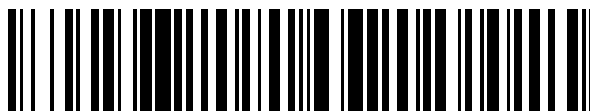


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 922**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2010 E 10747657 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2467724**

54 Título: **Ensayo pronóstico de supervivencia**

30 Prioridad:

19.08.2009 GB 0914535
22.01.2010 GB 201001079

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2014

73 Titular/es:

THE BINDING SITE GROUP LIMITED (100.0%)
8 Calthorpe Road, Edgbaston
Birmingham B15 1QT, GB

72 Inventor/es:

MEAD, GRAHAM PETER y
BRADWELL, ARTHUR RANDALL

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 517 922 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo pronóstico de supervivencia

5 [0001] La invención se refiere a un ensayo pronóstico para la determinación de la supervivencia probable de un sujeto o individuo según se define en las reivindicaciones.

10 [0002] Existen varios factores previamente identificados que, medidos en un sujeto, tal como un individuo humano, son indicativos de la probable supervivencia a largo plazo de ese individuo. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, el colesterol, la proteína C reactiva (CRP) y la cistatina C. Los niveles elevados de estos compuestos se asocian a diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares y alteraciones renales.

15 [0003] Los solicitantes han estudiado durante muchos años las cadenas ligeras libres como medio de someter a ensayo un amplio abanico de gammopatías monoclonales en pacientes. La utilización de dichas cadenas ligeras libres en el diagnóstico se revisa en detalle en la obra "Serum Free Light Chain Analysis, quinta edición, 2008, A.R. Bradwell et al., ISBN 0704427028".

20 [0004] Los anticuerpos comprenden cadenas pesadas y cadenas ligeras. Habitualmente presentan una simetría binaria y están compuestos de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, conteniendo cada una dominios de región variable y constante. Los dominios variables de cada pareja de cadena ligera/cadena pesada 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. Las cadenas ligeras son de dos tipos, κ y λ , y se produce cualquier molécula de anticuerpo dada con uno de los dos tipos de cadena ligera pero nunca con ambos. Existen aproximadamente dos veces más moléculas κ que λ en el ser humano, aunque este dato es diferente en algunos mamíferos. Habitualmente las cadenas ligeras se encuentran unidas a las cadenas pesadas. Sin embargo, pueden detectarse algunas "cadenas ligeras libres" no unidas en el suero o la orina de los individuos. Las cadenas ligeras libres pueden identificarse específicamente cultivando anticuerpos contra la superficie de la cadena ligera libre que normalmente se encuentra oculta por la unión de la cadena ligera a la cadena pesada. En las cadenas ligeras libres (CLL), esta superficie se encuentra expuesta, permitiendo que sea detectada inmunológicamente. Entre los kits disponibles comercialmente para la detección de cadenas ligeras libres κ o λ se incluyen, por ejemplo, "Freelite™", fabricado por The Binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido. Los solicitantes han identificado previamente que la medición de la cantidad de κ libre, de λ libre y/o de la proporción de κ libre/ λ libre, permite la detección de gammopatías monoclonales en los pacientes. Se ha utilizado, por ejemplo, como ayuda en el diagnóstico de mieloma múltiple de inmunoglobulinas intactas (MM), MM de cadenas ligeras, MM no secretorio, amiloidosis AL, enfermedad de deposición de cadenas ligeras, MM indolente, plasmacitoma y GMSI (gammopatías monoclonales de significado incierto). La detección de CLL también ha sido utilizada, por ejemplo, como ayuda en el diagnóstico de otras discrasias de las células B y en efecto, como alternativa al análisis de las proteínas urinarias de Bence Jones para el diagnóstico de gammopatías monoclonales en general.

40 [0005] Convencionalmente, se busca un incremento de una de las cadenas ligeras, λ o κ . Por ejemplo, los mielomas múltiples resultan de la multiplicación monoclonal de una célula plasmática maligna, resultando en un incremento en un único tipo de célula que produce un único tipo de inmunoglobulina. Esto resulta en un incremento de la cantidad de cadenas ligeras libres, λ o κ , observado en un individuo. Este incremento de la concentración puede determinarse, y habitualmente se determina la proporción entre κ libre y λ libre y se compara con el intervalo normal. Esto ayuda en el diagnóstico de las enfermedades monoclonales. Además, los ensayos de cadenas ligeras libres también pueden utilizarse para el seguimiento del tratamiento de la enfermedad en los pacientes. Puede llevarse a cabo el pronóstico de los pacientes, por ejemplo tras el tratamiento de la amiloidosis AL.

50 [0006] Katzman et al. (Clin. Chem. 48(9):1437-1944, 2002) comentan los intervalos de referencia en suero y los intervalos diagnósticos para las inmunoglobulinas κ y λ libres en el diagnóstico de las gammopatías monoclonales. Se estudiaron los individuos entre 21 y 90 años mediante inmunoensayo y se compararon con los resultados obtenidos mediante inmunofijación para optimizar el inmunoensayo para la detección de cadenas ligeras libres (CLL) monoclonales en individuos con discrasia de células B. Se registraron las cantidades de CLL κ y λ y las proporciones κ/λ , permitiendo determinar un intervalo de referencia para la detección de las discrasias de células B.

60 [0007] El documento nº EP 0336472A da a conocer un método para determinar la presencia de cadenas ligeras libres en muestras de orina. Éste se utiliza para examinar las cadenas ligeras en la orina en enfermedades inmunoproliferativas tales como el mieloma múltiple y en enfermedades hiperproliferativas tales como la artritis reumatoide aguda.

[0008] El documento nº DE 20 2004 012479U da a conocer un sistema semicuantitativo destinado a buscar cadenas ligeras libres (proteínas de Bence Jones) en orina y en plasma.

[0009] Los solicitantes ahora han identificado que el ensayo para CLL y especialmente las CLL totales puede utilizarse para predecir la supervivencia a largo plazo de los individuos, incluso en el caso de que el individuo sea un sujeto aparentemente sano. Se ha encontrado que la concentración de CLL está asociada de manera estadísticamente significativa a la supervivencia a largo plazo. Además, esta asociación aparentemente es similar o mejor que la asociación para marcadores pronósticos de supervivencia a largo plazo ya existentes, tales como el colesterol, la creatinina, la cistatina C y la proteína C reactiva.

[0010] La concentración de CLL en suero de individuos que son aparentemente sanos se ve influida en cierto grado por la capacidad de los riñones del individuo de filtrar y excretar las CLL. En individuos en los que se encuentra limitada la eliminación de las CLL, se produce un incremento de los niveles de CLL observados en el suero. Como consecuencia, ahora se cree que las CLL son un buen marcador de la función renal. Debido a que las moléculas de CLL kappa monoméricas (25 kDa) son de tamaño diferente a las moléculas lambda diméricas (50 kDa), conjuntamente son mejores marcadores de la filtración glomerular que, por ejemplo, la cistatina C (10 kDa). Sin embargo, en contraste con la cistatina C, la producción de las CLL durante la proliferación de las células B es una consecuencia de muchas enfermedades, de manera que las CLL séricas típicamente no se utilizan de manera aislada como marcador de la función renal. Los datos indican que incluso en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), las CLL proporcionan la probabilidad de supervivencia, con independencia de la función renal.

[0011] Sin embargo, los marcadores de la proliferación/actividad de las células B son importantes y debido a que las células B son responsables de producir las CLL, ello resulta clínicamente útil. La producción de CLL es un indicador temprano de regulación positiva de las células B. A este respecto, puede complementar la utilización de CRP, que es un marcador mediado por las células T de las respuestas inflamatorias

[0012] Las concentraciones elevadas de CLL pueden ser perfectamente una indicación de problemas renales crónicas, de activación de las células B o de proliferación de las células B. Por lo tanto, un resultado de ensayo anormal de las CLL puede ser un marcador de una diversidad de trastornos que actualmente requieren varios ensayos en combinación. La inversa de lo anterior, cuando los resultados de ensayo de las CLL son normales, indica una buena función renal y la ausencia de activación o proliferación de las células B. Por lo tanto, ahora se ha reconocido la concentración de las CLL como un buen indicador de la salud general de un individuo.

[0013] La invención proporciona un método de cribado general de la salud que comprende detectar una cantidad de cadenas ligeras libres (CLL) en una muestra de un sujeto y compararla con un valor predeterminado, en el que una cantidad más baja se asocia a una supervivencia incrementada y/o una salud general mejor, y un nivel más alto de CLL indica la posible presencia de un problema médico no detectado. El ensayo puede utilizarse, por ejemplo, como parte de una revisión médica general. Alternativamente, podría utilizarse en pacientes que presentan persistentemente síntomas de tipo "malestar general" no específico, "debilidad general" o "generalmente enfermo". Alternativamente, podría utilizarse en pacientes para distinguir los pacientes que no se encuentran bien por causas psicológicas del malestar, frente a causas fisiológicas difíciles de identificar de los síntomas.

[0014] Puede compararse la cantidad de CLL con un intervalo normal predeterminado de CLL para indicar si la cantidad de CLL es más alta o más baja que el intervalo normal.

[0015] Las CLL pueden ser CLL kappa o lambda. Sin embargo, preferentemente se mide la concentración de CLL totales, ya que la detección de las CLL kappa o las CLL lambda por sí solas podría no detectar, por ejemplo, los niveles anormalmente altos de una u otra CLL producida, por ejemplo, monoclonalmente en el paciente.

[0016] Las cadenas ligeras libres totales se refiere a la cantidad total de cadenas ligeras kappa libres más lambda libres en una muestra.

[0017] Preferentemente, el sujeto es un sujeto aparentemente sano.

[0018] La expresión "sujeto aparentemente sano" tal como se utiliza en la presente memoria debe entenderse como referida a un sujeto sin síntomas evidentes de enfermedades o condiciones potencialmente letales (tales como las indicadas posteriormente).

[0019] Preferentemente, el método proporciona un método de pronóstico de la supervivencia global de un sujeto. Lo anterior puede ser, por ejemplo, en un sujeto que no presenta un diagnóstico o síntomas específicos de enfermedad o discrasia asociada a células B.

[0020] Preferentemente, el sujeto aparentemente sano no presenta necesariamente síntomas de una enfermedad asociada a células B. Entre los síntomas pueden incluirse infecciones recurrentes, dolor óseo y fatiga. Dicha enfermedad asociada a células preferentemente no es un mieloma (tal como mieloma de inmunoglobulinas intactas, mieloma de cadenas ligeras, mieloma no secretorio), un GMSI, una amiloidosis AL, una macroglobulinemia de

Waldenström, linfoma de Hodgkin, linfoma de células del centro folicular, leucemia linfocítica crónica, linfoma celular del manto, leucemia de células pre-B o leucemia linfoblástica aguda. Además, el individuo típicamente no presenta una función reducida de la médula ósea. El individuo típicamente no presenta una proporción de CLL λ : κ anormal, típicamente observada en muchas de dichas enfermedades.

5 [0021] La expresión "cadenas ligeras libres totales" se refiere a la cantidad de cadenas ligeras libres κ y λ en la muestra procedente del sujeto.

10 [0022] La muestra típicamente es una muestra de suero del sujeto. Sin embargo, también puede utilizarse potencialmente sangre completa, plasma, orina u otras muestras de tejido o líquidos.

[0023] Típicamente las CLL, tal como las CLL totales, se determinan mediante inmunoensayo, tal como los ensayos ELISA o utilizando perlas marcadas fluorescentemente, tales como las perlas LuminexTM.

15 [0024] El ELISA, por ejemplo, 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 peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros enzimas conocidos de la técnica. Alternativamente pueden utilizarse otras etiquetas o marcajes detectables en lugar de, o conjuntamente con, los enzimas. Entre ellos se incluyen los isótopos radioactivos, un amplio abanico de marcajes de color y
20 fluorescentes conocidos de la técnica, incluyendo la fluoresceína, Alexa flúor, verde Oregón, 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 pigmentos, soluciones metálicas, marcajes quimioluminiscentes o látex de color. Puede utilizarse uno o más de dichos marcajes en los ensayos ELISA según las diversas invenciones descritas en la presente memoria, o alternativamente en otros
25 ensayos, anticuerpos marcados o kits descritos en la presente memoria.

[0025] La construcción misma de los ensayos de tipo ELISA es bien conocida de la técnica. Por ejemplo, un "anticuerpo de unión" específico para las CLL se inmoviliza sobre un sustrato. El "anticuerpo de unión" puede inmovilizarse sobre el sustrato mediante métodos que son bien conocidos de la técnica. Las CLL en la muestra se
30 unen al "anticuerpo de unión", que unen las CLL al sustrato mediante el "anticuerpo de unión".

[0026] Las inmunoglobulinas no unidas pueden eliminarse mediante lavado.

35 [0027] En los ensayos ELISA puede determinarse la presencia de inmunoglobulinas no unidas mediante la utilización de un "anticuerpo de detección" marcado específico para una parte diferente de la CLL de interés que la del anticuerpo de unión.

[0028] Puede utilizarse la citometría de flujo para detectar la unión de la CLL de interés. Esta técnica es bien conocida de la técnica para, por ejemplo, la separación celular. Sin embargo, también puede utilizarse para detectar
40 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 ed. (1994), H. Shapiro, Alan R. Liss, New York, y Flow Cytometry, First Principles (2a ed.), 2001, A.L. Given, Wiley Liss.

45 [0029] Uno de los anticuerpos de unión, tal como el anticuerpo específico para CLL, 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. El anticuerpo de detección preferentemente se marca con un marcaje detectable, que se une a la CLL que debe detectarse en la muestra. Ello resulta en una perla marcada en el caso de que la CLL que se somete a ensayo se encuentre presente.

50 [0030] Otros anticuerpos específicos para otros analitos indicados en la presente memoria también pueden utilizarse para permitir la detección de dichos analitos.

[0031] A continuación, las perlas marcadas pueden detectarse mediante citometría de flujo. Pueden utilizarse diferentes marcajes, tales como diferentes marcajes fluorescentes, para, por ejemplo, anticuerpos anti- λ libres y anti- κ libres. También pueden utilizarse otros anticuerpos específicos para otros analitos descritos en la presente
55 memoria en este ensayo o en otros ensayos descritos en la presente memoria para permitir la detección de estos analitos. Lo anterior permite detectar simultáneamente la cantidad de cada tipo de CLL unido o la presencia de otros analitos.

60 [0032] Alternativamente, o adicionalmente, pueden utilizarse perlas de diferentes tamaños para diferentes anticuerpos, por ejemplo para diferentes anticuerpos específicos de marcador. La citometría de flujo puede distinguir entre perlas de diferentes tamaños y por lo tanto puede determinar rápidamente la cantidad de cada CLL o de otro analito en una muestra.

[0033] Un método alternativo utiliza los anticuerpos unidos a, por ejemplo, perlas marcadas fluorescentemente, tales como las perlas LuminexTM disponibles comercialmente. Se utilizan perlas diferentes con anticuerpos diferentes. Las diferentes perlas se marcan con diferentes mezclas de fluoróforos, permitiendo de esta manera la determinación de diferentes analitos a partir de la longitud de onda fluorescente. Las perlas Luminex se encuentran disponibles de Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos de América.

[0034] Preferentemente, el ensayo utilizado es un método nefelométrico o turbidimétrico. Los ensayos nefelométricos y turbidimétricos para la detección de CLL λ o κ son generalmente conocidos de la técnica, pero no para ensayos de CLL totales. Presentan el mejor nivel de sensibilidad para el ensayo. Las concentraciones de las CLL λ y κ pueden determinarse separadamente o llegarse a un único ensayo para las CLL totales. Este tipo de ensayo contiene anticuerpos anti-CLL κ y anti-CLL λ típicamente en una proporción 50:50.

[0035] También pueden cultivarse anticuerpos contra una mezcla de cadenas ligeras libres λ y κ .

[0036] La cantidad de CLL totales pueden compararse con un valor predeterminado estándar para determinar si la cantidad total es superior o inferior a un valor normal.

[0037] Tal como se comenta en detalle posteriormente, los solicitantes han identificado que las concentraciones superiores a las normales de CLL en suero se asocian a un incremento significativo de la probabilidad de una supervivencia reducida. En mayor medida que, por ejemplo, las personas con niveles de CLL en suero más bajos. A partir de los datos presentados en la presente memoria, los niveles normales de CLL en suero típicamente son de aproximadamente 15 a 35 mg/l o de 20 a 35 mg/l, o de 26 a 35 mg/l o preferentemente de 25 a 32 ó 24 a 33 mg/l de CLL totales. A valores superiores a 33, por ejemplo superiores a 34, superiores a 36, superiores a 40, superiores a 42, superiores a 48, superiores a 50, superiores a 52, superiores a 55, superiores a 70 mg/l de CLL totales en suero, se indica un incremento de la probabilidad de una muerte temprana. Un valor de 33 mg/l o inferior a 30, inferior a 28, inferior a 26 ó inferior a 25 mg/l en el suero del individuo se asocia a un incremento significativo de la supervivencia del sujeto. El incremento de la probabilidad de supervivencia puede producirse durante un periodo de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ó más años. Los solicitantes han identificado que la asociación de concentraciones más bajas de CLL con la probabilidad de supervivencia incrementada es significativa durante un periodo superior a 160 meses. Ver, por ejemplo, la figura 1.

[0038] Históricamente se han producido kits de ensayo para la medición de las CLL kappa y lambda por separado, para permitir el cálculo de una proporción. Se han utilizado convencionalmente en individuos que ya manifiestan síntomas de enfermedad.

[0039] Preferentemente, el ensayo es capaz de determinar las CLL, por ejemplo las CLL totales, en la muestra, por ejemplo entre aproximadamente 1 y 100 mg/l ó entre 1 y 80 mg/l. Se espera que estos valores permitan detectar las concentraciones de CLL en suero en la amplia mayoría de individuos sin la necesidad de someter a ensayo nuevamente muestras a un dilución diferente.

[0040] El nuevo énfasis en examinar concentraciones más bajas implica que preferentemente el ensayo diagnóstico es capaz de detectar CLL a valores inferiores a 30 mg/l, más preferentemente inferiores a 20 ó inferiores a 10 mg/l, inferiores a 4 mg/l ó 1 mg/l de CLL en suero.

[0041] Preferentemente, el método comprende detectar la cantidad de cadenas ligeras libres totales en la muestra utilizando un inmunoensayo, por ejemplo mediante la utilización de una mezcla de anticuerpos anti-cadena ligera libre κ y anti-cadena ligera libre λ o fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos pueden encontrarse en una proporción de 50:50 de anticuerpos anti- κ :anti- λ . Los anticuerpos, o fragmentos, unidos a las CLL pueden detectarse directamente mediante la utilización de anticuerpos o fragmentos marcados, o indirectamente utilizando anticuerpos marcados contra los anticuerpos anti- λ libres o anti- κ libres.

[0042] Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los policlonales pueden utilizarse porque permiten detectar cierta variabilidad entre las cadenas ligeras del mismo tipo debido a que se cultivan contra diferentes partes de la misma cadena. La producción de anticuerpos policlonales se describe en, por ejemplo, el documento nº WO97/17372.

[0043] Preferentemente, la cantidad de CLL en suero, tal como las CLL totales, identificada y que se ha encontrado que es significativa en mostrar una probabilidad incrementada de supervivencia global, es inferior a 33, inferior a 32, inferior a 31, inferior a 30, inferior a 28, inferior a 26, inferior a 25 ó inferior a 24 mg/l, inferior a 20 mg/l o inferior a 15 mg/l.

[0044] A la inversa, un nivel superior a 33 mg/l, especialmente superior a 34, 36, 38, 40, 50, 55, 60 ó superior a 70 mg/l, se considera que indica que el sujeto presenta una probabilidad incrementada de muerte global. El método

puede utilizarse para indicar un peor pronóstico en sujetos aparentemente sanos. O para subrayar la probable presencia de un problema médico no detectado que justifique exámenes adicionales.

[0045] En la muestra también pueden someterse a ensayo uno o más marcadores adicionales. Entre ellos se incluyen el colesterol, la creatinina (un marcador de la función renal), la cistatina C o la CRP. La utilización de estos ensayos en general es conocida de la técnica. La utilización de un marcador adicional se espera que proporcione datos adicionales y mejore la exactitud del pronóstico o ayude en el diagnóstico de una enfermedad/problema médico subyacente.

[0046] A continuación se describe la invención únicamente a título de ejemplo, haciendo referencia a las figuras siguientes:

la figura 1 muestra la probabilidad de supervivencia de una población de estudio dividida en terciles basados en las concentraciones de CLL totales. El gráfico muestra, de parte superior a parte inferior, línea 1, los individuos con una mediana de concentración igual a aproximadamente 20 mg/l de CLL totales; línea 2, individuos con una mediana de concentración de 28,2 mg/l, y línea 3 (la línea más inferior), una mediana de concentración de aproximadamente 42 mg/l. Había 16.554 personas en el gráfico de supervivencia.

La figura 2 muestra el intervalo de concentraciones de CLL totales para los terciles (expresados como mg/decilitro) mostrado en el gráfico de supervivencia figura 1.

La figura 3 muestra un análisis adicional de los datos expresados como decilos con los gráficos en orden de decilos a los 150 meses, en donde el primer decilo es la línea más superior, hasta el décimo decilo, que es la línea más inferior.

La figura 4 muestra los datos con GMSI y/o pacientes con CLL anormales eliminados de los gráficos en orden de decilos a los 150 meses, en donde el primer decilo es la línea más superior, hasta el décimo decilo, que es la línea más inferior.

La figura 5 es una comparación entre las concentraciones de CLL totales obtenidas utilizando kits de ensayo separados anti- κ libres y anti- λ libres disponibles comercialmente, en comparación con un kit de ensayo de CLL totales utilizando una combinación de anticuerpos anti-cadena ligera libre λ y anti-cadena ligera libre κ .

La figura 6 (a-h) muestra una comparación entre los niveles de proteína c reactiva (CRP) y los niveles de CLL en el suero de pacientes que demuestra que no se correlacionan entre sí.

[0047] La clínica Mayo de los Estados Unidos de América ha estado realizando un seguimiento de >20.000 residentes de 50 ó más años (el 1 de enero de 1995) en Olmsted County, Minnesota. Se han medido las concentraciones de las CLL, retrospectivamente, en sueros congelados en archivo utilizando ensayos FreeliteTM para las cadenas ligeras libres κ y λ , de The Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido. Los ensayos Freelite son ensayos nefelométricos y turbidimétricos disponibles comercialmente aprobados por la FDA como ayuda al diagnóstico y el seguimiento de trastornos de las células plasmáticas, tales como el mieloma múltiple y la amiloidosis AL. Estos trastornos típicamente producen una concentración elevada de CLL λ o κ y una proporción de CLL anormal.

[0048] El objetivo de los investigadores de la clínica Mayo al medir las CLL en los sueros en archivo era determinar si eran sujetos con proporciones de CLL anormales y elevación de la concentración de una o ambas CLL. Los sujetos con dichas anomalías de las CLL pero sin evidencia de producción de inmunoglobulinas monoclonales intactas seguidamente se investigaron con el fin de determinar si presentaban un riesgo incrementado de trastornos malignos de las células plasmáticas.

Sin embargo, los solicitantes han conjeturado que el análisis de los sujetos sin ninguna evidencia de producción de inmunoglobulinas monoclonales o CLL monoclonales mostraría una supervivencia incrementada para aquellos con niveles totales de CLL más bajos. Los datos indicados anteriormente demuestran que lo anterior es cierto.

[0049] La figura 1 muestra los gráficos de supervivencia para la población dividida en terciles basándose en sus concentraciones de CLL totales en suero. Las características de los terciles, uno, dos y tres (de parte más superior a parte más inferior) se tabulan a continuación:

Tercilos de CLL $\kappa + \lambda$ (mg/l)							
Nivel	Mínimo	Percentil 10	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Percentil 90	Máximo
1	0,83	12,8	16,6	19,995	22,24	23,5	24,2
2	24,2	25	26,2	28,2	30,4	32	33
3	33	34,2	36,5	41,8	52,1	72,6	2.743,4

[0050] La dispersión de los datos se muestra en la figura 2.

[0051] Los datos se analizaron adicionalmente para presentar los datos como decilos para todos los sujetos y aquellos que no mostraban signos de GMSI y/o proporciones de CLL anormales. Los niveles de los decilos se muestran en la tabla a continuación:

Niveles sumados de cadenas ligeras libres kappa y lambda (mg/l)

Decilos	Todos (mg/l)	Sin GMSI (mg/l)
1	8,3-17,58	8,3-17,53
2	17,59-20,9	17,54-20,89
3	20,91-23,49	20,9-23,37
4	23,5-25,78	23,4-25,67
5	25,8-28,2	25,7-28,14
6	28,22-30,87	28,2-30,71
7	30,9-34,1	30,8-33,9
8	34,2-39,3	34,0-39,0
9	39,4-48,9	39,1-48,1
10	49,1-274,34	48,2-167,21

[0052] Las figuras 3 y 4 muestran los datos para todos los pacientes y datos en los que se han eliminado los pacientes con GMSI y/o proporciones de CLL anormales, en las que se demuestran que la supervivencia no se debe significativamente a presentar GMSI y/o proporciones de CLL anormales. Cuanto más alto es el nivel de CLL, más baja es la supervivencia. Las líneas, de parte más superior a parte más inferior de los gráficos en la marca de los 150 meses, representan los decilos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente, los cuales muestran una buena correlación entre la supervivencia y la concentración de CLL.

Kit de ensayo

[0053] El método según la invención puede utilizar el kit de ensayo siguiente. El kit de ensayo cuantifica las cadenas ligeras libres κ y λ totales presentes en muestras de pacientes, por ejemplo en el suero. Lo anterior puede conseguirse recubriendo partículas de látex modificadas con carboxilo de 100 nm con una mezcla 50:50 de anticuerpo de oveja anti-cadena ligera libre κ y anti-cadena libre λ . En el ensayo ejemplificado anteriormente, el intervalo de medición para las cadenas ligeras libres totales es de 1 a 80 mg/l. Sin embargo, igualmente podrían considerarse otros intervalos de medición.

[0054] Los antisueros anti- κ y anti- λ se producen utilizando técnicas generalmente conocidas de la técnica, en este caso particular en ovejas. El procedimiento general de inmunización se describe en el documento nº WO 97/17372.

[0055] Se diluyeron antisueros anti- κ y anti- λ hasta concentraciones iguales utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se agruparon estos anticuerpos para producir antisueros que comprendían 50% de anticuerpo anti- κ y 50% de anticuerpo anti- λ .

[0056] Los anticuerpos se utilizaron para recubrir látex modificado con carboxilo a una carga de recubrimiento de 10 mg/lote. Lo anterior se consiguió utilizando procedimientos estándares. Ver, por ejemplo, "Microparticle Reagent Optimization: A laboratory reference manual from the authority on microparticles", editores: Caryl Griffin, Jim Sutor, Bruce Shull. Copyright Seradyn Inc., 1994 (P/N 0347835(1294)).

[0057] Dicha referencia proporciona además datos sobre la optimización de los kits de ensayo que utilizan polietilenglicol (PEG).

[0058] Los anticuerpos agrupados se compararon con los resultados obtenidos utilizando los kits Freelite™ de κ y λ disponibles comercialmente (obtenidos de The Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido). Dichos kits Freelite™ identifican la cantidad de cadenas ligeras libres κ y λ en ensayos separados. Se utilizaron los kits de CLL totales para generar curvas, las cuales se validaron utilizando concentraciones controladas. Pudieron obtenerse curvas de calibración entre 1 y 80 mg/l para las cadenas ligeras libres totales. En la tabla de resultados, posteriormente, se obtuvieron resultados para la cadena ligera libre κ (CLLK), la cadena ligera libre λ (CLLL) y las

CLL totales, utilizando los ensayos de cadenas ligeras libres totales Freelite™ κ y Freelite™ λ. Se muestran estos resultados para 15 muestras de suero normales diferentes. Se muestran los resultados en la tabla, posteriormente, y en la figura 5, medidos mediante turbidimetría.

- 5 [0059] Los resultados indican que el principio de utilización de un ensayo de cadenas ligeras libres totales basado en anticuerpos anti-cadena ligera libre κ y anti-cadena ligera libre λ es viable.

Resultados

10 [0060]

USN	Id de lote	Resultados (mg/l)			CLLK+CLLL	% dif. CLL totales y (CLLK+CLLL)
		CLLK	CLLL	CLL totales		
1	104	3,37	3,51	6,31	6,88	-8,3%
2	151	3,42	5,39	8,99	8,81	2,0%
3	158	3,28	6,21	9,35	9,49	-1,5%
4	161	2,05	3,62	6,06	5,67	6,9%
5	179	6,83	5,84	13,71	12,67	8,2%
6	180	2,19	3,27	5,96	5,46	9,2%
7	181	2,98	5,27	10,64	8,25	29,0%
8	182	4,72	7,26	11,6	11,98	-3,2%
9	216	2,54	4,66	8,7	7,2	20,8%
10	217	3,01	3,24	6,88	6,25	10,1%
11	219	7,12	8,53	14,73	15,65	-5,9%
12	227	1,47	2,31	3,66	3,78	-3,2%
13	228	8,16	7,2	17,67	15,36	15,0%
14	229	4,51	6,61	13,1	11,12	17,8%
15	231	3,69	5,6	11,91	9,29	28,2%
Promedio de las dif.						8,3%

Las concentraciones de proteína C reactiva (CRP) y de CLL están afectadas por factores diferentes

15 Introducción

[0061] La proteína C reactiva (CRP) es una proteína positiva de fase aguda y se observan concentraciones elevadas en el suero durante las respuestas inflamatorias y en respuesta a determinados tumores. Debido a que las cadenas ligeras libres (CLL) de inmunoglobulina se cree que son producidas como "producto secundario" de la síntesis de las inmunoglobulinas, es posible que exista un grado de correlación entre las concentraciones en suero de las dos proteínas. El propósito del estudio siguiente era determinar las concentraciones de las dos proteínas en muestras de suero en serie procedentes de pacientes en una unidad de cuidados intensivos, estos pacientes se esperaba que típicamente mostrasen cambios significativos de la concentración de CRP durante su estancia en cuidados intensivos.

Pacientes y métodos

[0062] Todos los pacientes fueron sometidos a investigaciones e intervenciones (en una unidad de cuidados intensivos) por una diversidad de motivos. Se recogieron muestras de sangre en serie durante todo el tiempo de estancia en la unidad y se midieron inmunonefelométricamente las concentraciones de CRP y CLL. Se determinaron las CLL tal como anteriormente. Se midió la CRP utilizando un kit disponible comercialmente de Roche (proteína C reactiva CRPL3 Tima-quant).

Resultados

[0063] Se muestran los resultados en los gráficos adjuntos (ver la figura 6). Algunos pacientes mostraron una concordancia razonablemente buena con los cambios en las concentraciones de tanto CLL como CRP. Otros pacientes mostraron tendencias similares durante parte, aunque no todo, el periodo de seguimiento. En varios pacientes los cambios de concentración de CLL eran opuestos a los mostrados para CRP.

Conclusiones

[0064] Aunque algunos pacientes mostraron un grado de similitud entre los cambios de las concentraciones de CRP y CLL, otros revelaron patrones de cambio muy diferentes. Esto indica que los factores que controlan las

concentraciones de ambas proteínas son diferentes y que no pueden considerarse intercambiables.

Datos adicionales

- 5 [0065] El análisis de los datos de supervivencia también se repitió utilizando muestras diferentes de pacientes en otras partes del mundo. Una cohorte de más de 4.000 pacientes procedente de Essen, Alemania, produjo resultados similares a los indicados anteriormente. Se realizó un seguimiento de la supervivencia de aproximadamente 500 pacientes del New Cross Hospital, Wolverhampton, Reino Unido, quienes presentaban mediciones de las cadenas ligeras libres en suero conjuntamente con peticiones para electroforesis de las proteínas séricas. Se observaron
- 10 diferencias similares de supervivencia, con una supervivencia de aproximadamente 98% para el primer quintil y una supervivencia de 50% para el quinto quintil tras 60 meses (datos no mostrados).
- [0066] También se estudiaron 1.328 pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) del Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, Reino Unido. De ellos, 897 presentaban ERC de diversas causas, 384 habían recibido un trasplante de
- 15 riñón y 47 estaban recibiendo hemodiálisis periódicamente. Se estudió la supervivencia para los pacientes agrupados en diferentes estadios de la ERC basados en la concentración de creatinina en suero con correcciones para edad, sexo y procedencia étnica (datos no mostrados). El estudio demostró que la concentración agrupada de κ y λ libres todavía proporcionaba una indicación del riesgo de supervivencia, independientemente del estadio de la ERC. Por lo tanto, la concentración de CLL y la supervivencia no dependen simplemente de la función renal sino
- 20 también de otros factores.

REIVINDICACIONES

1. Método de examen de salud general, que comprende detectar una cantidad de cadenas ligeras libres (CLL) en una muestra de un sujeto y compararla con un valor predeterminado, en el que una cantidad más baja de CLL se asocia a una supervivencia incrementada y/o una salud general mejor del sujeto, y un nivel más alto de CLL indica la posible presencia de un problema médico no detectado.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el sujeto no manifiesta síntomas evidentes de una enfermedad potencialmente mortal, tal como una enfermedad o discrasia de las células B.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad de cadenas ligeras libres es la cantidad de cadenas ligeras libres totales en la muestra.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que las CLL se determinan en una muestra de suero del sujeto.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que las CLL se determinan mediante inmunoensayo utilizando los anticuerpos anti-cadena ligera libre.
6. Método según la reivindicación 5, en el que los anticuerpos son una mezcla de anticuerpos anti-cadena ligera libre κ y anti-cadena ligera libre λ .
7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que el método comprende detectar la cantidad de CLL mediante nefelometría o turbidimetría.
8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, que comprende detectar las CLL con un ensayo diagnóstico capaz de detectar niveles de CLL inferiores a 3 mg/l.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el ensayo es capaz de detectar niveles de CLL de entre 1 mg/l y 80 mg/l.
10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra es una muestra de suero y una cantidad inferior a 25 mg/l de CLL totales indica una probabilidad incrementada de supervivencia global del sujeto.
11. Método según las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de determinar una cantidad de colesterol, creatinina, cistatina C o proteína C reactiva (CRP) en una muestra del sujeto.

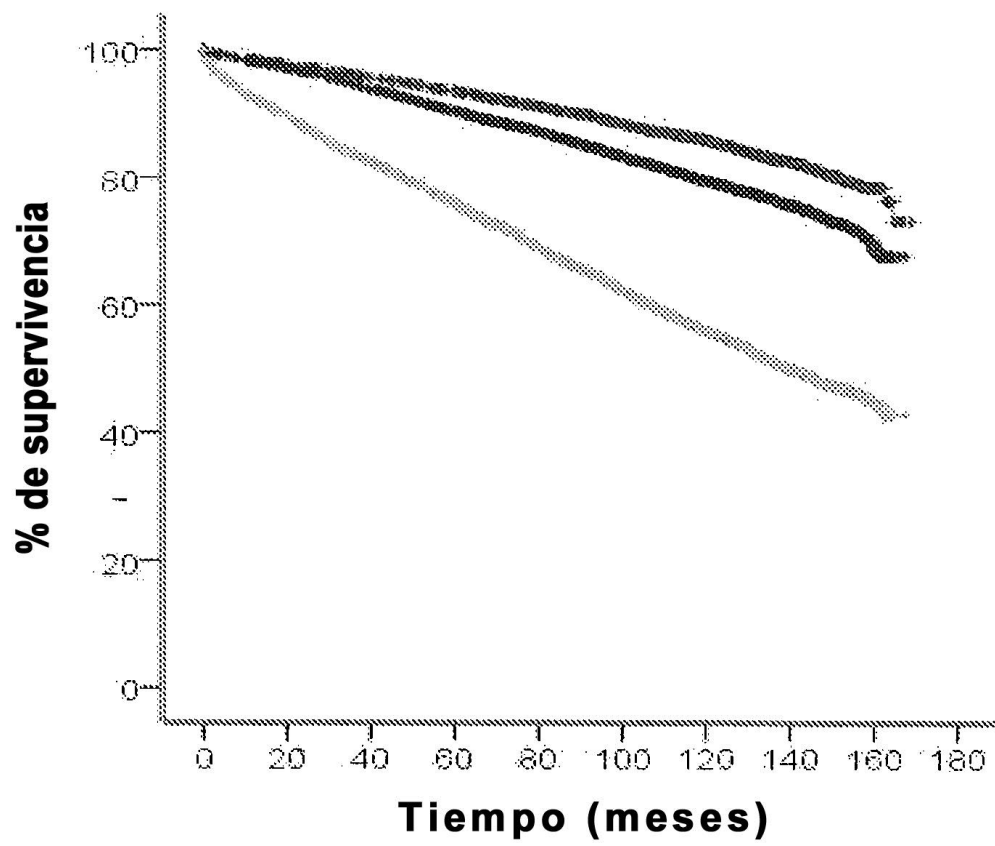


Figura 1

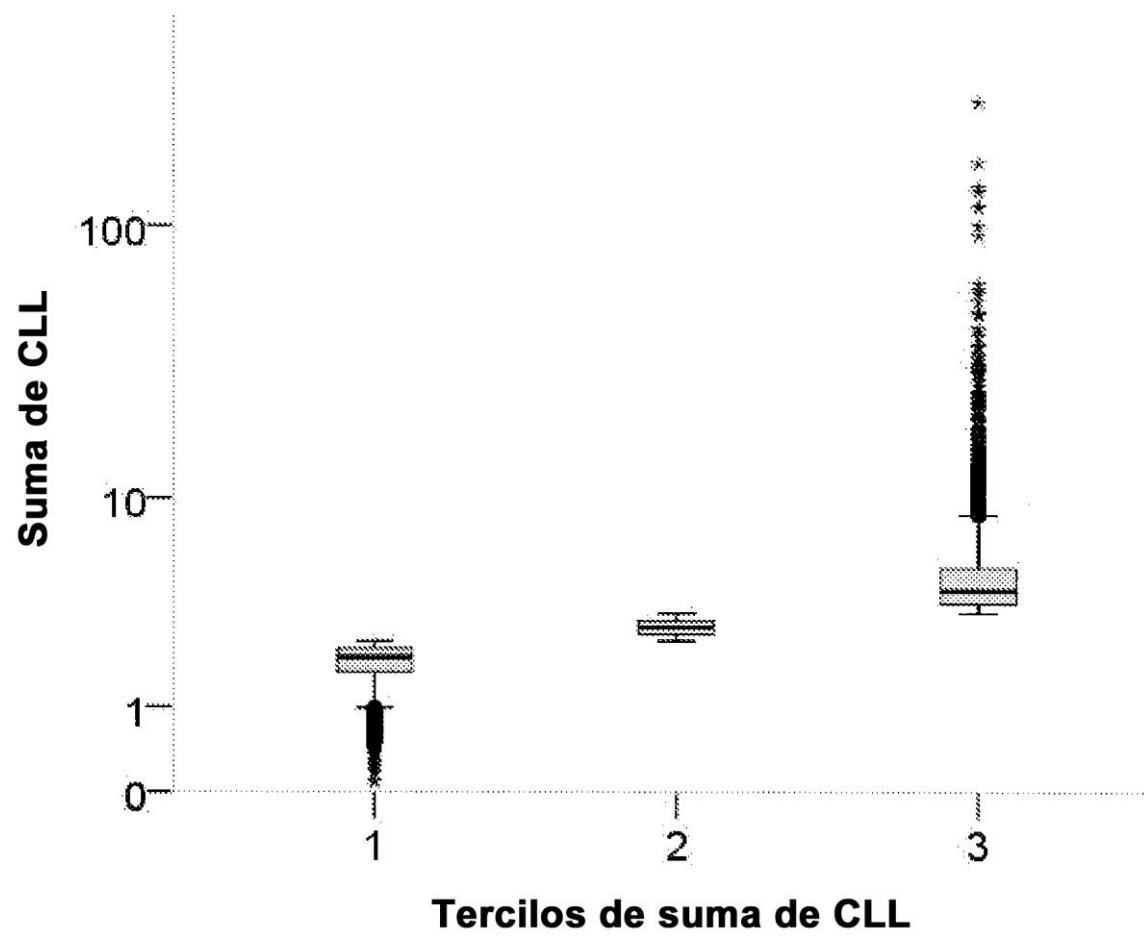


Figura 2

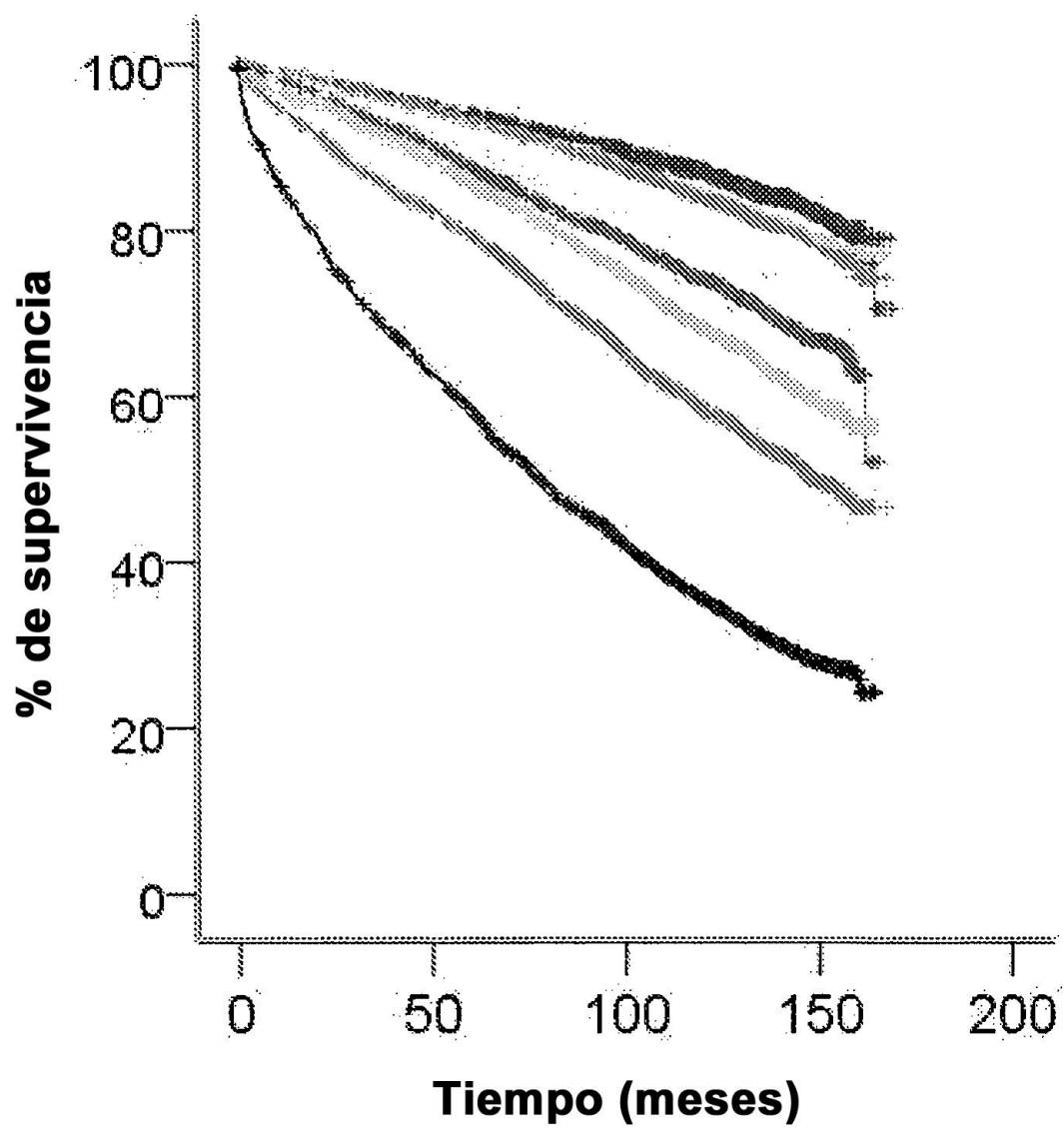


Figura 3

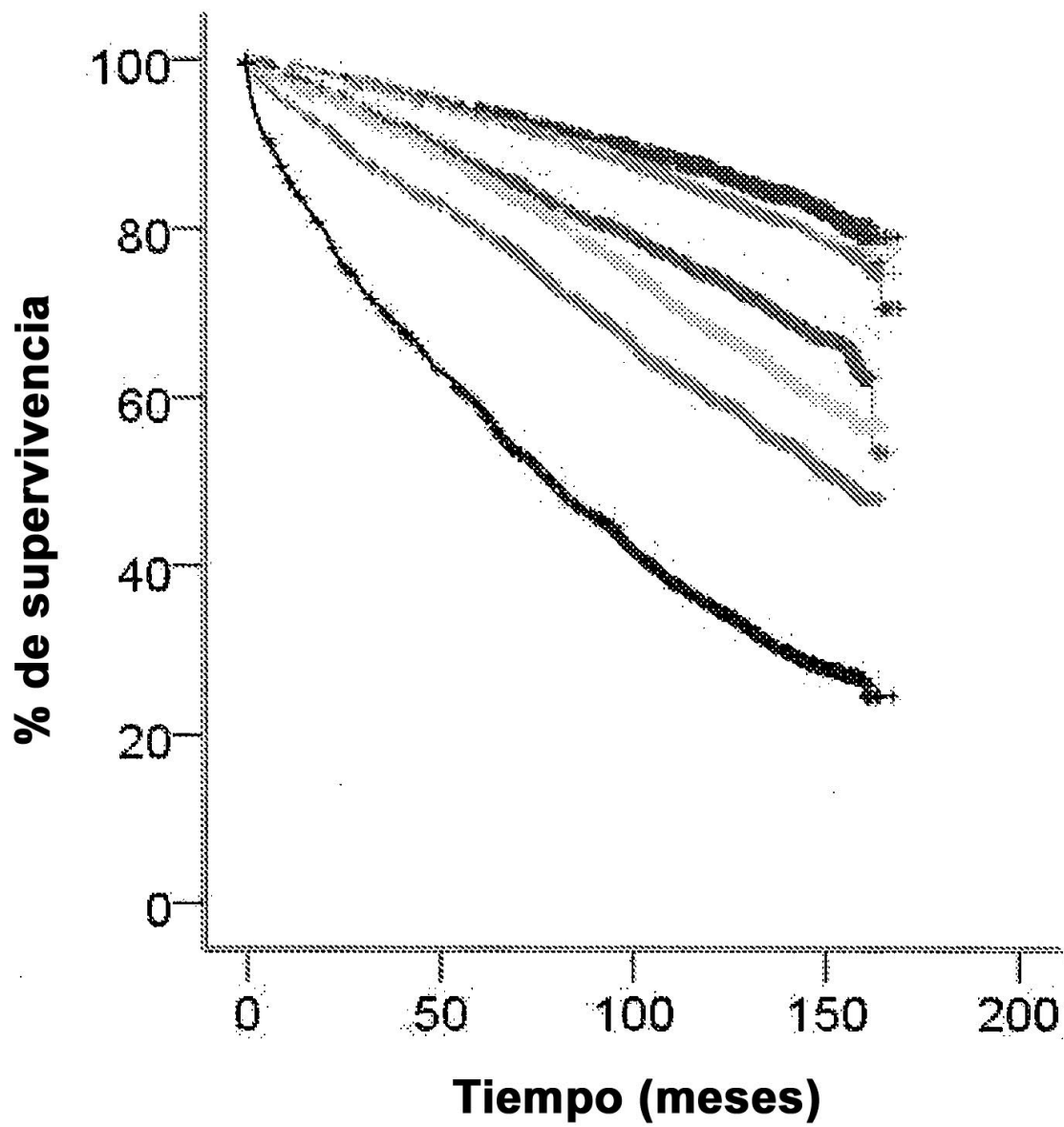


Figura 4

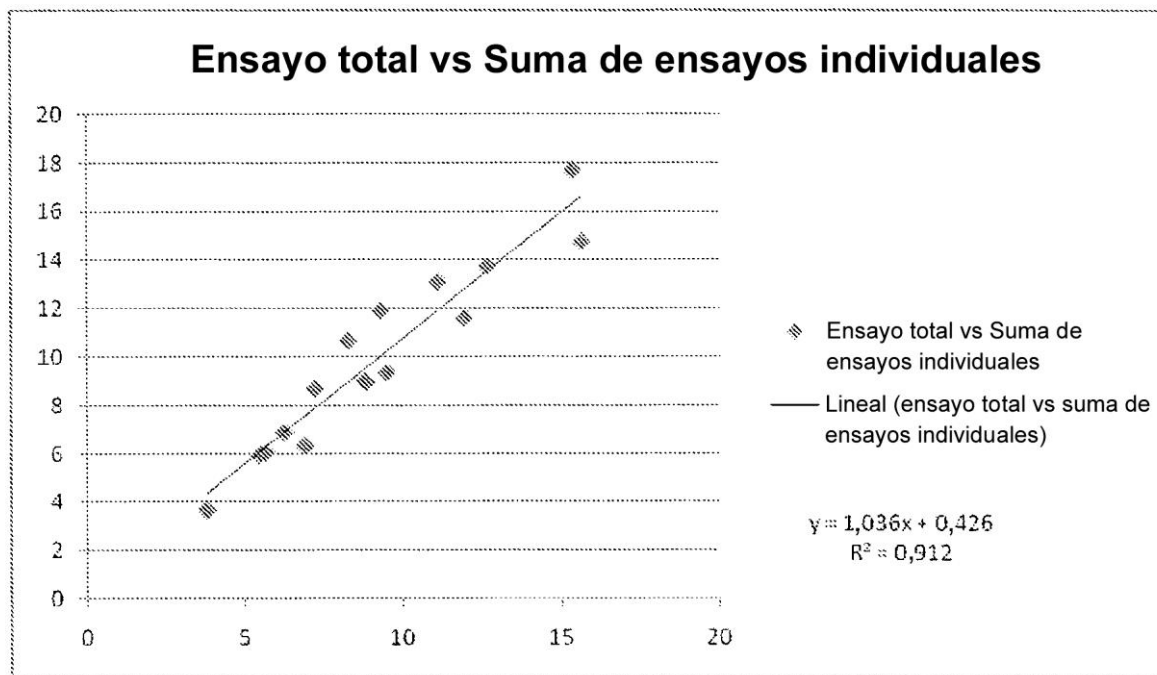


Figura 5

Paciente 1A

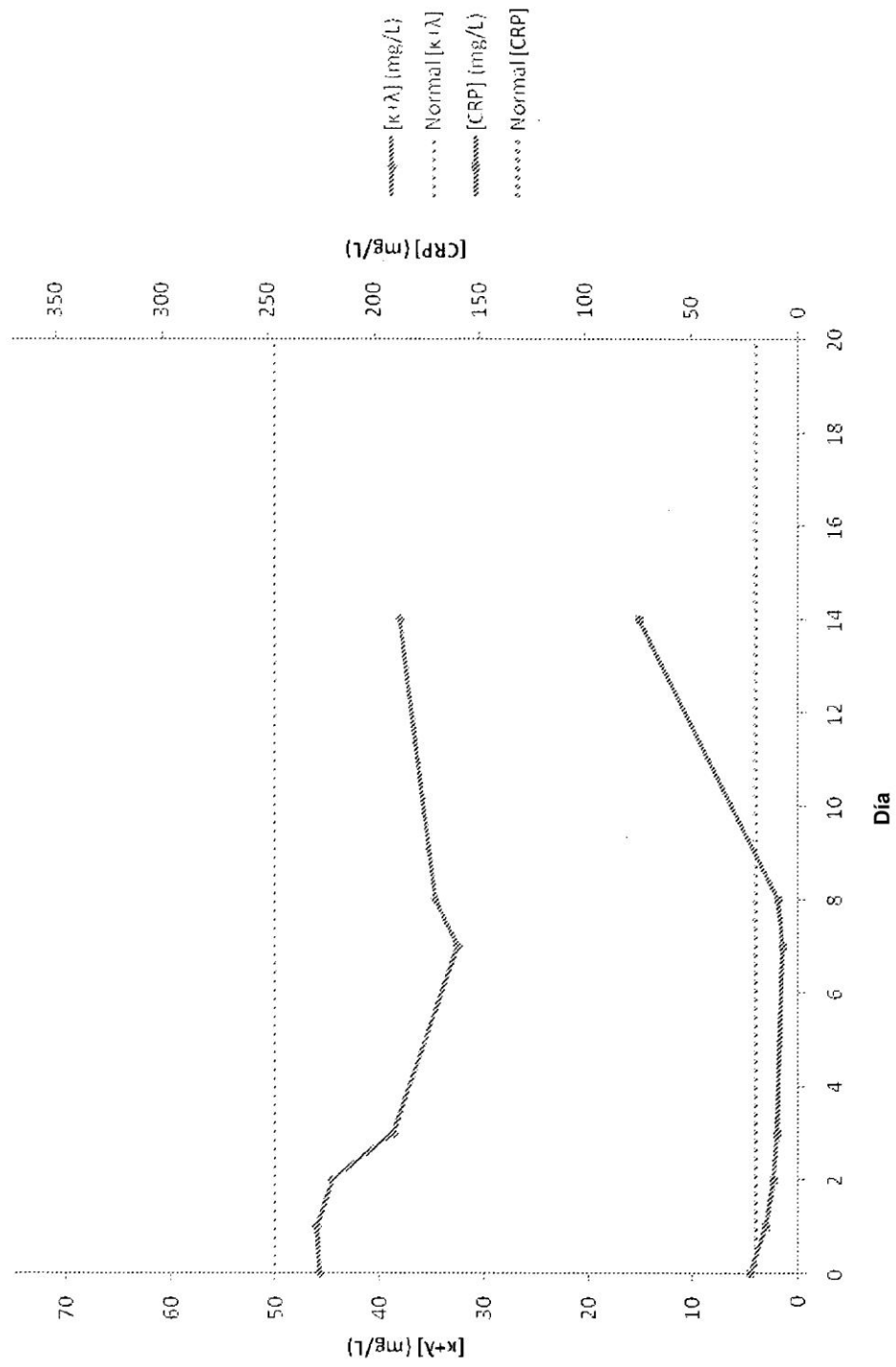


Figura 6a

Paciente 2A

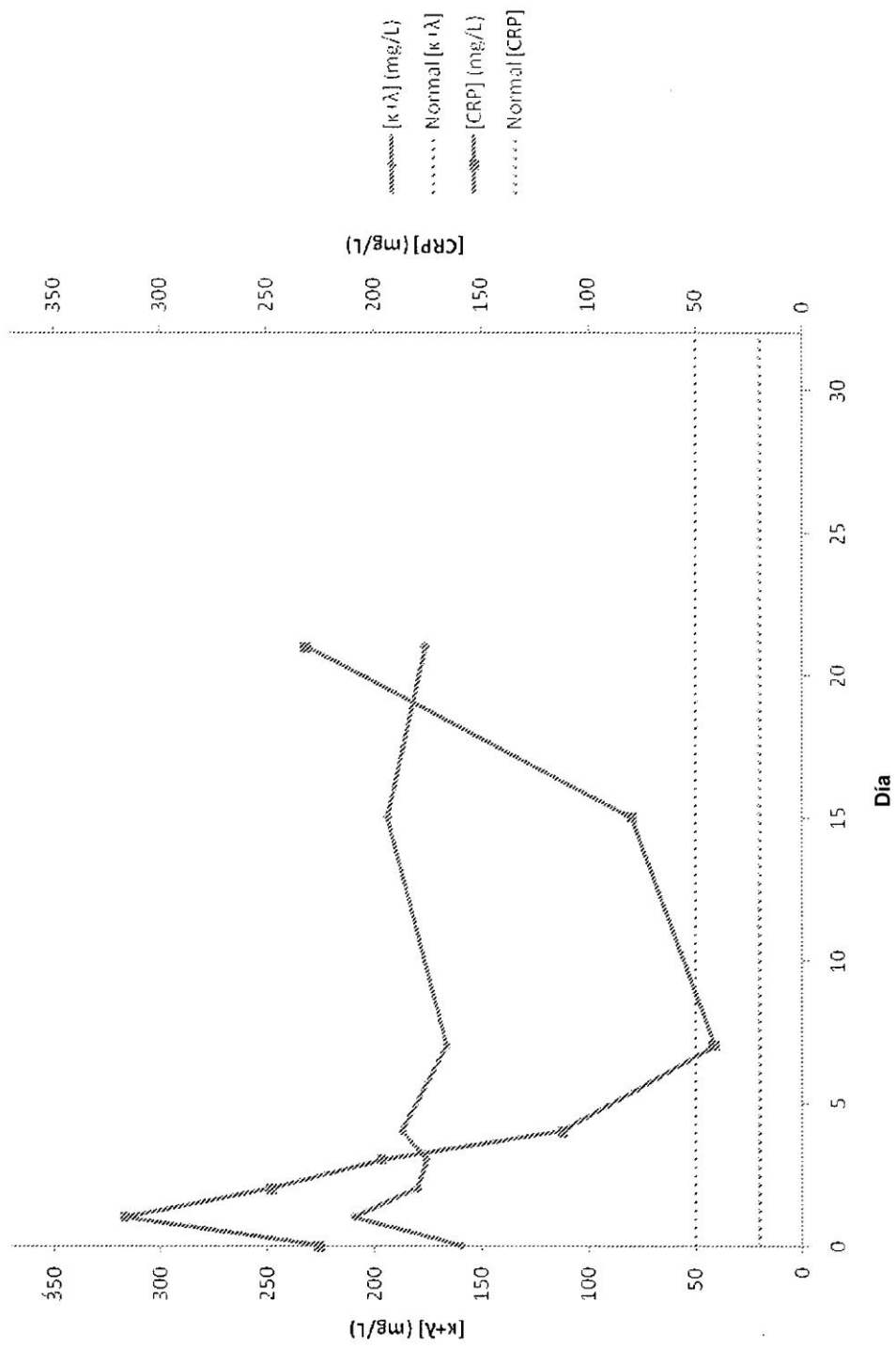


Figura 6b

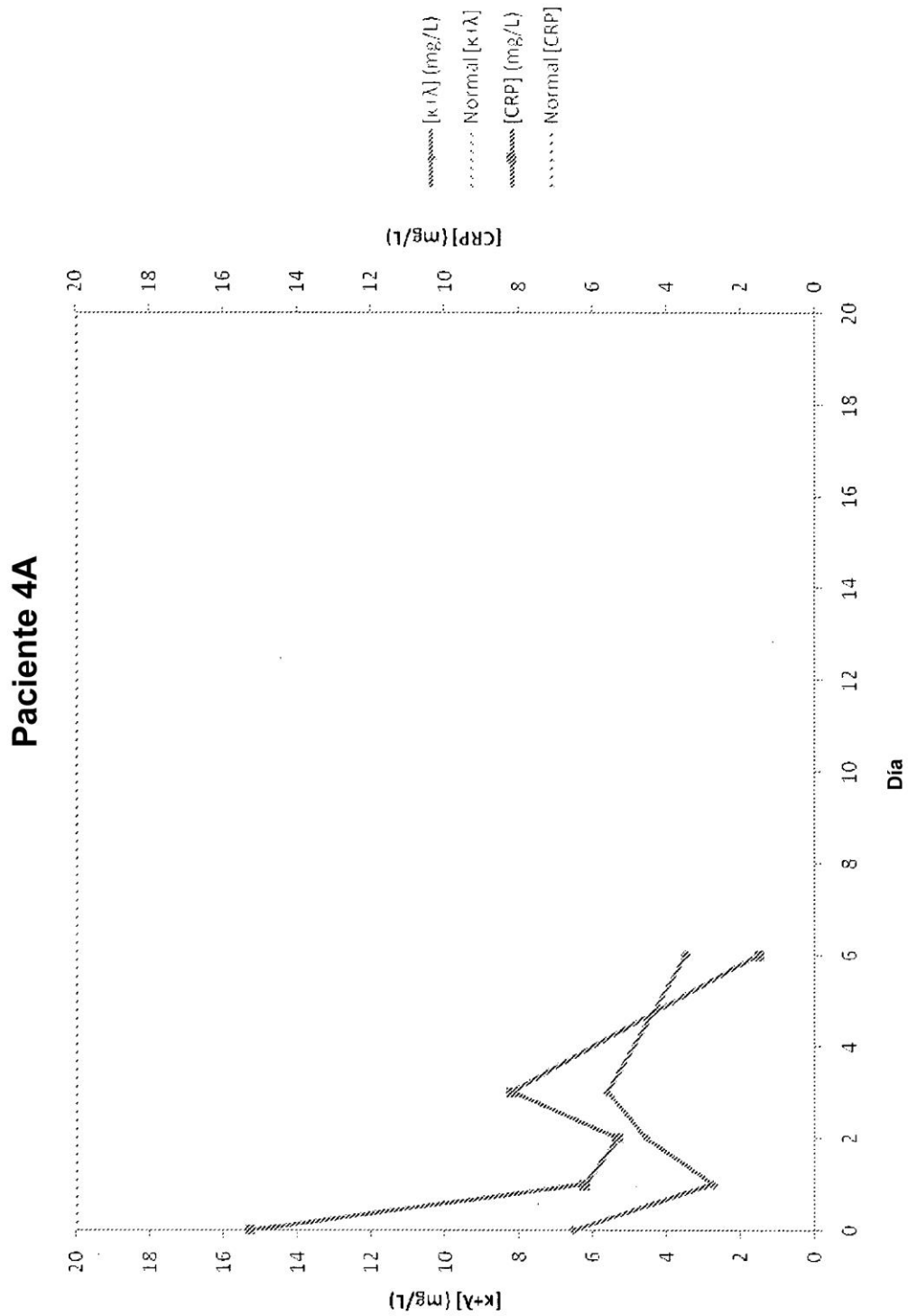


Figura 6c

Paciente 9A

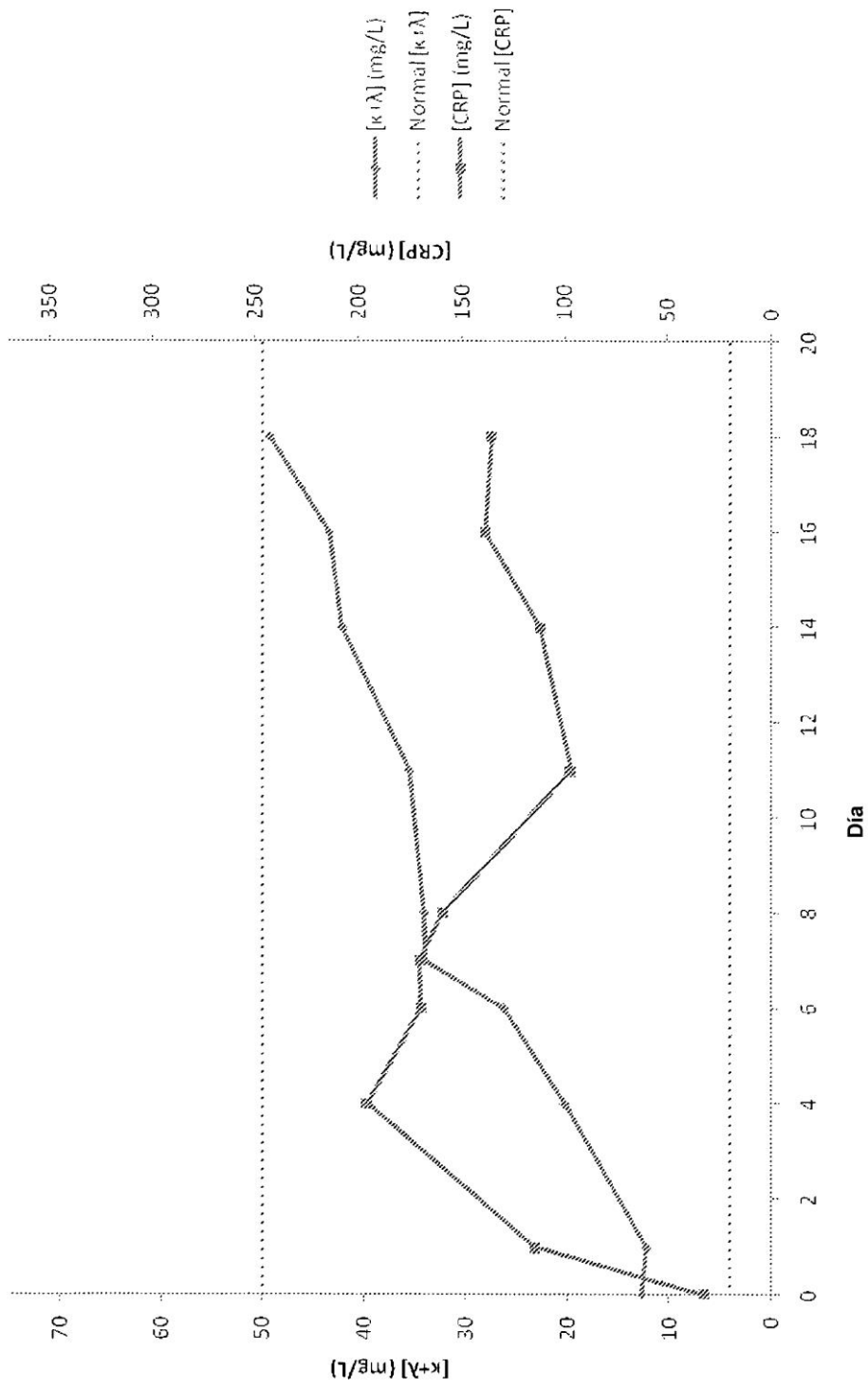


Figura 6d

Paciente 10A

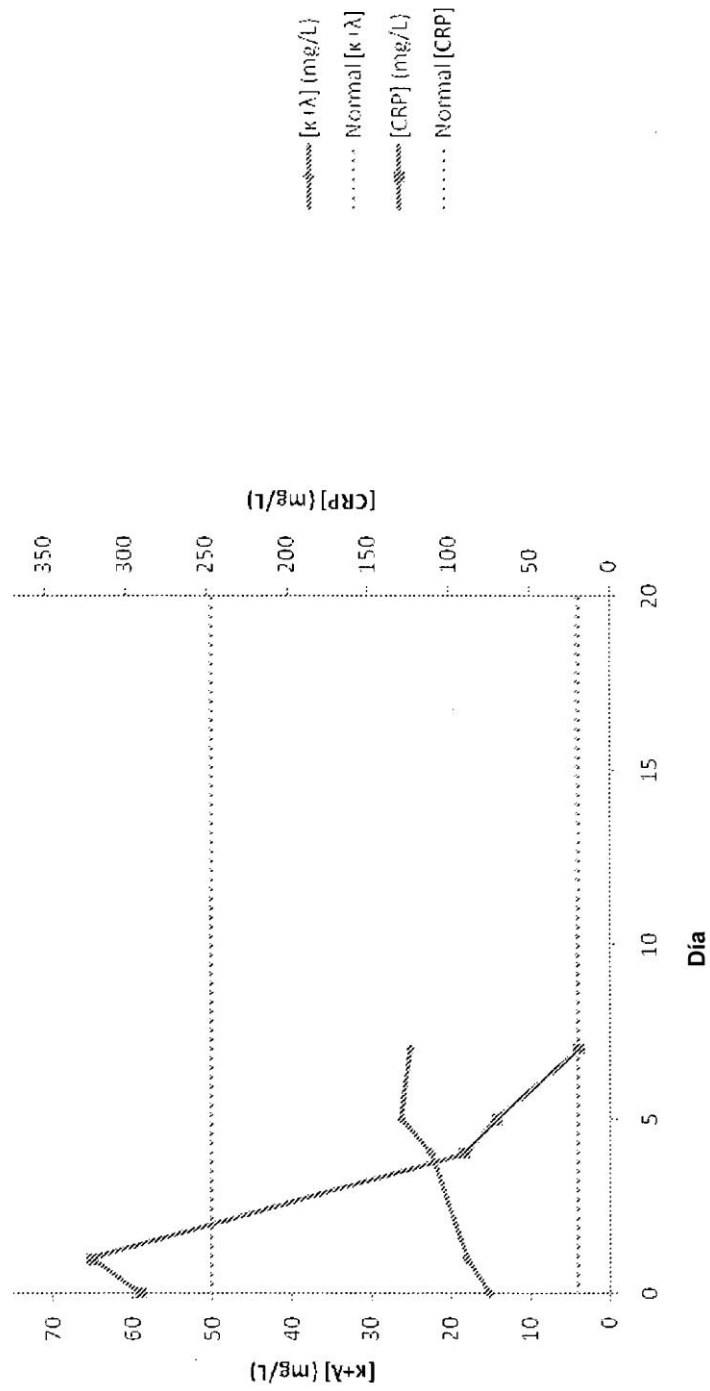


Figura 6e

Paciente 13A

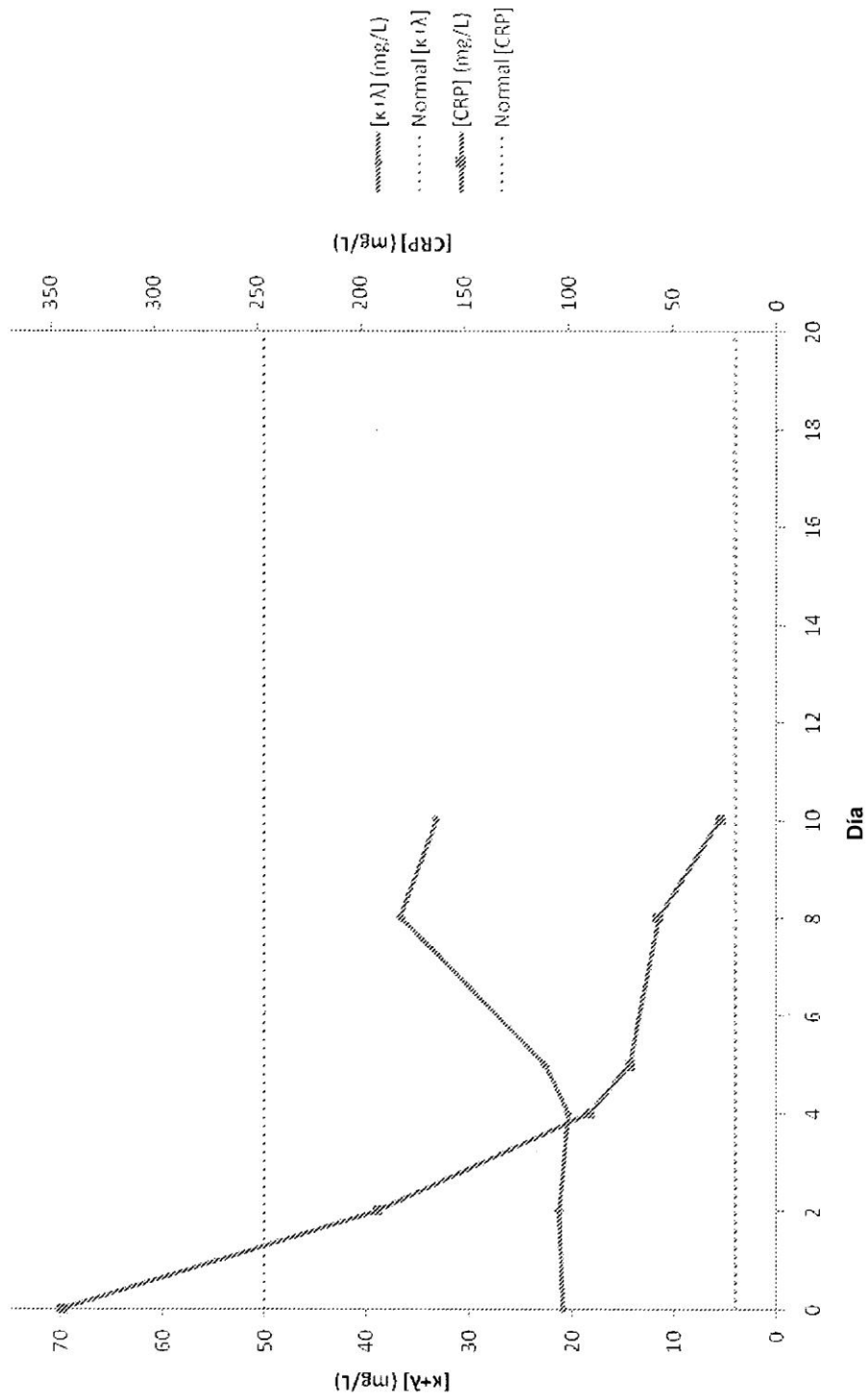


Figura 6f

Paciente 14A

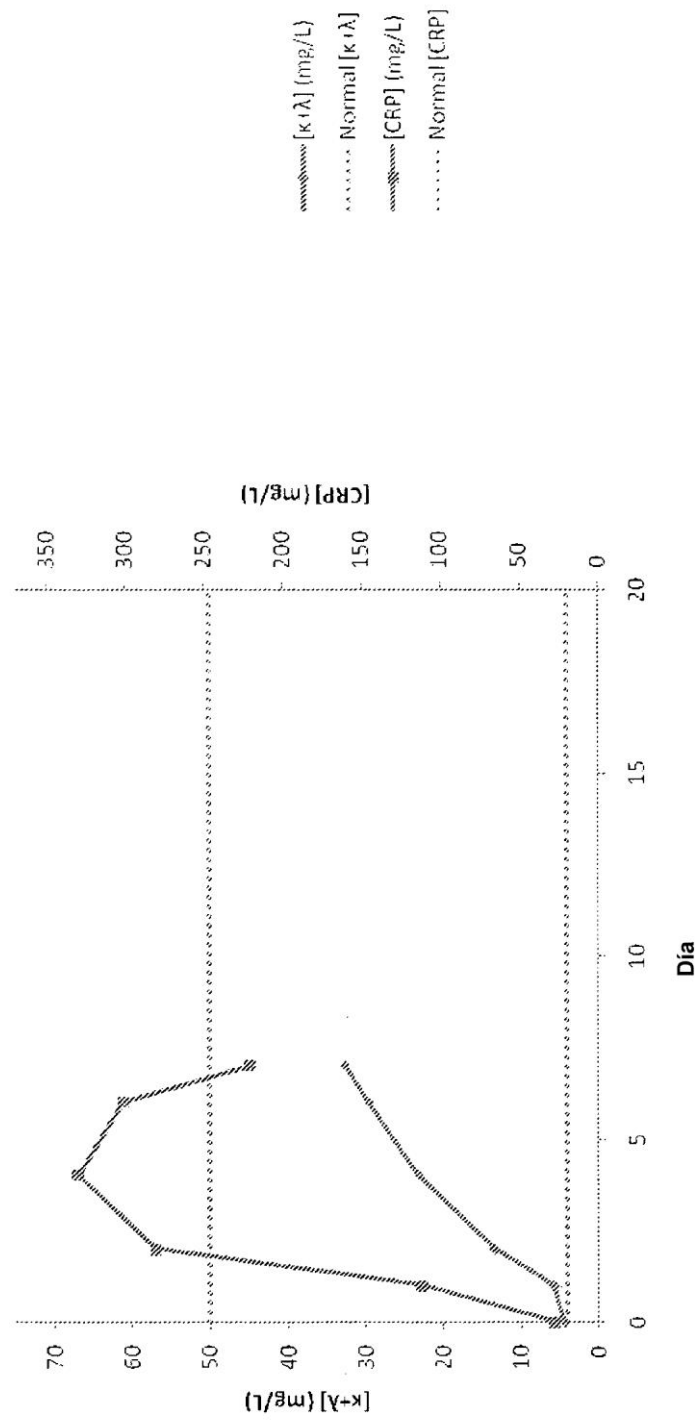


Figura 6g

Paciente 15A

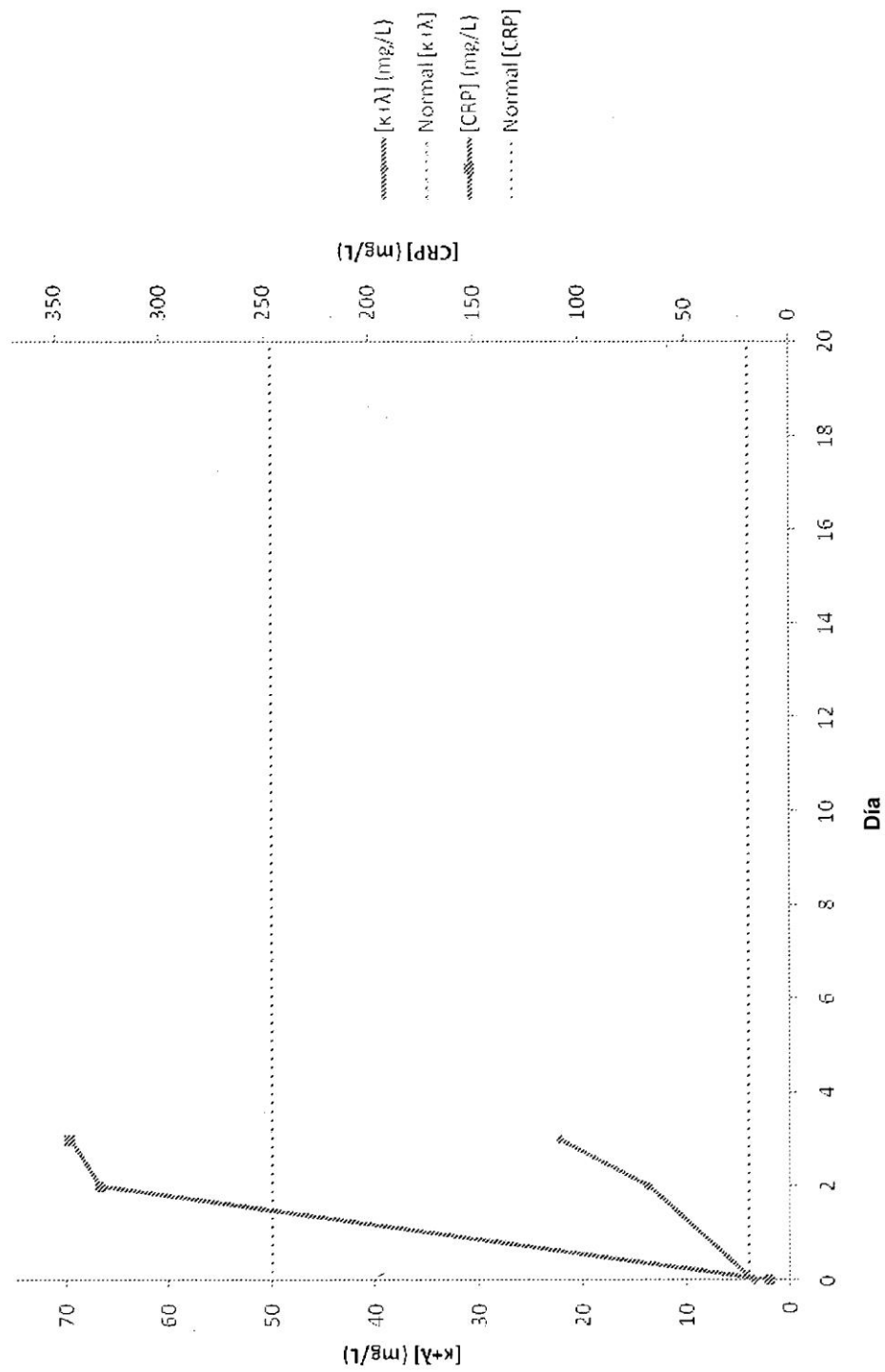


Figura 6h