

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 192**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2012 E 12806633 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2791682**

54 Título: **Ensayo**

30 Prioridad:

**12.12.2011 GB 201121265**

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

**22.01.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HARDING, STEPHEN;  
HUGHES, RICHARD y  
HUTCHISON, COLIN**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 557 192 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

- 5 La invención se refiere a métodos para identificar el riesgo de un paciente de trasplante de órgano de desarrollar o de tener trastorno linfoproliferativo post trasplante (TLPT) y para controlar el desarrollo de, o el tratamiento de TLPT, y a kits de ensayo para los métodos.

- 10 Se notifica en la literatura que la aparición del trastorno linfoproliferativo post trasplante (TLPT) después del trasplante de órganos sólidos varía de 1-30 %. La incidencia depende del tipo de trasplante de órgano sólido y de la edad del sujeto implicado. Hasta un 85 % del TLPT es de origen de células B y se asocia de forma predominante con la infección por VEB (Virus de Epstein Barr). Aunque el TLPT puede aparecer en cualquier momento post trasplante, se cree que el riesgo es mayor en los primeros años después del trasplante.

Trasplante de Órgano	Adultos (% de incidencia)	Pediátrico (% de incidencia)
Riñón	1-2,3	1,2-10,1
Hígado	1-2,8	4-15
Corazón	1-6,3	6,4-19,5
Corazón/Pulmón	2,4-5,8	6,4-19,5
Pulmón	4,2-10	6,4-19,5
Intestino Delgado	20	30
(Parker <i>et al.</i> "Diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients - BCSH and BTS Guidelines," Br J Haematol 149,5 (2010) 675-92)		

- 15 Para reducir el riesgo de rechazo de órganos los pacientes de trasplante de órgano sólido están fuertemente inmunodeprimidos. Sin embargo, esto también incrementa el riesgo de reactivación del virus de Epstein Barr (VEB) (una causa conocida de transformación de células B) debido a que provoca la supervivencia reducida de células T. El VEB es un herpesvirus que se encuentra en ~95 % de la población y normalmente no se considera un problema.
- 20 El solicitante de la patente cree que la reactivación es seguida de proliferación de células B y, en ciertos casos, conduce eventualmente a TLPT. Cuando se identifica el TLPT la respuesta inmediata es reducir la inmunodepresión (en pacientes de trasplantes la inmunodepresión frecuentemente es dirigida a las células T), lo que en determinados casos se piensa que resuelve el TLPT.
- 25 El VEB es un agente de transformación que da lugar a la inmortalización y proliferación descontrolada de células B. Normalmente este se controla mediante una respuesta de células T, sin embargo, los pacientes de trasplantes usualmente están inmunodeprimidos.

- 30 El TLPT asociado a VEB se refiere a toda linfoproliferación dirigida por VEB incluyendo linfomas, pero también a mononucleosis infecciosa post trasplante, que si se trata es en sí de menor preocupación. También se ha asociado al citomegalovirus (CMV) con TLPT. Alrededor del 20 % de casos de TLPT no están asociados con infección por VEB, aquí el TLPT se notifica a menudo como que se produce mucho más tarde después del trasplante.

Hay cuatro tipos principales:

- 35 a) Lesiones tempranas - hiperplasia plasmocítica  
 b) TLPT polimórfico - expansión policlonal o monoclonal destructiva  
 c) Monomórfico
- 40 a. TLPT de células B - linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) (el más común), linfoma de Burkitt, mieloma de células plasmáticas  
 b. TLPT de células T (raro)
- 45 d) Linfoma clásico de Hodgkin tipo TLPT (muy raro)

El solicitante de la patente se ha dado cuenta de que el TLPT parece correlacionar con la proliferación descontrolada de células B y se relaciona con infección por VEB. Las células B producen cadenas ligeras libres (CLL) dando como resultado un ascenso de muchos casos. Las CLL son relativamente fáciles de detectar y de medir permitiendo así producir un ensayo para TLPT.

- 50 Landgren *et al.*, (J, Clin, Oncol, 2010, 28, 1-7), mostraron que, en VIH, los niveles elevados de cadenas ligeras libres se asocian con un riesgo aumentado de linfoma asociado con VIH hasta 5 años antes del diagnóstico de linfoma en pacientes de VIH. Además, se ha notificado que en pacientes de linfoma se producen tanto proporciones anormales de CLL como niveles elevados. Además, Maurer *et al.*, (J, Clin, Oncol, 2011,29, 1-11) mostraron que en LDCBG no asociado a TLPT las CLL elevadas en el diagnóstico muestra una supervivencia global inferior así como una peor supervivencia libre de episodios (HR 3,7 y 2,6).
- 55

Los anticuerpos comprenden cadenas pesadas y cadenas ligeras. Usualmente tienen una simetría doble y se componen de dos cadenas pesadas idénticas y de dos cadenas ligeras idénticas, cada una conteniendo dominios de regiones variables y constantes. Los dominios variables de cada par cadena ligera/cadena pesada se combinan para formar un sitio de unión antigénico, de tal manera que ambas cadenas contribuyen a la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo. Las cadenas ligeras son de dos tipos,  $\kappa$  y  $\lambda$  y cualquier molécula dada de anticuerpo se produce con cualquier cadena ligera pero nunca con ambas. En los seres humanos hay producidas aproximadamente el doble de moléculas  $\kappa$  que de moléculas  $\lambda$ , pero esto es diferente en algunos mamíferos. Habitualmente, las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas. Sin embargo, en el suero u orina de sujetos son detectables algunas "cadenas ligeras libres" no unidas. Las cadenas ligeras libres pueden identificarse de forma específica mediante anticuerpos provocados contra la superficie de la cadena ligera libre que normalmente está oculta por la unión de la cadena ligera a la cadena pesada. En las cadenas ligeras libres (CLL) esta superficie está expuesta, permitiendo que se detecte inmunológicamente. Los kits disponibles de forma comercial para la detección de cadenas ligeras libre  $\kappa$  o  $\lambda$  incluyen, por ejemplo, a "Freelite™", fabricado por The Binding Site Limited, Birmingham, Reino Unido. Los solicitantes de la patente han identificado previamente que la determinación de la cantidad de las proporciones de cadena libre  $\kappa$ /cadena libre  $\lambda$ , ayuda en el diagnóstico en pacientes de gammopatías monoclonales. Se utilizó, por ejemplo, como una ayuda en el diagnóstico del mieloma múltiple de inmunoglobulinas intactas (MM), MM de cadena ligera, MM no secretorio, amiloidosis de LA, enfermedad por depósitos de cadenas ligeras, MM asintomático, plasmocitoma y GMSI (gammopatías monoclonales de significado incierto). La detección de CLL se ha utilizado también, por ejemplo, como una ayuda en el diagnóstico de otras discrasias de células B y, de hecho, como una alternativa al análisis de la proteína urinaria de Bence Jones para el diagnóstico de las gammopatías monoclonales en general.

Las CLL se han controlado anteriormente en pacientes de trasplantes (Proteínas de Bence Jones). Sin embargo, ha sido en la orina de pacientes para valorar la salud de los riñones trasplantados (US 2003/0232396). Los riñones dañados a menudo producen la liberación en la orina de cantidades aumentadas de CLL.

La invención proporciona un método para identificar el riesgo de un paciente de trasplante de órgano desarrollando un trastorno linfoproliferativo post trasplante (TLPT), identificar la probabilidad de tener TLPT, o de pronosticar un paciente con TLPT, comprendiendo detectar una cantidad de cadenas ligeras libres (CLL) en una muestra de un paciente, en la que una cantidad mayor que la normal o una proporción de CLL anormal en la muestra, indica un riesgo aumentado de desarrollar TLPT, de tener TLPT o de tener un mal pronóstico para el TLPT.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para controlar el progreso del TLPT en un paciente, controlar el tratamiento de un paciente con riesgo aumentado de desarrollar TLPT, o controlar el tratamiento del TLPT en un paciente, que comprende detectar una cantidad de CLL en una muestra del paciente y compararlo con una cantidad de CLL en una muestra del paciente tomada previamente.

El método puede implementarse mediante la determinación de una cantidad de la cantidad de CLL en la muestra del paciente, introduciendo la cantidad en un ordenador, donde el ordenador comprende un valor para una cantidad de CLL registrado de una cantidad normal predeterminada de CLL o de la muestra del paciente tomada previamente, comparar los dos valores utilizando el ordenador y generar un resultado del ordenador que muestra la diferencia en la cantidad de CLL detectada y/o generar un resultado de ordenador indicando un riesgo de TLPT.

El ordenador puede comprender una entrada de ordenador para introducir las cantidades de CLL, una memoria de ordenador adaptada para comparar las dos cantidades de CLL, y un resultado de ordenador para indicar la diferencia en las cantidades de CLL y/o generar resultados del riesgo de TLPT.

Después puede enviarse el producto del método (el resultado del ensayo) a un médico para hacer una valoración final del significado clínico del resultado.

El trasplante de órgano puede ser de un órgano sólido tal como un corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino, cara, piel u otro trasplante.

Los métodos se pueden combinar con, por ejemplo, biopsias de tejidos para permitir el estudio de la histología del TLPT.

Como se define anteriormente, el TLPT puede ser una lesión temprana, TLPT polimórfico, TLPT monomórfico, o el linfoma de Hodgkin tipo clásico.

Típicamente, el paciente ha tenido un trasplante de órgano.

La cantidad de CLL detectada puede ser una o más de:

- (i) la cantidad de CLL  $\kappa$
- (ii) la cantidad de CLL  $\lambda$
- (iii) la cantidad total de CLL ( $\kappa + \lambda$ ) y/o

(iv) la proporción en la muestra de la cantidad de  $\kappa$ :  $\lambda$ .

5 La valoración de riesgo de TLPT en pacientes después del trasplante de órgano, por ejemplo observando niveles elevados de CLL ( $\kappa$ ,  $\lambda$  o CLL totales), indica riesgo aumentado de TLPT y ayuda a identificar a aquellos pacientes que se beneficiarán de una gestión más estrecha de su tratamiento inmunodepresor.

Por lo tanto el método incluye de forma típica la etapa de cambio del régimen del tratamiento inmunodepresor del paciente.

10 El seguimiento de los cambios en el tratamiento después de la identificación de pacientes con riesgo aumentado, por ejemplo, identificados mediante el método del primer aspecto de la invención, o de pacientes con TLPT, permite el control del tratamiento. Una disminución de las CLL indica, por ejemplo, una respuesta positiva al tratamiento.

15 La valoración del pronóstico de TLPT permite hacer decisiones clínicas sobre la elección de, por ejemplo, tratamientos agresivos o no agresivos. Esto puede valorarse, por ejemplo, por proporciones de CLL anormales o por un nivel elevado de las CLL ( $\kappa$ ,  $\lambda$  o CLL totales).

20 Normalmente la cantidad de las CLL se compara con los niveles normales predefinidos de CLL (por ejemplo una elevación por encima de 50 mg/l, aunque puede ser menor en pacientes inmunodeprimidos). Los intervalos normales para las proporciones  $\kappa/\lambda$  son de 0,26 - 1,65 mg/l.

25 De forma preferente, antes del trasplante los pacientes no tienen síntomas de una enfermedad asociada a células B. Los síntomas pueden incluir infecciones recurrentes, dolor óseo y fatiga. Dicha enfermedad asociada a células B preferentemente no es un mieloma (tal como el mieloma de inmunoglobulina intacta, el mieloma de cadena ligera, el mieloma no secretorio), un GMSI, amiloidosis AL, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Hodgkin, linfoma de células centrolímbicas, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, leucemia de células pre-B o leucemia linfoblástica aguda. Además, el sujeto típicamente no tiene función reducida de la médula ósea.

30 La expresión "cadenas ligeras libres totales" significa la cantidad de cadenas ligeras libres  $\kappa$  y  $\lambda$  en la muestra de un paciente.

La muestra es típicamente una muestra de suero de un sujeto. Sin embargo, también se puede utilizar potencialmente sangre entera, plasma, orina u otras muestras de tejido o de fluidos.

35 Típicamente las CLL, tales como las CLL totales, se determinan mediante inmunoensayo, tal como ensayos de ELISA, Electroforesis de Proteínas de Suero (EPS), o utilizando esferas marcadas de forma fluorescente, tales como esferas Luminex™.

40 Los anticuerpos utilizados para determinar la cantidad de CLL pueden ser enteros o fragmentos de anticuerpos específicos para CLL. Ellos pueden ser policlonales o monoclonales.

45 Por ejemplo, los ensayos tipo "sándwich" usan anticuerpos para detectar antígenos específicos. Uno o más de los anticuerpos usados en el ensayo pueden marcarse con una enzima capaz de convertir un sustrato en un analito detectable. Dichas enzimas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras enzimas conocidas en la técnica. Alternativamente, en lugar de las enzimas o junto con ellas, pueden usarse otras etiquetas o marcadores detectables. Estos incluyen radioisótopos, un amplio intervalo de marcadores coloreados y fluorescentes conocidos en la técnica, incluyendo fluoresceína, Alexa flúor, Oregón Green, BODIPY, rojo de rodamina, Azul Cascade, Azul Marina, Azul Pacific, Amarillo Cascade, oro; y conjugados tales como biotina (disponible de, por ejemplo, Invitrogen Ltd., Reino Unido). También se pueden usar soles colorantes, etiquetas quimioluminiscentes, soles metálicos o látex coloreado. Se pueden usar una o más de estas etiquetas en ensayos de ELISA de acuerdo con las diversas invenciones descritas en el presente documento o alternativamente en los otros ensayos, anticuerpos marcados o kits descritos en el presente documento.

55 La construcción de ensayos tipo "sándwich" es, en sí misma, bien conocida en la técnica. Por ejemplo, se inmoviliza sobre un sustrato un "anticuerpo de captura" específico para las CLL. El "anticuerpo de captura" se puede inmovilizar sobre el sustrato mediante métodos que se conocen bien en la técnica. Las CLL en la muestra se unen mediante el "anticuerpo de captura", el que une las CLL al sustrato a través del "anticuerpo de captura".

60 Las inmunoglobulinas no unidas se pueden eliminar mediante lavado con agua.

En los ensayos de ELISA o "sándwich" se puede determinar la presencia de inmunoglobulinas unidas mediante el uso de un "anticuerpo de detección" marcado específico contra una parte de las CLL de interés diferente que el anticuerpo de unión.

65 Para detectar la unión de las CLL de interés se puede usar citometría de flujo. Esta técnica se conoce bien en la técnica para, por ejemplo, clasificación celular. Sin embargo, también se puede usar para detectar partículas

marcadas, tales como esferas, 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, Nueva York, y Flow Cytometry, First Principles (2ª Ed.) 2001, A. L. Given, Wiley Liss.

- 5 Uno de los anticuerpos de unión, tal como el anticuerpo específico para CLL, está unido a una esfera, tal como una esfera de poliestireno o de látex. Las esferas se mezclan con la muestra y el segundo anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección está marcado preferentemente con un marcador detectable, que se une a las CLL a detectar en la muestra. Esto da como resultado una esfera marcada cuando están presentes las CLL a ensayar.
- 10 También pueden usarse otros anticuerpos específicos para otros analitos descritos en el presente documento, para permitir la detección de aquellos analitos.

Después, las esferas marcadas pueden detectarse a través de citometría de flujo. Para, por ejemplo, los anticuerpos anti- $\lambda$  libre y anti- $\kappa$  libre se pueden usar diferentes marcadores, tales como diferentes marcadores fluorescentes.

15 Otros anticuerpos específicos para otros analitos, VEB, descritos en el presente documento pueden usarse también en este u otros ensayos descritos en el presente documento para permitir la detección de aquellos analitos. Esto permite determinar la cantidad de cada tipo de CLL unida simultáneamente o la presencia de otros analitos a determinar.

- 20 Alternativamente, o adicionalmente, pueden utilizarse esferas de distintos tamaños para diferentes anticuerpos, por ejemplo para diferentes anticuerpos indicadores específicos. La citometría de flujo puede distinguir entre esferas de diferente tamaño y, por lo tanto, puede determinar rápidamente la cantidad de cada CLL u otro analito en una muestra.

- 25 Un método alternativo utiliza los anticuerpos unidos a, por ejemplo, esferas marcadas de forma fluorescente tales como las esferas Luminex™, disponibles de forma comercial. Se usan diferentes esferas con diferentes anticuerpos. Las diferentes esferas se marcan con diferentes mezclas de fluoróforos, permitiendo de esta forma determinar diferentes analitos mediante la longitud de onda fluorescente. Las esferas Luminex están disponibles de Luminex Corporation, Austin, Texas, Estados Unidos de América.

- 30 Preferentemente, el ensayo utilizado es un método nefelométrico o turbidimétrico. Los ensayos nefelométricos y turbidimétricos para la detección de las CLL  $\lambda$  o  $\kappa$  y las CLL totales se conocen de forma general en la técnica. Estos tienen el mejor nivel de sensibilidad para el ensayo. Las concentraciones de las CLL  $\lambda$  y  $\kappa$  se pueden determinar de forma separada o en un único ensayo para las CLL totales encontradas. Dicho ensayo contiene anticuerpos anti-CLL  $\kappa$  o  $\lambda$  típicamente en una proporción de 60:40, pero se pueden utilizar otras proporciones, tal como 50:50.

También se pueden provocar anticuerpos contra una mezcla de cadenas ligeras  $\lambda$  libres y  $\kappa$  libres.

- 40 Preferentemente, el ensayo es capaz de determinar las CLL, por ejemplo las CLL totales, en la muestra, por ejemplo desde aproximadamente 1 mg/l a 100 mg/l, o 1 mg/l - 80 mg/l. Esto detecta la concentración de CLL en suero en una inmensa mayoría de sujetos sin la necesidad de re-ensayar las muestras a una dilución diferente.

- 45 Preferentemente, el método comprende detectar la cantidad de cadena ligera libre total en la muestra utilizando un inmunoensayo, por ejemplo, mediante la utilización de una mezcla de anticuerpos anti-cadena ligera libre  $\kappa$  y anti-cadena ligera libre  $\lambda$ , o fragmentos de los mismos. Dichos anticuerpos pueden estar en una proporción de 50:50 de anticuerpos anti- $\kappa$ : anti- $\lambda$ . Los anticuerpos, o fragmentos, unidos a CLL pueden detectarse de forma directa mediante el uso de anticuerpos o fragmentos marcados, o indirectamente usando anticuerpos marcados contra los anticuerpos anti- $\lambda$  libre o anti- $\kappa$  libre.

- 50 Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los policlonales pueden usarse puesto que permiten detectar alguna variabilidad entre cadenas ligeras del mismo tipo, dado que se provocan contra diferentes partes de la misma cadena. La producción de anticuerpos policlonales se describe, por ejemplo, en el documento WO97/17372.

- 55 Están disponibles kits de ensayo comerciales para medir CLL (Freelite™ y Combylite™, The Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido).

- 60 Se proporcionan kits de ensayo para su uso en un método de acuerdo a la invención como se define en la reivindicación 10, que comprenden uno o más anticuerpos (o fragmentos) anti-CLL y uno o más anticuerpos anti-VEB o fragmentos específicos para VEB. Se conocen en general antígenos que son indicadores para VEB. Para caracterizar adicionalmente el trastorno, se pueden proporcionar anticuerpos para tales indicadores.

- 65 Se pueden adaptar los kits de ensayo para detectar en una muestra una cantidad de cadena ligera libre total (CLL) por debajo de 25 mg/l, muy preferentemente, por debajo de 20 mg/l o aproximadamente, 10 mg/l, por debajo de 5 mg/l o 4 mg/l. Típicamente, el material calibrador mide en el intervalo de 1-100 mg/l. El kit de ensayo puede ser, por

ejemplo, un kit de ensayo nefelométrico. El kit preferentemente es un kit de inmunoensayo que comprende uno o más anticuerpos contra CLL. Típicamente, el kit comprende una mezcla de anticuerpos contra CLL anti- $\kappa$  y anti- $\lambda$ . Típicamente, se utiliza una mezcla de 50:50 de anticuerpos anti- $\kappa$  libre y anti- $\lambda$  libre. El kit se puede adaptar para detectar en una muestra una cantidad de 1-100 mg/l, o preferentemente 1-80 mg/l de cadena ligera libre total.

5 También se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos que son capaces de unir CLL o VEB según sea apropiado, tales como anticuerpos (Fab)<sub>2</sub> o Fab.

10 Los anticuerpos o fragmentos pueden estar marcados, por ejemplo con un marcador como se describe anteriormente. Para detectar anti- $\lambda$  libre o anti- $\kappa$  libre unidos a CLL, se pueden proporcionar anticuerpos de unión anti-inmunoglobulina marcados, o fragmentos de los mismos.

15 El kit puede comprender fluidos calibradores para permitir calibrar el ensayo en los intervalos indicados. Los fluidos calibradores contienen preferentemente concentraciones predeterminadas de CLL, por ejemplo 100 mg/l a 1 mg/l, por debajo de 25 mg/l, por debajo de 20 mg/l, por debajo de 10 mg/l, por debajo de 5 mg/l o a 1 mg/l. El kit también se puede adaptar mediante la optimización de la cantidad de anticuerpo y de proteína "bloqueante" recubriendo las partículas de látex y, por ejemplo, mediante la optimización de las concentraciones de reactivos complementarios tales como las concentraciones de polietilenglicol (PEG). El kit puede comprender, por ejemplo, una pluralidad de controles estándar para las CLL. Los controles estándar pueden utilizarse para validar una curva estándar para las concentraciones de CLL u otros componentes a producir. Dichos controles estándar confirman que las curvas estándar previamente calibradas son válidas para los reactivos y condiciones usados. Estos típicamente se usan sustancialmente al mismo tiempo que los ensayos de las muestras de los sujetos. Los estándares pueden comprender uno más estándares por debajo de 20 mg/l de CLL, más preferentemente por debajo de 15 mg/l, por debajo aproximadamente de 10 mg/l o por debajo de 5 mg/l, para permitir calibrar el ensayo a las concentraciones más bajas de cadena ligera libre.

20 El kit de ensayo puede ser un kit nefelométrico o turbidimétrico. Puede ser un ensayo de ELISA, de citometría de flujo, fluorescente, quimioluminiscente o del tipo de esferas, o de tiras reactivas. Dichos ensayos se conocen en general en la técnica.

30 El kit de ensayo también puede comprender instrucciones para usarse en el método de acuerdo a la invención. Las instrucciones pueden comprender una indicación de la concentración de cadena ligera libre considerada un valor normal por debajo del cual o, de hecho, por encima del cual, muestra una indicación de la probabilidad aumentada o disminuida de TLPT del sujeto, o una posibilidad aumentada de que esté presente TLPT, por ejemplo, o de que tiene un mal pronóstico. Dichas concentraciones pueden ser como se define anteriormente.

35 Se describirá ahora la invención solamente por medio de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras:

40 Los datos a continuación se basan en una cohorte de pacientes trasplantados de riñón, el solicitante de la patente ha examinado de forma específica dos grupos dentro de la cohorte. El primero es un conjunto de pacientes trasplantados de riñón (n=351), quienes después de un seguimiento variable aunque significativo no han mostrado haber desarrollado cáncer ni TLPT específicamente; los niveles de cadena ligera libre se determinaron en una única muestra de suero tomada a diferentes tiempos pos-trasplante, la mediana del tiempo de seguimiento después de la recolección de la muestra fue de alrededor de 1700 días. El segundo conjunto de pacientes trasplantados de riñón

45 (n=5), había desarrollado TLPT en algún momento durante el seguimiento; los niveles de cadena ligera libre se determinaron en una única muestra de suero tomada después del trasplante, en estos pacientes el TLPT se desarrolló entre los 314 y 1594 días después de la recolección de la muestra. La mediana del nivel de cadenas ligeras libres combinadas en el grupo sin TLPT fue menor de 50 mg/l, mientras que en el grupo de pacientes que posteriormente desarrollaron TLPT la mediana del nivel de cadenas ligeras libres combinadas fue mayor de 60 mg/l.

50 El número de pacientes con TLPT era bajo, sin embargo, la diferencia en las medianas de los niveles de cadenas ligeras libres combinadas entre los dos grupos fue sustancial (>20 %).

Paciente de TLPT	Días: Trasplante hasta muestra	Kappa (mg/l)	Lambda (mg/l)	Total (mg/l)	Proporción Kappa/Lambda	Días: Muestra hasta TLPT
1	3121	33,30	41,80	75,10	0,80	1136
2	2124	28,10	31,00	59,10	0,91	314
3	662	16,50	14,40	30,90	1,15	1101
4	589	25,80	36,50	62,30	0,71	1594
5	742	19,10	56,50	75,60	0,34	964
Mediana		25,8	36,5	62,3		1101

55 El análisis de los niveles de CLL totales en las dos poblaciones (351 Tx pacientes y 5 Tx con TLPT) utilizando análisis de distribución (prueba de Rachas de Wald-Wolfowitz de muestras independientes) y la comparación de las Medianas (prueba de medianas de muestras independientes) mostraron que había una distribución

significativamente diferente entre los dos grupos ( $p < 0,001$ ) y, por lo tanto, sería improbable que una observación vista en el grupo de control pudiese estar presente en el grupo de prueba. El análisis de los valores de las medianas mostró una tendencia hacia la significación ( $p = 0,175$ ), lo que refleja el bajo número de muestras de pacientes de TLPT probadas.

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para identificar el riesgo de un paciente de trasplante de órgano de desarrollar trastorno linfoproliferativo post trasplante (TLPT), identificar la probabilidad de que el paciente tenga TLPT, o identificar un pronóstico de un paciente con TLPT, que comprende detectar una cantidad de cadenas ligeras libres (CLL) en una muestra del paciente, donde una cantidad mayor de lo normal de CLL o una proporción anormal de CLL en la muestra, indica un riesgo aumentado de desarrollar TLPT, de tener TLPT o de tener un mal pronóstico para el TLPT.
- 10 2. Un método para controlar el progreso del TLPT en un paciente, de tratamiento de pacientes con riesgo aumentado de desarrollar TLPT, o de control del tratamiento de TLPT en un paciente que comprende detectar una cantidad de CLL en una muestra de un paciente y compararla con una cantidad de CLL de una muestra de un paciente tomada previamente.
- 15 3. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que la cantidad de CLL detectada se selecciona de la cantidad de CLL  $\lambda$ , la cantidad de CLL  $\kappa$ , la cantidad total de CLL y la proporción de CLL  $\kappa:\lambda$  en la muestra.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el paciente ha recibido un órgano sólido de un donante.
5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en las que las CLL se determinan en una muestra de orina, suero, sangre o plasma de un sujeto.
- 25 6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en las que las CLL totales se determinan mediante inmunoensayo utilizando anticuerpos anti-cadena ligera libre.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en la que los anticuerpos son una mezcla de anticuerpos anti-cadena ligera  $\kappa$  libre y anti-cadena ligera  $\lambda$  libre.
- 30 8. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, en las que el método comprende detectar la cantidad de CLL mediante nefelometría o turbidimetría.
- 35 9. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, en las que el sujeto no tenía síntomas de una enfermedad asociada a células B, antes del trasplante.
- 40 10. Un kit de ensayo para su uso en el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 que comprende adicionalmente instrucciones para usarse en el método y uno o más anticuerpos anti-CLL o fragmentos de los mismos capaces de unir CLL y uno o más anticuerpos anti-Virus Epstein Barr (VEB) o fragmentos de los mismos, capaces de unirse a VEB.
11. Un kit de ensayo de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende adicionalmente un valor normal contra el cual una concentración de CLL obtenida utilizando el kit de ensayo, indica un riesgo aumentado de desarrollar TLPT o de tener TLPT.