirmó la presencia de una banda de IgA- κ monoclonal en la totalidad de las tres muestras. Por lo tanto, los ensayos ELISA de κ/λ de IgA podrían mostrar una mayor sensibilidad que FREELITE™ para algunas muestras.

Paciente número 7401

15 **[0087]** La línea de tendencia observada para las proporciones κ/λ de IgA concuerda con los resultados obtenidos previamente para las proporciones κ/λ de las FLCs y con los valores de IgA total (figura 10). Sin embargo, las puntuaciones de la SPE fueron negativas para todas las muestras. La IFE confirmó la presencia de una banda de IgA- λ en la presentación inicial.

Paciente número 70236

20 **[0088]** Las líneas de tendencia de las proporciones κ/λ de IgA y de las FLCs eran similares (figura 11). Sin embargo, en dos muestras (165 y 263 días después de la presentación) las proporciones κ/λ de las FLCs y los valores de IgA se encontraban dentro del intervalo normal, las puntuaciones de la SPE eran negativas, pero las proporciones κ/λ de IgA eran anormales. La IFE confirmó la presencia de una banda de IgA- λ . Estos resultados sugieren que, en algunos casos, los ensayos ELISA de κ/λ de IgA resultan más sensibles que los valores de IgA total de FREELITE™ obtenidos mediante nefelometría y SPE, y de igual sensibilidad a IFE.

Paciente número 70338

30 **[0089]** Todos los métodos utilizados para investigar la cantidad de inmunoglobulina monoclonal presente en las muestras proporcionaron resultados similares. Las proporciones κ/λ de IgA producidas en el presente estudio concuerdan con estos resultados (figura 12).

Paciente número 70382

35 **[0090]** Todos los resultados se correlacionan entre sí. Debe subrayarse la proporción de las FLCs en el momento de la presentación. Ésta se encontraba apenas en el exterior del intervalo normal, con un valor de 0,24, mientras que todos los demás métodos, incluyendo los ensayos ELISA de κ/λ de IgA, indicaron niveles anormales mucho mayores (figura 13).

Paciente número 70392

45 **[0091]** Las líneas de tendencia de las proporciones κ/λ de IgA y de las FLCs eran similares (figura 14). Sin embargo, las proporciones κ/λ de las FLCs presentaban valores ligeramente superiores a los niveles normales en el momento de la presentación, mientras que las proporciones κ/λ de IgA era mucho más elevados y concuerdan con todos los demás resultados.

Paciente número 70052

50 **[0092]** Las proporciones κ/λ de IgA eran anormales y concordaban con los valores de IgA total. Sin embargo, las puntuaciones de la SPE no eran concluyentes, y sugieren resultados negativos para todas las muestras. Además, todas las proporciones κ/λ de las FLCs se encontraban dentro del intervalo normal (figura 15). La IFE para las primeras cuatro muestras confirmó la presencia de una banda de IgA- λ en estas muestras. Estos resultados sugieren que este paciente podría no secretar cadenas ligeras libres y, por lo tanto, todos estos resultados son negativos con el ensayo FREELITE™. También sugieren que los ensayos ELISA de κ/λ de IgA serían una alternativa útil en el caso de que se presente un caso de este tipo.

60 **[0093]** En conclusión, para las muestras de paciente con mieloma sometidas a ensayo, se ha demostrado que los ensayos ELISA de κ/λ de IgA son tan sensibles como la IFE, y en algunos casos más sensibles que la utilización de SPE, FREELITE™ y la obtención de valores de IgA total mediante nefelometría. No se observaron casos en los que los ensayos ELISA de κ/λ de IgA fueran menos sensibles que los demás métodos. Debido a que la mayoría de los resultados obtenidos utilizando el sistema de ensayo actual de tipo ELISA concuerdan con los del sistema de ensayo FREELITE™, estos sugieren que ambos métodos miden correctamente las proporciones κ/λ , permitiendo la

investigación de las inmunoglobulinas monoclonales características del mieloma múltiple.

5 **[0094]** A medida que continúe desarrollándose el campo del inmunodiagnóstico, se multiplicarán los esfuerzos que consideren el potencial de desarrollar sistemas multiplex de ensayo, que permitirán la caracterización simultánea de un gran número de analitos. Si se incrementa la viabilidad de la utilización de los sistemas de multiplexado dentro del entorno clínico en el futuro, podría resultar posible adaptar los ensayos ELISA de κ/λ de IgA descritos en la presente memoria para permitir la detección simultánea de IgA- κ y de IgA- λ en una muestra de ensayo. Esto podría ayudar en la tarea final de desarrollar un sistema múltiple de ensayo viable que permita la medición simultánea de diversas inmunoglobulinas monoclonales, para la utilización en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades tales como el mieloma múltiple.

Referencias

15 **[0095]**
Haraldsson A, Kock-Jansen MJ, Jaminon M, van Eck-Arts PB, de Boo T, Weemaes CM, Bakkeren JA. Determination of kappa and lambda light chains in serum immunoglobulins G, A and M. Ann Clin Biochem 1991; 28: 461-466

20 Chui SH, Lam CW, Lewis WH, Lai KN. Light-chain ratio of serum Iga1 in IgA nephropathy. J Clin Immunol 1991; 11 (4): 219-23

Anticuerpos de tipo anti-clase de cadena ligera

25 **[0096]**
Se produjeron anticuerpos policlonales contra IgG- κ utilizando el método sustancialmente tal como se sugiere en la patente WO n° 97/17372. Es decir, se utilizaron ovejas para producir el anticuerpo policlonal.

30 Se tolerizaron las ovejas el día 3 (es decir, tres días antes de la inmunización principal) con 10 mg de IgG- λ e IgA- κ .

35 Tres días después, el día 0, las ovejas recibieron la inmunización principal, con 50 μ g de IgG- κ . Las IgG- λ , IgA- κ e IgG- κ eran inmunoglobulinas humanas.

Además, el día 0, las ovejas recibieron anticuerpos anti- λ completa humana (100 μ g) y de oveja anti-IgA humana (100 μ g). El anticuerpo anti- λ completo se une a cadenas λ tanto unidas como libres.

40 El día 42, las ovejas recibieron un refuerzo de 10 μ g de IgG- κ . Además, recibieron una administración intravenosa de anti- λ completo humano de oveja (100 μ g) y de anti-IgA humana de oveja (100 μ g).

Finalmente, el día 49, se recogieron los anticuerpos mediante plasmaféresis.

45 **[0097]** Se purificaron los anticuerpos anti-IgG- κ mediante adsorción con IgM- κ e IgG- λ . Se eliminó el exceso de complejos inmunológicos mediante la adición de 3% p/v de polietilenglicol (6.000) y se eliminó el precipitado mediante centrifugación.

50 **[0098]** A continuación, se llevó a cabo cromatografía de afinidad positiva mediante un pase por una columna de IgG- κ que comprendía IgG- κ unido covalentemente a sefarosa 4B. Los anticuerpos anti-IgG- κ unidos seguidamente se eluyeron de la columna con tampón de alta concentración salina.

55 **[0099]** Dichos anticuerpos se dializaron frente a tampón fisiológico (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, con conservante) y se concentraron hasta 1 g/litro. Esta solución concentrada seguidamente se sometió a ensayo mediante inmunoelectroforesis (IEP) para su especificidad. Se muestran los resultados en la figura 16.

[0100] Se repitió la producción de anticuerpos de manera que se obtuvieron anticuerpos contra la unión entre las cadenas pesadas y ligeras de IgG, y después de IgA y de IgD. Se utilizaron estos anticuerpos para identificar y cuantificar las inmunoglobulinas intactas de mieloma.

60 **Anticuerpos anti-cadena pesada de IgG- κ**

[0101] Para los anticuerpos contra las cadenas pesadas de IgG- κ , se utilizaron nefelométricamente antiseros para producir una curva de calibración.

Conc (mg/L)	23,6187	47,2375	94,475	188,95	377,9	755,8
Valor (Bit)	519	1448	3028	5660	8809	12096

[0102] La forma de la curva de calibración correspondía a la esperada a partir de experimentos similares con Freelite.

5 [0103] A continuación, se sometieron a ensayo concentraciones conocidas de diferentes muestras de mieloma frente a la curva de calibración, con el fin de someter a ensayo la eficiencia de los anticuerpos mediante la comparación de la concentración conocida de la muestra con la proporcionada por el ensayo nefelométrico.

10 [0104] Los resultados obtenidos para la determinación de las concentraciones de IgG-κ correspondían a las determinadas mediante otros métodos.

Anticuerpos anti-cadenas pesadas de IgG-λ:

15 [0105] Para los anticuerpos contra las cadenas pesadas de IgG-λ, se utilizaron nefelométricamente antisueros para producir una curva de calibración.

Conc (mg/L)	23.6187	47.2375	94.475	188.95	377.9	755.8
Value (Bit)	300	914	1936	3105	4968	7996

20 [0106] Tal como se ha indicado anteriormente, la forma de la curva de calibración correspondía a la esperada en los experimentos anteriores que implicaban un ensayo nefelométrico.

[0107] La cantidad de anticuerpos no resultaba suficiente para realizar ensayos adicionales en ese momento. Sin embargo, la curva de calibración era similar a la que incluía anticuerpos anti-IgG-κ, esperándose resultados similares en el caso de realizar un ensayo frente a muestras de concentración conocida.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección o seguimiento de una enfermedad maligna de las células plasmáticas, que comprende detectar en una muestra de sangre, suero u orina la proporción entre las cantidades relativas de inmunoglobulinas que presentan:
- 10 (i) una clase de cadena pesada unida a cadenas ligeras λ , e
- (ii) inmunoglobulinas que presentan la misma clase de cadena pesada aunque unidas a cadenas ligeras κ , comprendiendo el método la detección cuantitativa de dichas inmunoglobulinas mediante un ensayo de inmunosorción que comprende:
- 15 (i) la unión de dichas inmunoglobulinas a un anticuerpo de unión específico para la inmunoglobulina inmovilizada sobre un sustrato o unido a una perla,
- (ii) el lavado de las inmunoglobulinas no unidas, y
- 20 (iii) la utilización de un anticuerpo de detección marcado que detecta las inmunoglobulinas que quedan unidas a dicho anticuerpo de unión, en el que la enfermedad maligna de las células plasmáticas se selecciona de entre: mieloma múltiple, amiloidosis AL, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia de Waldenström, linfomas no de Hodgkin de células B, leucemia linfocítica crónica de las células B o MGUS (gammapatía monoclonal de significado indeterminado).
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que la proporción se determina utilizando:
- (i) por lo menos un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para la clase de cadena pesada,
- 30 (ii) un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para cadenas ligeras λ , e
- (iii) un anticuerpo, o un fragmento del mismo, específico para las cadenas ligeras κ .
- 35 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo de unión, el anticuerpo de detección o el anticuerpo específico de la clase de cadena pesada, es específico de una subclase de cadena pesada.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proporción se determina utilizando ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) que comprenden los anticuerpos.
- 40 5. Método según la reivindicación 1, en el que la unión se determina mediante citometría de flujo o utilizando perlas marcadas fluorescentemente.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de detectar la presencia y/o cantidad de cadenas ligeras libres λ y/o κ en la muestra de sangre, orina o suero.
- 45 7. Método según la reivindicación 6, en el que las cadenas ligeras libres λ y/o κ se detectan con anticuerpos específicos para las cadenas ligeras libres λ y/o κ .
- 50 8. Método de ayuda al diagnóstico de una enfermedad maligna de las células plasmáticas, que comprende la utilización de un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para someter a ensayo una muestra de sangre, orina o suero.

FIGURA 1

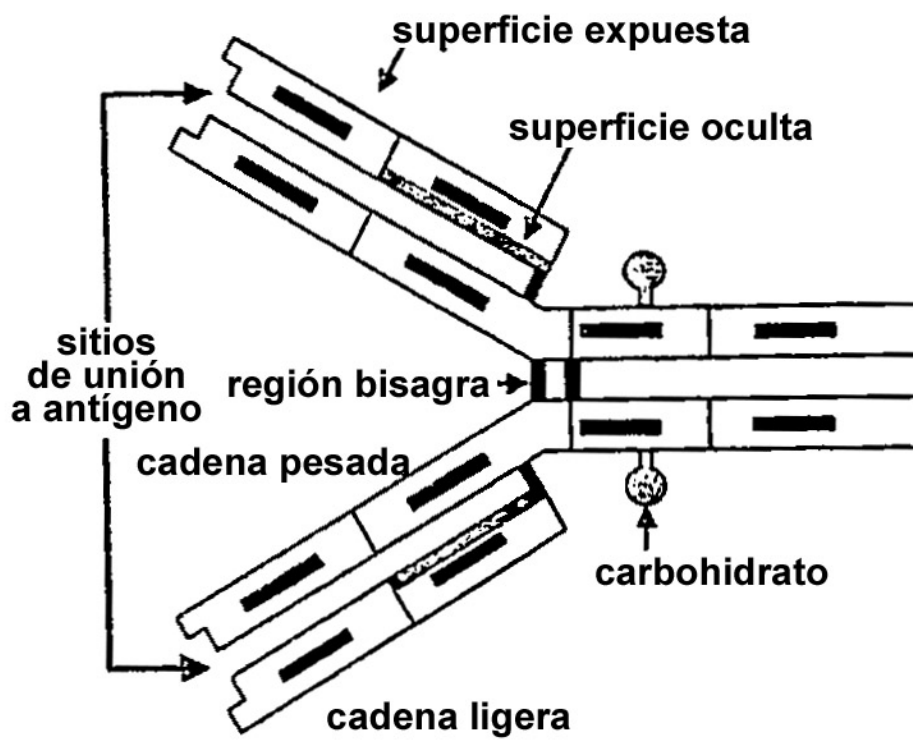


FIGURA 2

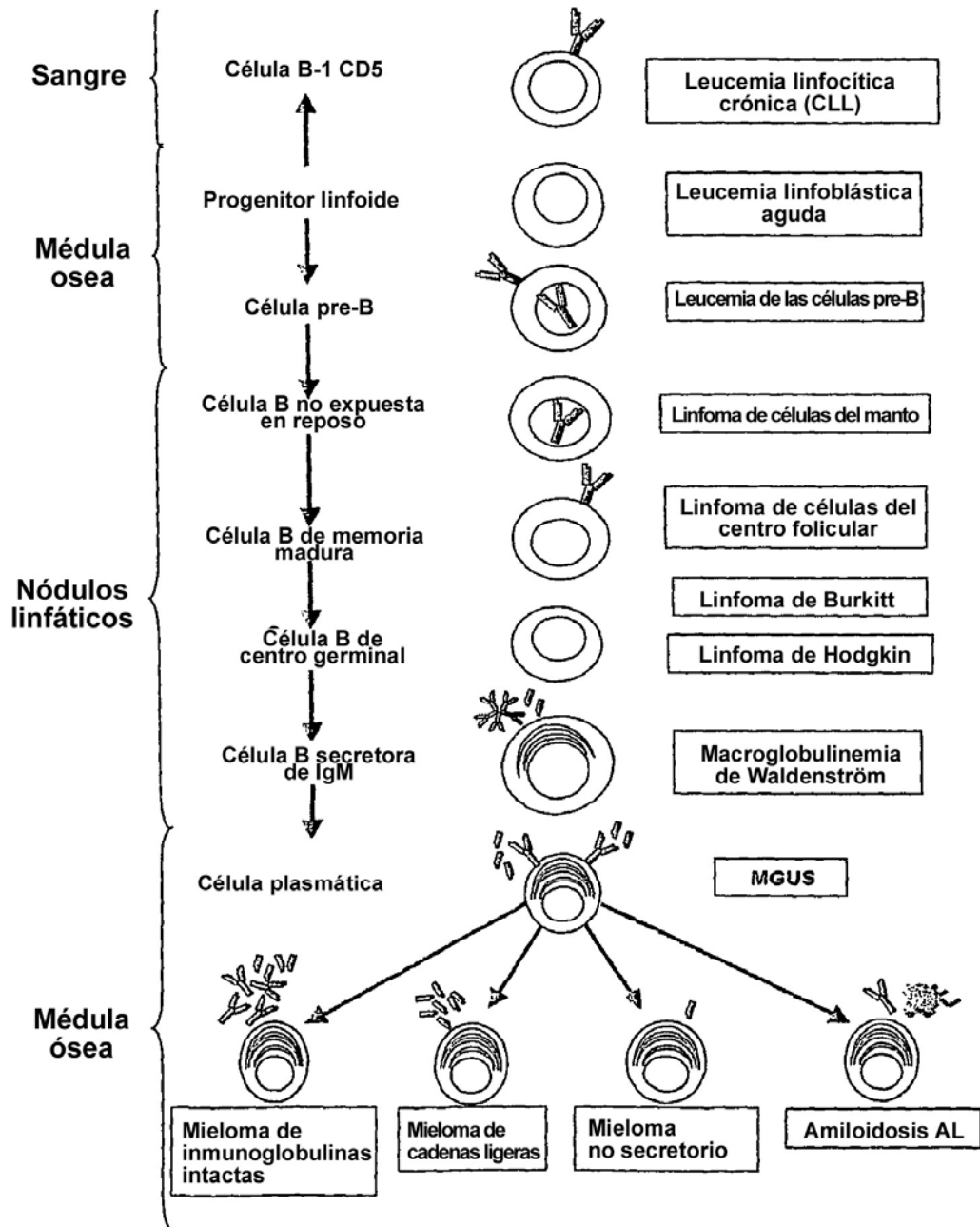


FIGURA 3

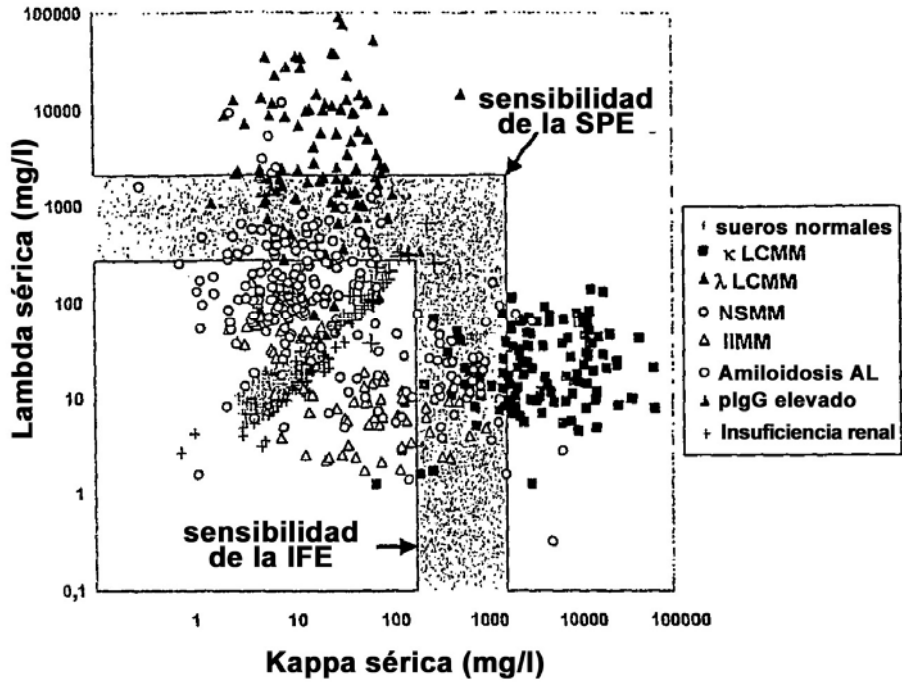


FIGURA 4

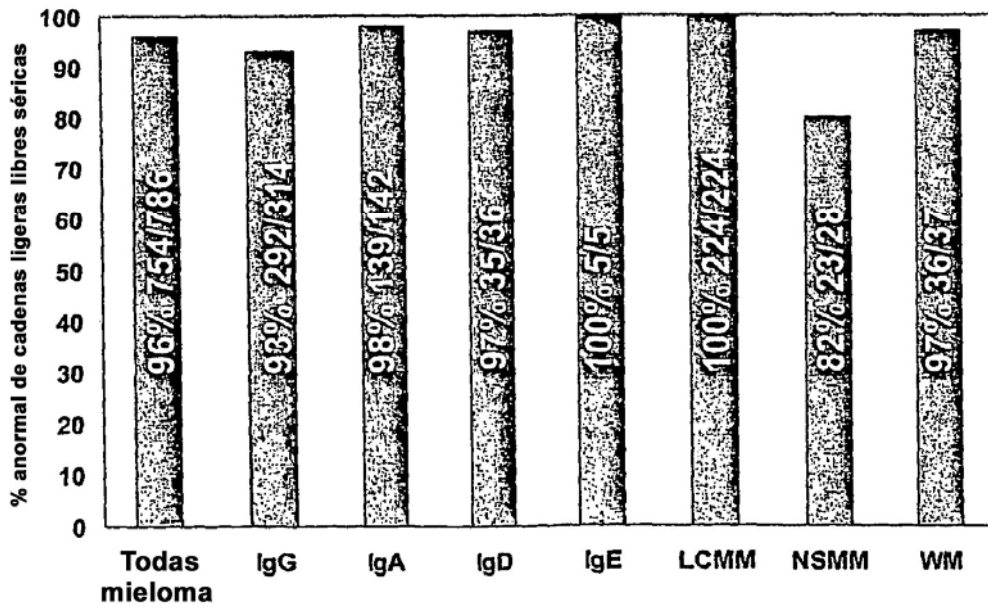


Figura 5. Curvas estándares para (a) IgA₁κ y (b) IgA₁λ

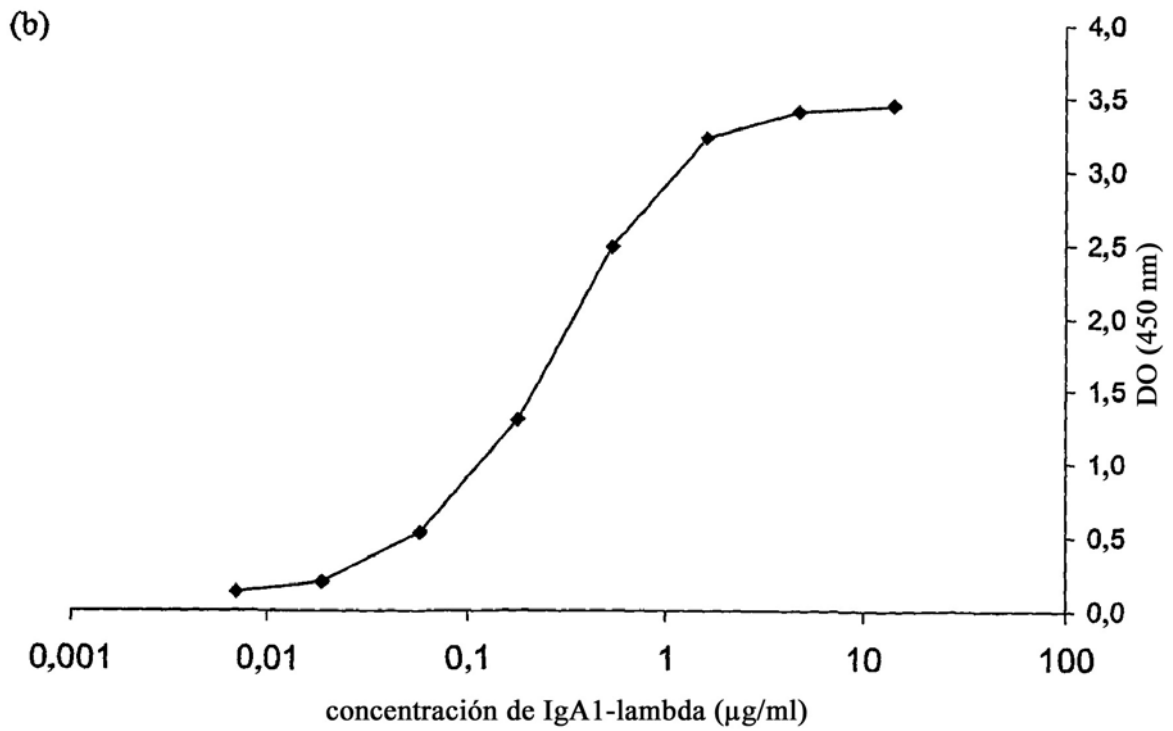
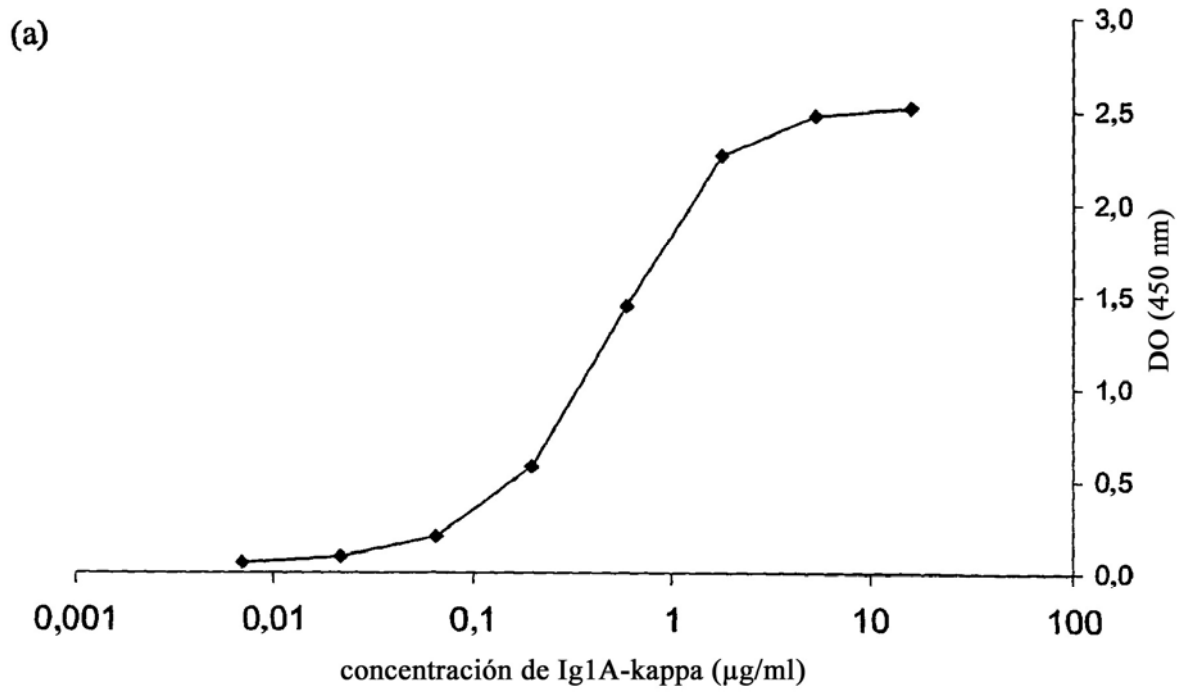


Figura 6.

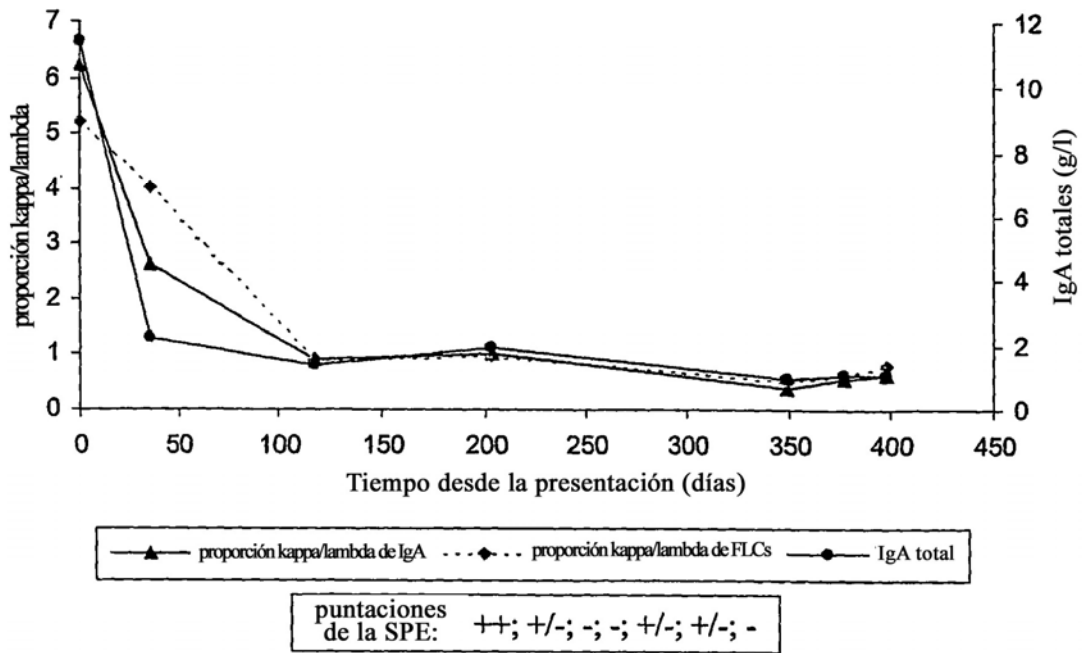


Figura 7.

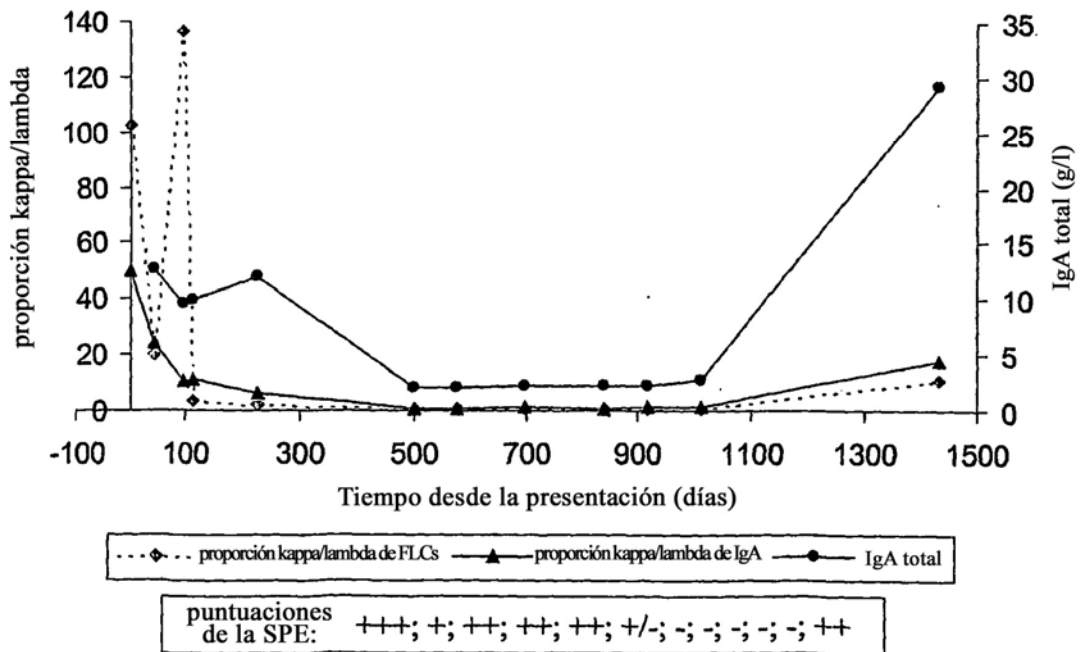


Figura 10.

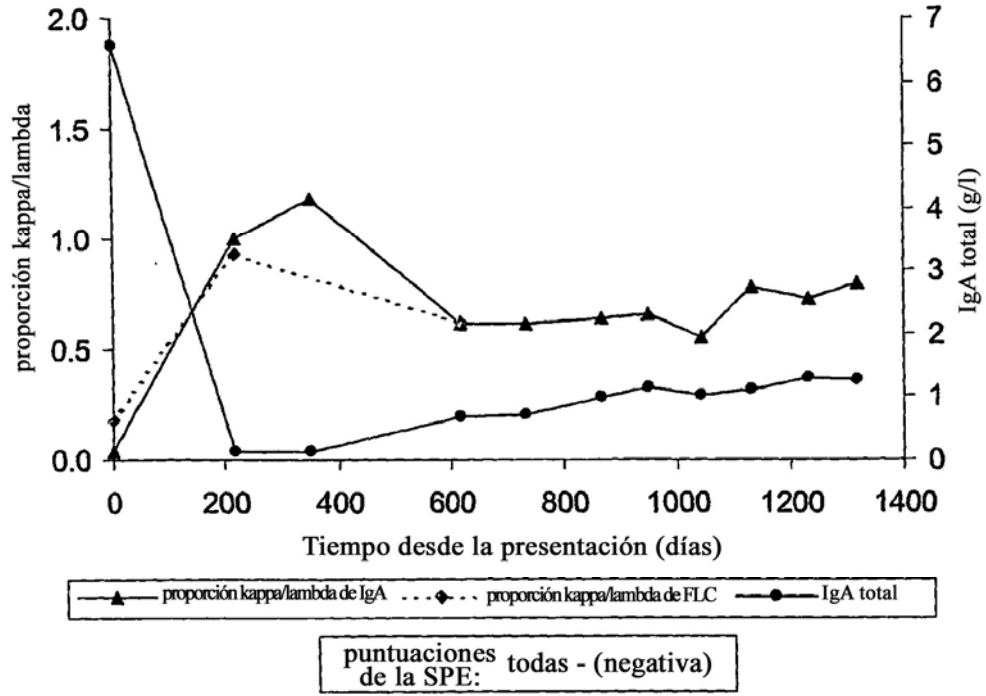


Figura 11.

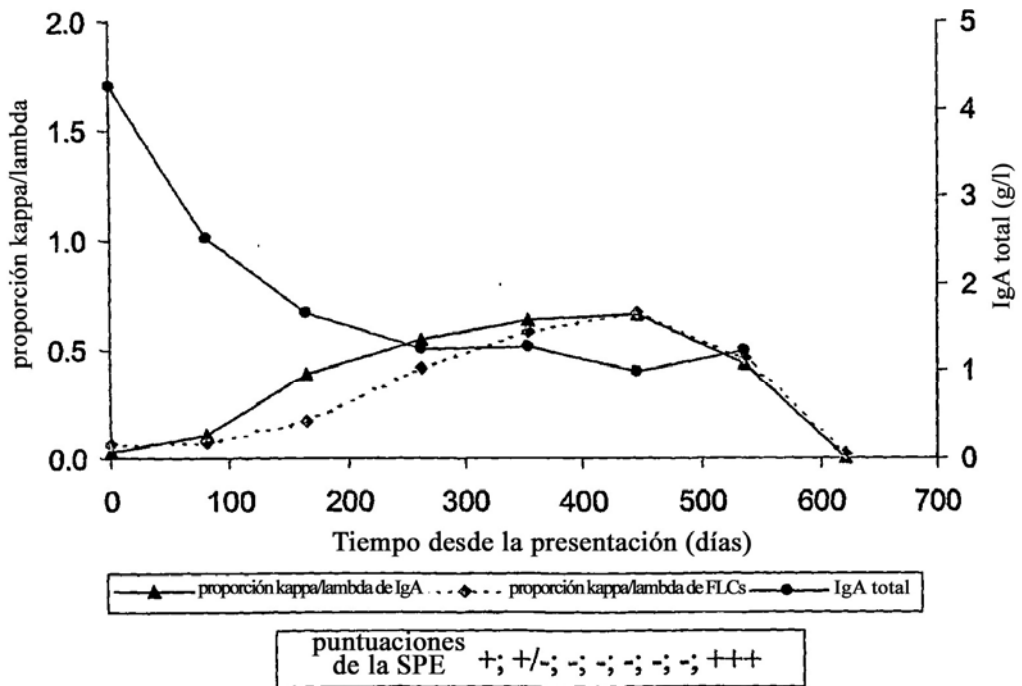


Figura 12.

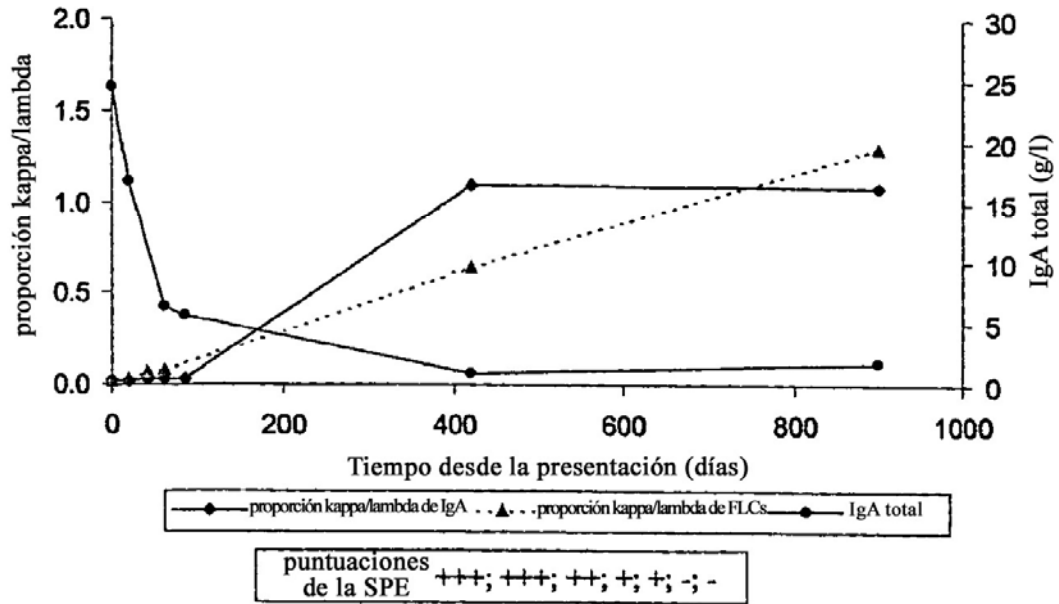


Figura 13.

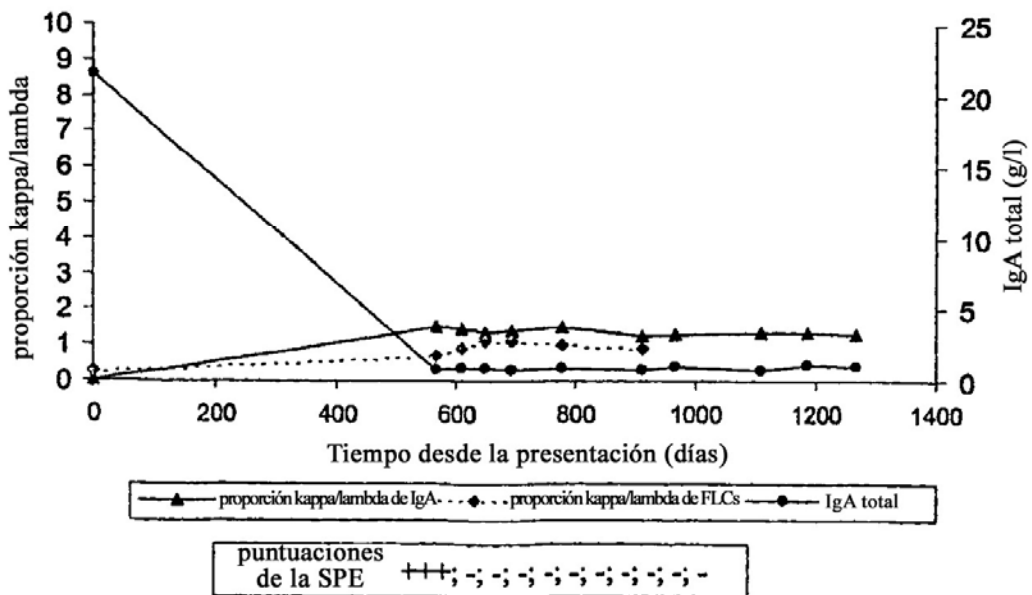


Figura 14.

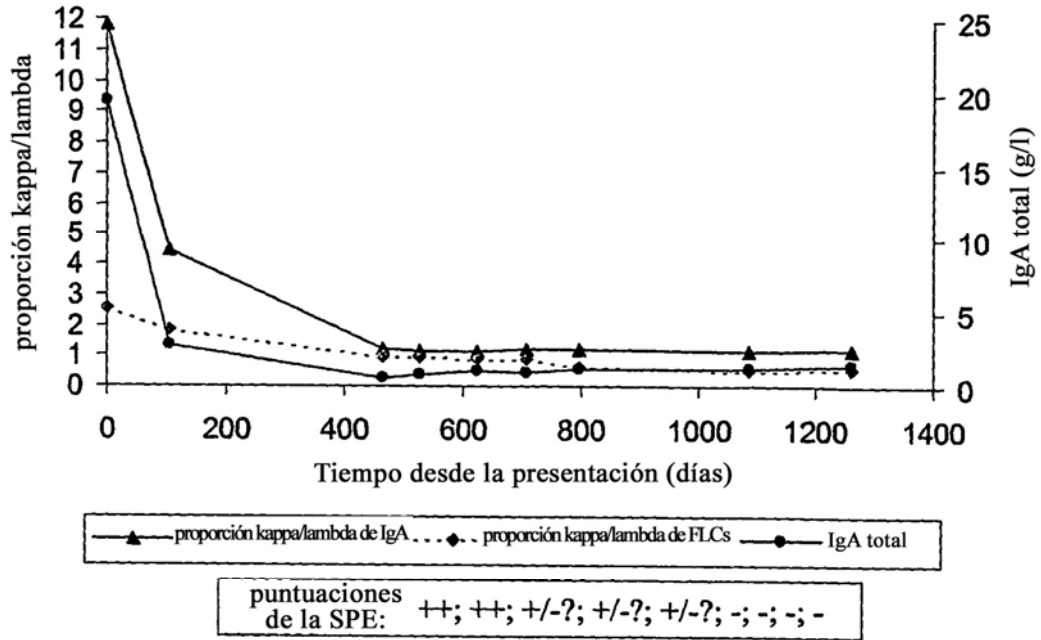


Figura 15.

