

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 380**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2012** **E 12177651 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016** **EP 2551673**

54 Título: **Método para la detección de infiltración cancerosa en el sistema nervioso central**

30 Prioridad:

26.07.2011 US 201161511633 P

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

25.05.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas 1
37008 Salamanca, ES**

72 Inventor/es:

**ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE, JOSÉ
ALBERTO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

ES 2 571 380 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 para la detección de infiltración cancerosa en el sistema nervioso central

La presente invención hace referencia al área del diagnóstico médico. Proporciona métodos y kits para detectar la presencia de infiltración de linfocitos B cancerosos en muestras del líquido cefalorraquídeo.

5 Antecedentes

Durante décadas, el análisis citomorfológico de preparaciones de "cytospin" de líquido cefalorraquídeo (LCR) ha sido considerado como el estándar de oro para el diagnóstico del compromiso leptomeníngeo en linfomas del sistema nervioso central tanto primarios como secundarios, al mismo tiempo, también contribuye al diagnóstico de otros tumores hematológicos y no hematológicos que están localizados en el sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés). Aunque tales análisis citológicos convencionales del LCR se asocian con una alta especificidad para la identificación de enfermedad del CNS en pacientes con linfoma y otros tipos de cáncer, también se han reunido evidencias sobre su limitada sensibilidad con una frecuencia de entre un 20% y un 60% de resultados de falso negativo (Chamberlain et al, *Sem Oncol* 2009; 36: s35-s45). Más recientemente, múltiples estudios han mostrado que el inmunofenotipado por citometría de flujo de las células presentes en las muestras de LCR, proporciona un enfoque igualmente específico pero mucho más sensible para la detección de enfermedad leptomeníngea en linfomas no Hodgkin de linfocitos B agresivos (B-NHL) y en otras malignidades mieloides y linfoides además de en tumores sólidos (Subira et al *HIV Med* 2005, 6: 21-26; Quijano et al *J Clin Oncol*, 2009; 27: 1462-1469; Bromberg et al *J Neurology* 2007; 68: 1674-1679; Hedge et al *Blood* 2005, 105: 496-502). Entre los casos de linfomas, tal incremento de sensibilidad está asociado con un resultado poco alentador para el paciente debido al incremento en las tasas de recaída sistémica y del CNS (Hedge et al, *Blood* 2005, 105: 496-502; Sancho et al, *Eur J Haematol* 2010). A pesar del incremento de la sensibilidad de la citometría de flujo de múltiples parámetros versus los procedimientos citológicos convencionales, aún una proporción significativa de pacientes que no muestran linfocitos B neoplásicos u otras células tumorales en su LCR, ni mediante citometría de flujo ni mediante citología convencional, muestran síntomas neurológicos con una alta probabilidad de presentar compromiso del CNS por linfoma u otro tipo de tumor, con o sin resultados compatibles con un diagnóstico de compromiso tumoral del CNS mediante imagen por resonancia magnética (IRM) y otras técnicas de obtención de imágenes. En paralelo, aún una fracción significativa de todas las recaídas del CNS que ocurren, por ejemplo, con LNH-B agresivos implican pacientes que mostraron citometría de flujo negativa (FCM-)/citología convencional (CC-) CSF. En conjunto, estos resultados señalan la necesidad de enfoques más sensibles para detectar compromiso del CNS entre los LNH-B agresivos y también otros tumores hematológicos y no hematológicos.

A este respecto, se ha sugerido que en tales casos, los resultados de falso negativo de FCM y CC podrían deberse a la existencia de infiltración parenquimal por parte de las células tumorales, en ausencia de un compromiso leptomeníngeo. Aunque la demostración definitiva de tal hipótesis aún ha de ser establecida, podría especularse que mientras en casos que muestran compromiso leptomeníngeo, las células de linfoma podrían alcanzar el LCR fácil y rápidamente, permitiendo su detección mediante FCM y/o CC, en casos en los que el compromiso del CNS está restringido a localizaciones parenquimales, las células tumorales no se extenderían fácilmente al líquido cefalorraquídeo (o al humor vítreo). Sin embargo, bajo tales circunstancias sería de esperar que debido al incremento de la regeneración celular, un incremento en la liberación de proteínas de células tumorales solubles, ARN, ADN y otros componentes celulares por parte de células tumorales vivas o muertas podría hacer que sus niveles en el LCR (y/o el humor vítreo) fueran detectables. De hecho, se han descrito algunos estudios en los que la cantidad de proteínas asociadas a la respuesta inmune celular específica (pero no relacionada con tumores), por ejemplo, CD27 (Kersten et al, *Blood* 1996, 87: 1985-1989; Murase et al, *Cancer Lett* 1998, 132: 181-186), cadenas ligeras libres (Hildebrandt et al *BMC cancer*, 2007, 7: 185; Schroers et al *Eur J Haematol* 2010, 85: 236-242) y antitrombina (Roy et al, *J Clin Oncol* 2008, 26: 96-105) que son detectadas en el LCR de pacientes con múltiples enfermedades del CNS, a pesar de tales mediciones, proporcionaron resultados poco eficaces en cuanto al diagnóstico. Es de destacar que ninguna de estas proteínas son específicas de tumores, y podrían no estar directamente ligadas con la muerte celular y/o la secreción activa por parte de las células tumorales. Se han analizado también otras proteínas detectadas en el LCR mediante métodos diferentes. Este es el caso por ejemplo de las siguientes publicaciones. En Bach F, et al. (*Cancer* 1993; 72(8):2376-2382) se analizaron los niveles de antígeno polipeptídico tisular y de la isoenzima creatinquinasa BB en el LCR de pacientes con cáncer que se sospecha que pueden presentar metástasis en el CNS, mediante ensayo inmunoradiométrico de dos sitios y ensayo de bioluminiscencia. En Fujimaki T et al. (*Jpn J Clin Oncol*, 2000; 30(7):291-294) se investiga la gonadotropina coriónica humana en pacientes con tumores de células germinales tal como se mide mediante inmunoensayo enzimático, para la monitorización de la recurrencia tumoral o la evaluación de los resultados del tratamiento. En Oschmann P et al. (*Acta Neurol Scand*, 1994; 89(5):395-399) se investigó la proteína de la superficie celular CA 15-3 (mucin-1, CD227) según se detecta mediante un inmunoensayo enzimático en pacientes con carcinomatosis manígea como biomarcador de la enfermedad, además de un indicador precoz para determinar la recaída clínica. Figarella-Branger D et al. (*J Clin Oncol*, 1996; 14(7):2066-2072) observaron que los niveles de la molécula de adhesión celular neuronal con adición de ácido polisialílico (PSA-NCAM), una proteína de la superficie celular, es un biomarcador para el meduloblastoma; a su vez, Murase S et al. (*Neurol Res*, 2000; 22(5):434-442) reveló que los

niveles de sCD27 en el LCR, según se mide mediante un ensayo ELISA tipo sándwich, es de utilidad como marcador tumoral para el linfoma primario del CNS en pacientes inmunocompetentes, además de ser un marcador para la evaluación del efecto de diversos tipos de tratamiento para el linfoma primario del CNS. Sin embargo, ninguno de estos estudios o cualquier otro informe describen o sugieren el método de la presente invención.

5 Descripción de la invención

Se describe un método para determinar la presencia de una o más proteínas obtenidas de células tumorales que son liberadas por las células en el compartimento extracelular, en una forma que es soluble en un fluido, y/o para cuantificar sus cantidades en una muestra biológica del sistema nervioso central, preferiblemente en una muestra de líquido cefalorraquídeo, para evaluar la existencia de infiltración en el sistema nervioso central por parte de células tumorales en un paciente, donde el método comprende las etapas de:

- 10
- a. Proporcionar una muestra biológica del sistema nervioso central del sujeto,
 - b. Capturar una o más proteínas o fragmentos peptídicos obtenidos de dichas proteínas, en una plataforma sólida compuesta de uno o más pocillos de placa para ensayo ELISA, inmunoperlas o spots (puntos) de matrices de superficie plana, a través de un conjunto de una o más sondas o un conjunto de sondas solubles, y
 - c. detectar y/o cuantificar dichas, una o más, proteínas de células tumorales, o fragmentos peptídicos obtenidos de dichas proteínas o sus secuencias específicas de ADN o ARN.
- 15

Los procedimientos están basados en la detección de proteínas asociadas a y/o específicas de células tumorales en muestras de líquido cefalorraquídeo. Tales proteínas son liberadas en el compartimento extracelular debido a la muerte celular, lisis celular o a la secreción y liberación activa por parte de las células tumorales. Para detectar tales proteínas y sus fragmentos, una o múltiples parejas de anticuerpos u otras sondas, específicas para una secuencia de aminoácidos de dichas proteínas tumorales y sus fragmentos, se utilizan en ensayos de inmunoanálisis multiplex convencionales y de tipo "sándwich", mientras que para moléculas de ARN y ADN se emplean técnicas moleculares basadas en la PCR convencional. Estos ensayos incluyen ensayo ELISA convencional, otros ensayos con inmunoperlas de citometría de flujo multiplex o único, o spots de matrices de superficie plana. Pueden utilizarse solos o en combinación con inmunofenotipado por citometría de flujo inmunocitoquímica, citomorfológica convencional y enfoques diagnósticos moleculares para la detección simultánea de la presencia de proteínas solubles, ADN y/o ARN, además de células tumorales completas. Tales ensayos pueden aplicarse al cribado para el diagnóstico de enfermedad tumoral del CNS tanto en pacientes que se sospecha presentan un tumor como a los que se les ha diagnosticado un tumor, además de para la evaluación de la efectividad de un tratamiento en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) procedentes de pacientes con un diagnóstico de enfermedad del CNS debido a una infiltración por parte de un linfoma, leucemia o un tumor sólido. El ensayo puede además incluir una o más inmunoperlas, pocillos de placas ELISA o spots de micromatrices de superficie plana para la determinación simultánea de la presencia de infiltración en sangre, a través de la detección y cuantificación de proteínas de los glóbulos rojos (por ejemplo, hemoglobina y hemoglobina glicosilada) en combinación, o no, con la medición de glóbulos rojos no nucleados.

20

25

30

35

El primer aspecto de la presente invención hace referencia a un método para detectar la presencia de infiltración en el sistema nervioso central por parte de linfocitos B cancerosos en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto, que comprende determinar la presencia de la proteína CD19 soluble, obtenida de células tumorales, liberada desde células tumorales en el LCR, que comprende los pasos de:

- a. Proporcionar una muestra biológica de LCR del sujeto,
 - b. Capturar la proteína CD19 soluble asociada a células tumorales en una plataforma sólida compuesta de al menos un pocillo de placa para ELISA, una inmunoperla o una matriz de spot en superficie plana, a través de al menos una sonda, y
 - c. Detectar y/o cuantificar dicha proteína soluble asociada a células tumorales, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin de linfocitos B agresivo, linfoma no Hodgkin de linfocitos B de bajo grado y leucemia linfocítica B crónica.
- 40
- 45

Dichas proteínas pueden ser estudiadas en muestras frescas de líquido cefalorraquídeo o pueden ser investigadas en muestras conservadas, fijadas y congeladas, directamente o después de ser tratadas con inhibidores de proteasa.

50

La proteína de la presente invención es el producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos. Esta secuencia de nucleótidos puede ser cualquier ARN como por ejemplo, pero sin limitarse a ello, ARN mensajero

(ARNm), o un fragmento del mismo. Esta secuencia de nucleótidos puede además ser ADN complementario (ADNc) o un fragmento del mismo. El ADNc es ADN complementario de un ARNm o es también la secuencia de nucleótidos que comprende exones de una secuencia genómica pero no intrones, es decir, la secuencia de codificación. La transcripción tanto de la secuencia genómica de un gen como de su ADNc codifican el mismo ARNm y, por lo tanto, codifican la misma proteína.

Preferiblemente, además se detecta al menos una de las proteínas solubles asociadas a células tumorales seleccionadas de CD20, CD21, CD24 y CD22. Más preferiblemente, además se detecta al menos una de las proteínas solubles asociadas a células tumorales seleccionadas de CD23, CD3, TCRVbeta, TCRValfa, TCRVgamma, CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1, MLL-AF4, CD117, MPO, Triptasa, CD13, CD33, CD15, CD14, CD36, CD64, lisozima, EGFR, CK8, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Her2/neu y PSA. Más preferiblemente, las proteínas a ser identificadas y cuantificadas pueden ser seleccionadas del siguiente grupo de proteínas humanas o combinaciones de las mismas: CD19, CD20, CD21, CD23 y CD24 en caso de LNH-B y leucemias de linfocitos B crónicas. En una realización preferida, la proteína CD19 se combina con al menos una proteína soluble seleccionada del grupo de proteínas humanas o combinaciones de las mismas: CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1, MLL-AF4, en caso de que las células cancerígenas sean de leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B y linfoma linfoblástico de precursores de linfocitos B. Las proteínas mencionadas anteriormente se denominan en la presente invención como las "proteínas de la invención".

Dichas proteínas pueden corresponder a proteínas intracelulares (por ejemplo, proteínas citoplásmicas, proteínas de orgánulos y proteínas nucleares), a proteínas celulares enlazadas a la membrana, o combinaciones de ambas; pueden ser proteínas estructurales, factores de transcripción, proteínas de fusión obtenidas a partir de translocaciones cromosómicas, inmunoglobulinas idiotípicas y moléculas receptoras de linfocitos T idiotípicas, proteínas mutadas, receptores funcionales, moléculas de adhesión y cualquier tipo de proteínas específicas de tumores o asociadas a tumores.

El paso (c) del método hace referencia a la detección y la cuantificación de proteínas de la presente invención o a su detección o a su cuantificación.

En una realización preferida de esta invención dichas proteínas pueden ser detectadas y/o cuantificadas mediante ensayo con inmunoperlas por citometría de flujo en los que dos o más poblaciones de perlas, cada una específica para una proteína distinta, se incuban simultáneamente en pasos secuenciales con la muestra y un anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia y se miden en el citómetro de flujo.

En otra realización de esta invención, dichas proteínas se detectan mediante cromatografía electroforética, ensayos de inmunoperlas basados en micromatrices y otros inmunoensayos.

Dichos inmunoensayos son ensayos bioquímicos que miden la concentración de una sustancia en un líquido biológico utilizando la reacción de anticuerpo o anticuerpos a su antígeno, o cualquier otra sonda a un ligando en forma de secuencia de aminoácidos. El ensayo se aprovecha de la unión específica de un anticuerpo a su antígeno. La detección de la cantidad de anticuerpo o antígeno puede lograrse mediante una variedad de métodos. Uno de los más comunes es marcar o bien el antígeno/ligando o el anticuerpo/sonda. El marcador puede comprender, pero sin limitarse a, una enzima, radioisótopos (radioinmunoensayo), incluyendo isótopos estables, marcadores magnéticos (inmunoensayo magnético) o fluorescencia, y también otras técnicas entre las que se incluyen aglutinación, nefelometría, turbidimetría o ensayo Western Blot. Los inmunoensayos heterogéneos pueden ser competitivos o no competitivos. El inmunoensayo puede ser competitivo: la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra; o puede ser no competitivo (también denominado como "ensayo de tipo sándwich"): los resultados son directamente proporcionales a la concentración del antígeno. Una técnica de inmunoensayo que puede ser utilizada en la presente invención es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés).

En las plataformas sólidas, los pares de anticuerpos específicos para dichas proteínas de longitud completa se utilizan para anclar y detectar la presencia de la proteína.

En una realización preferida de esta invención, dichas proteínas se detectan en la superficie de inmunoperlas simultáneamente con células del líquido cefalorraquídeo mediante citometría de flujo, citometría de imagen, citometría por barrido láser o cualquier otra técnica de citometría.

En otra realización de esta invención, dichas proteínas se detectan sobre la superficie de inmunoperlas simultáneamente con ARNm, miARN o ADN obtenido de células utilizando técnicas convencionales basadas en productos amplificados por medio de la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa de secuencias de ácidos nucleicos.

5 La detección y/o cuantificación de cualquier proteína de la invención o cualquier combinación de las mismas, puede llevarse a cabo mediante la combinación de cualquiera de las técnicas previas. La proteína puede ser detectada evaluando su presencia o ausencia, o cuantificada. La detección puede realizarse por su reconocimiento específico mediante cualquier sonda y/o anticuerpo. También la proteína detectada de la invención puede ser cuantificada de manera que sirva como referencia para comparar estos datos con valores estándar para encontrar cualquier desviación estándar.

En otra realización de esta invención, dichas proteínas asociadas a tumores se detectan y/o cuantifican simultáneamente o en paralelo con proteínas específicas de glóbulos rojos, para evaluar la existencia potencial de contaminación con sangre del líquido cefalorraquídeo y sus niveles.

10 Basándose en el procedimiento descrito anteriormente, se pueden idear y construir kits específicos para la detección de infiltración en el líquido cefalorraquídeo por parte de linfocitos B cancerosos. Como ejemplo, puede utilizarse un kit compuesto de pares de pares de reactivos anti-CD19 y anti-CD21 o anti-CD19 y anti-CD24, o de reactivos anti-CD19 y anti-CD20, para detectar infiltración por parte de linfocitos B tumorales en casos de linfomas no Hodgkin de linfocitos B agresivo, tales como el linfoma de Burkitt y linfoma de linfocitos B grandes. En otro ejemplo está
15 compuesto de anticuerpos dirigidos contra las proteínas CD34, CD19, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1 y MLL-AF4 o cualquier combinación de las mismas. Todos estos ejemplos son ejemplos ilustrativos pero no limitativos.

20 Por tanto, la presente invención describe un kit para la detección de infiltración en el líquido cefalorraquídeo por parte de células cancerosas, que comprende al menos una sonda para detectar una de las proteínas de la invención. También un kit en donde las sondas están unidas a un soporte sólido. Este soporte sólido está compuesto, preferiblemente, de perlas (más preferiblemente inmunoperlas), un gel (por ejemplo, gel de agarosa o poliacilamida), o cualquier soporte a modo de una matriz sólida tal como un portaobjetos realizado de distintos materiales tales como vidrio con o sin superficie recubierta con oro.

Además, se describe un kit en donde las sondas son anticuerpos utilizados para reconocer la proteína de la presente invención, o un fragmento de la misma. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales.

25 Por lo tanto un segundo aspecto de la invención hace referencia al uso de un kit para la detección de infiltración en el líquido cefalorraquídeo por parte de linfocitos B cancerosos, que comprende al menos una sonda para detectar la proteína CD19 soluble liberada a partir de células tumorales en el LCR, preferiblemente, donde la sonda es un anticuerpo anti-CD19, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un linfoma no Hodgkin de linfocitos B agresivo, linfoma no Hodgkin de linfocitos B de bajo grado y leucemia linfocítica B crónica.

30 Una realización preferida del segundo aspecto hace referencia al uso del kit en donde la sonda se selecciona de las siguientes sondas:

- anti-CD19 y anti-CD21 o anti-CD19 y anti-CD24 o anti-CD19 y anti-CD20, para detectar infiltración por parte de linfocitos B tumorales en casos de linfomas no Hodgkin de linfocitos B agresivos, preferiblemente linfoma de Burkitt y linfoma difuso de linfocitos B grandes.

35 Otra realización preferida relacionada con el segundo aspecto de la presente invención hace referencia al uso del kit que además comprende anticuerpos dirigidos contra al menos una de las siguientes proteínas: CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1 o MLL-AF4.

40 En una realización preferida relacionada con el segundo aspecto de la presente invención, se hace referencia al uso de un kit en donde las sondas están unidas a un soporte sólido, donde este soporte sólido está compuesto de perlas, un gel o cualquier soporte a modo de una matriz sólida tal como un portaobjetos realizado de distintos materiales tales como vidrio con o sin superficie recubierta con oro.

En una realización preferida relacionada con el segundo aspecto de la presente invención, se hace referencia al uso de un kit en donde las sondas son anticuerpos utilizados para reconocer la proteína CD19 soluble liberada a partir de células tumorales en el LCR y dichos anticuerpos son monoclonales o policlonales.

45 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente patente tienen el mismo significado que el que generalmente entiende un experto en la práctica habitual del arte al que la invención pertenece. Los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente patente pueden ser utilizados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán obvias para los expertos en el arte al examinar la descripción, o pueden ser revelados con la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.
50

Ejemplos

Los siguientes dos ejemplos proporcionan una descripción, de carácter ilustrativo y no limitativo, de algunos de los ensayos y condiciones de operación reivindicadas en la lista de reivindicaciones que se da más adelante, donde tales ejemplos hacen referencia a la detección de células tumorales en una muestra de líquido cefalorraquídeo y una muestra de humor vítreo, cada una obtenida de un grupo distinto de pacientes, que en base a los síntomas que presentaban, se piensa son compatibles con sufrir un tumor del sistema nervioso central de un subtipo desconocido y un tumor ocular primario de un subtipo desconocido, respectivamente.

Ejemplo 1. Ensayo de cuantificación de proteínas y fragmentos de proteínas solubles asociadas a tumores mediante citometría de flujo.

Se obtuvieron muestras del líquido cefalorraquídeo (entre 2 y 10 mL) mediante punción lumbar de 10 pacientes con una alta probabilidad de padecer un tumor del sistema nervioso, específicamente bien de un glioma o un linfoma primario de linfocitos B del sistema nervioso central, después de que cada sujeto diera su consentimiento informado. Cada muestra se obtuvo directamente en tubos que contenían Transfix (tubos de Transfix, Immunostep SL, Salamanca, España). Una vez obtenido, el tubo fue centrifugado a 540g durante 5 min (temperatura ambiente) para sedimentar las células; a continuación, se obtuvieron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C. Después, 100 microlitros de cada sobrenadante de cada muestra, fueron descongelados e incubados secuencialmente (1 hora a temperatura ambiente) con una matriz de perlas de captura, formada por seis poblaciones de perlas cuya superficie había sido previamente cubierta por anticuerpos específicos, donde cada población estaba cubierta con un anticuerpo distinto dirigido contra epítomos de proteínas obtenidas a partir de distintos tipos de células tumorales, incluyendo linfocitos B y células de glioma,- es decir, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, GFAP- y con perlas de control dirigidas a la captura e identificación de proteínas ausentes habitualmente en las muestras de líquido cefalorraquídeo – control negativo; CD3 de ratón-, y proteínas presentes en cantidades conocidas – control positivo; por ejemplo, albúmina-, (poblaciones de perlas 7ª y 8ª). Se añadió simultáneamente (o inmediatamente tras el periodo de incubación) un panel de los segundos anticuerpos apareados dirigidos contra distintos epítomos de todas las proteínas detalladas anteriormente –es decir, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, GFAP-, todos conjugados con el mismo fluorocromo (por ejemplo, ficoeritrina). Cuando las muestras para las que dicho panel de segundos anticuerpos fueron incubadas por separado de la primera incubación de la muestra con las inmunoperlas cubiertas con anticuerpos, se realizó la segunda incubación después de añadir 4 mL de solución tampón de fosfatos (PBS; pH=7,4), realizando una etapa de centrifugación a 540g durante 5min y añadiendo 100 microlitros de PBS. Con esta etapa, se revelaron las proteínas sujetas a estudio ligadas con sus correspondientes perlas (o microesferas). Entonces, cada muestra se midió en un citómetro de flujo convencional capaz de medir 4 fluorescencias distintas. Las distintas poblaciones de perlas se distinguieron entre ellas en base a sus diferentes cantidades pre-definidas de fluorescencia verde (Alexa488); después del acotamiento de las subpoblaciones de interés (gating) en cada población de perlas, se evaluó entonces la fluorescencia asociada a la ficoeritrina específica de cada una de las poblaciones de perlas acotadas, reflejando la cantidad de cada proteína asociada a cada perla.

La información de la abundancia relativa y absoluta de cada una de las proteínas de interés en la muestra fue obtenida comparando los niveles de ficoeritrina de cada una de las diferentes poblaciones de perlas con los niveles de fluorescencia de las mismas perlas incubadas con cantidades en incremento variables, preestablecidas de las mismas proteínas, las cuales habían sido procesadas y leídas en un citómetro de flujo exactamente bajo las mismas condiciones que las perlas incubadas con las muestras de líquido cefalorraquídeo.

Para el análisis de las poblaciones de perlas, se utilizó un programa de ordenador conocido por los expertos en el arte, como por ejemplo, Infinicyt software (Cytognos SL, Salamanca, España). La información proporcionada en las medidas es tanto cualitativa (presencia versus ausencia de proteína detectable), como cuantitativa permitiendo evaluar la cantidad de proteína por unidad de volumen de la muestra en términos de, por ejemplo, ng/mL.

Ejemplo 2. Ensayo de cuantificación de proteínas y fragmentos de proteína solubles asociadas a tumores utilizando un inmunoensayo ligado a enzimas ELISA.

Se obtuvieron muestras de humor vítreo (entre 0,2 y 1,5 mL) mediante punción intraocular de 10 pacientes con una alta probabilidad de padecer un tumor del sistema nervioso central, tal como un linfoma ocular primario, después de que cada sujeto diera su consentimiento informado. Cada muestra se obtuvo directamente en tubos que contenían medios de cultivo (RPMI 1640, Sigma, St Louis, MO, USA). Una vez se obtuvo, el tubo se centrifugó a 540g durante 5 min (a temperatura ambiente) para sedimentar las células; a continuación, se obtuvieron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C. Después de esto, se descongelaron y se incubaron secuencialmente 100 microlitros de cada sobrenadante de cada muestra (3 horas a temperatura ambiente) por triplicado en una placa de plástico de 96 pocillos (Becton/Dickinson, New Jersey, NJ, USA) que había sido previamente recubierta con un anticuerpo anti-CD19. En paralelo, se añadieron diferentes cantidades de CD19 (0, 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1.000 ng en 100 microlitros) por triplicado a otros pocillos de la misma placa para crear una curva de calibración. Después de esta incubación, los pocillos de la placa se vaciaron y se lavaron tres veces con agua destilada. A continuación, se añadió un segundo anticuerpo anti-CD19 dirigido contra un epítomo diferente de la molécula CD19 conjugada con

ES 2 571 380 T3

5 peroxidasa de rábano (HRP) en 100 microlitros de solución tampón de fosfatos (PBS; pH=7,4) a cada pocillo y se realizó otra incubación durante 2 horas. Después de esta incubación, se añadió un sustrato de HRP y la placa se incubó durante 10 minutos en la oscuridad (temperatura ambiente). Para detener la reacción de la peroxidasa con el sustrato, se añadieron 50 microlitros/por pocillo de una solución de ácido sulfúrico, inmediatamente después de este periodo de incubación. Entonces la placa se leyó (densidad óptica obtenida a través de la reacción enzimática) en un lector de placas ELISA convencional equipado con los filtros ópticos apropiados.

10 Se calculó la información acerca de la abundancia de CD19 mediante representación gráfica de la densidad óptica obtenida para cada muestra (media de los pocillos por triplicado) contra una curva estándar creada con los resultados (media de la densidad óptica de las medidas por triplicado) obtenida para los pocillos a los que se añadieron cantidades conocidas de la proteína CD19 (0, 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1.000 ng en 100 microlitros), y que fueron procesados en paralelo con las muestras analizadas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de infiltración en el sistema nervioso central por parte de linfocitos B en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto, que comprende determinar la presencia de la proteína CD19 soluble derivada de células tumorales, liberada desde células tumorales en el LCR, que comprende los pasos de:
- 5 a. Proporcionar una muestra biológica de LCR del sujeto,
- b. Capturar la proteína CD19 soluble asociada a células tumorales en una plataforma sólida compuesta de al menos un pocillo de placa para ELISA, una inmunoperla o spot de matriz de superficie plana, a través de un conjunto de al menos una sonda, y
- c. detectar y/o cuantificar dicha proteína soluble asociada a células tumorales,
- 10 en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin de linfocitos B agresivo, linfoma no Hodgkin de linfocitos B de grado bajo y leucemia linfocítica B crónica.
2. Método según la reivindicación 1, en donde la muestra se selecciona de muestras conservadas, fijadas y congeladas.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la muestra se proporciona directamente o después de ser tratada con inhibidores de proteasa.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde además se detecta al menos una de las proteínas solubles asociadas a células tumorales seleccionadas de CD20, CD21, CD24 y CD22.
5. Método según la reivindicación 1 a 4, en donde además se detecta al menos una de las proteínas solubles asociadas a células tumorales seleccionadas de CD23, CD3, TCRVbeta, TCRValfa, TCRVgamma, CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1, MLL-AF4, CD117, MPO, Triptasa, CD13, CD33, CD15, CD14, CD36, CD64, lisozima, EGFR, CK8, CK18, CK19, CK20, EpCAM, Her2/neu y PSA.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, en donde la proteína CD19 se combina con al menos una proteína soluble seleccionada del siguiente grupo de proteínas humanas o combinaciones de las mismas: CD20, CD21, CD23 y CD24 en el caso de que las células cancerosas sean de LNH-B o de leucemias crónicas de linfocitos B.
7. Método según la reivindicación 5, en donde la proteína CD19 se combina con al menos una proteína soluble seleccionada del siguiente grupo de proteínas humanas o combinaciones de las mismas: CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1, MLL-AF4, en el caso de que las células cancerosas sean de leucemia linfoblástica aguda de precursores de linfocitos B y linfoma linfoblástico de precursores de linfocitos B.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha proteína en la etapa (c) se detecta y/o se cuantifica mediante citometría de flujo, cromatografía electroforética, ensayos de inmunoperlas basados en micromatrices o Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en donde dichas proteínas se detectan sobre la superficie de inmunoperlas simultáneamente con células del líquido cefalorraquídeo mediante citometría de flujo, citometría de imagen, citometría de láser de barrido o cualquier otra técnica de citometría.
- 35 10. Uso de un kit para la detección de infiltración en el líquido cefalorraquídeo por parte de linfocitos B cancerígenos que comprenden al menos una sonda para detectar la proteína CD19 liberada desde células tumorales en el LCR, preferiblemente, donde la sonda es un anticuerpo anti-CD19, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin de linfocitos B agresivo, linfoma no Hodgkin de linfocitos B de grado bajo y leucemia linfocítica B crónica.
- 40 11. Uso de un kit según la reivindicación 10, en donde la sonda se selecciona de las siguientes sondas:
- anti-CD19 y anti-CD21 o anti-CD19 y anti-CD24 o anti-CD19 y anti-CD20, para detectar infiltración por parte de linfocitos B tumorales en casos de linfomas no Hodgkin de linfocitos B agresivos, preferiblemente linfoma de Burkitt y linfoma difuso de linfocitos B grandes.
- 45 12. uso del kit según la reivindicación 10, que además comprende anticuerpos dirigidos contra al menos una de las siguientes proteínas: CD34, CD10, CD79a, CD22, BCR/ABL, TEL-AML1 o MLL-AF4.

13. Uso del kit según las reivindicaciones 10 a 12, en donde las sondas se encuentran unidas a un soporte sólido, donde este soporte sólido está preferiblemente compuesto de perlas, un gel o un soporte a modo de una matriz sólida tal como un portaobjetos realizado de distintos materiales tales como vidrio con o sin una superficie cubierta con oro.
- 5 14. Uso del kit según las reivindicaciones 10 a 13, en donde las sondas son anticuerpos utilizados para reconocer la proteína CD19 soluble liberada desde células tumorales en el LCR, o un fragmento de la misma, y dichos anticuerpos son monoclonales o policlonales.