



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 251**

51 Int. Cl.:

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04292651 .9**

96 Fecha de presentación : **09.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1531332**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Análisis y tipificación de proteínas monoclonales mediante electroforesis capilar e inmunodesplazamiento.**

30 Prioridad: **12.11.2003 FR 03 13246**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **SEBIA**
Parc Technologique Léonard de Vinci
rue Léonard de Vinci
91090 Lisses, FR

72 Inventor/es: **Robert, Frédéric y**
André, Régis

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Análisis y tipificación de proteínas monoclonales mediante electroforesis capilar e inmunodesplazamiento.

5 La invención se refiere al campo del análisis de muestras biológicas mediante electroforesis capilar e inmunodesplazamiento.

La invención tiene en particular por objeto un método de análisis de muestras biológicas mediante electroforesis capilar en el que la separación electroforética de los constituyentes de la muestra se acompaña de un tratamiento de la muestra mediante una técnica inmunológica. En el marco de la presente solicitud, el término “inmunosustracción” designa la supresión del pico de ciertas proteínas en el perfil electroforético, mediante inmunodesplazamiento de este pico proteico a otra posición del perfil.

15 La invención tiene en particular por objeto un método aplicable a unos protocolos de diagnóstico, y se refiere en particular a la búsqueda y a la tipificación en unas muestras biológicas de proteínas de control de afecciones monoclonales, también denominadas gammapatías monoclonales o paraproteinemias.

El desarrollo normal de los linfocitos B conduce a la producción, en la superficie de los linfocitos B maduros, de inmunoglobulinas de isotipos M y G, que tienen inicialmente unos idiotipos comunes. Los desórdenes plasmocitarios que están en el origen de las afecciones monoclonales resultan de un fallo de control del proceso de maduración celular hacia unas células segregadoras de anticuerpos después de la exposición a un antígeno específico de la inmunoglobulina de superficie. En esta situación, unas inmunoglobulinas que tienen una afinidad para un antígeno al que el hospedante ha sido expuesto, continúan siendo segregadas después de la desaparición del antígeno. De manera general, las inmunoglobulinas de una especie determinada se reparten en diferentes clases de anticuerpos, siendo cada clase identificada con la ayuda de un isotipo, siendo los diferentes isotipos identificados en el seno de una especie, comunes a todos los individuos normales de esta especie. Las inmunoglobulinas están constituidas generalmente por cadenas pesadas (2 cadenas pesadas) y por cadenas ligeras (2 cadenas ligeras). En base a esta estructura de cuatro cadenas, se han identificado cinco isotipos de cadenas pesadas (isotipos M, G, A, D, E), y dos isotipos de cadenas ligeras (isotipos kappa y lambda). Además de su isotipo, las inmunoglobulinas se caracterizan por unos determinantes que corresponden a unas diferencias entre los individuos de una misma especie, denominados alotipos así como por su idiotipo que corresponde a una parte de la molécula de inmunoglobulina que liga el antígeno. Por lo tanto, el idiotipo es característico de las moléculas producidas por un clon determinado de células productoras de anticuerpos.

35 Las enfermedades plasmocitarias están por lo tanto caracterizadas en particular por la alteración de la producción de ciertas inmunoglobulinas o de ciertas cadenas de inmunoglobulinas, y la detección y la caracterización de esta alteración tiene un interés clínico manifiesto.

El análisis mediante electroforesis de una muestra biológica permite la identificación de las proteínas séricas y la determinación de la cantidad de estas proteínas, en particular de las inmunoglobulinas. En un campo eléctrico, las proteínas migran en función de su tamaño y de su carga, formando un perfil de electroforesis que comprende una serie de picos (asimismo denominados fracciones), correspondiendo cada uno de ellos a una o a varias proteínas. La fracción denominada gamma está formada en particular por inmunoglobulinas, principalmente de tipo G. En unos pacientes que padecen enfermedades plasmocitarias que conducen a la secreción de proteínas monoclonales (también denominadas proteínas Mc), la cantidad de inmunoglobulinas que corresponde a uno de los isotipos conocidos se puede aumentar de manera significativa con relación a la normal, conduciendo a una modificación del perfil electroforético mediante la modificación de uno o varios picos de las proteínas separadas de una muestra de suero.

La detección de las proteínas monoclonales, en particular la detección de un aumento de la producción de un isotipo particular de inmunoglobulina, presenta por lo tanto un interés manifiesto para la investigación de enfermedades plasmocitarias pero también para el seguimiento de pacientes que padecen paraproteinemias. Se ha observado por ejemplo que la cantidad de una proteína Mc sérica puede según los casos, en particular durante el desarrollo tumoral, estar directamente relacionada con la progresión de la afección. Así, una proteína Mc puede constituir un marcador tumoral que, cuando se correlaciona con otros síntomas, puede ser tenido en cuenta en el establecimiento de un diagnóstico.

55 Las enfermedades plasmocitarias no están únicamente implicadas por la producción anormal de proteínas Mc; entre los desórdenes patológicos asociados a la producción de proteínas Mc, se citarán los neoplasmas linfoides, tales como la leucemia linfóide crónica o los linfomas de origen linfocitario B o T, ciertas proliferaciones no linfoides tales como la leucemia mieloide crónica, los cánceres de mama o de colon.

60 Unas proteínas Mc monoclonales pueden también ser producidas en ciertas patologías no malignas tales como la cirrosis, la sarcoidosis, unas parasitosis o la enfermedad de Gaucher. Se detecta asimismo la producción de proteínas monoclonales en unas afecciones auto-inmunes, tales como la poliartritis reumatoide, la miastenia, o la enfermedad de las aglutininas frías.

65 La electroforesis sobre gel de agarosa y la electroforesis capilar, que permiten detectar la presencia de proteínas monoclonales en unas muestras biológicas y seguir en el tiempo la evolución de las proteínas monoclonales detectadas, constituyen por lo tanto unos métodos de calidad de cara al establecimiento de un diagnóstico o del seguimiento de pacientes.

Según las patologías implicadas, la proteína Mc es de naturaleza diferente, constituida por una molécula de anticuerpo intacta, o bien por un fragmento de anticuerpo. Así, se pueden producir solas unas cadenas pesadas o unas cadenas ligeras. Es el caso, por ejemplo, de las proteínas de Bence Jones, segregadas en las orinas de los pacientes que padecen mielomas y que se presentan en forma de las únicas cadenas ligeras.

Los isotipos determinados de las inmunoglobulinas permiten tipificar las proteínas Mc, en función de la naturaleza de su cadena pesada y/o en función de la naturaleza de su cadena ligera. La técnica usada para la tipificación de las inmunoglobulinas permitirá así determinar el tipo de cadenas pesada y/o ligera asociadas de cada proteína monoclonal presente en una muestra biológica.

Además de la detección de la presencia de estas proteínas Mc, ha parecido importante tipificarlas, para permitir caracterizar la patología asociada a ellas. Para ello, ya se han propuesto diferentes enfoques, tales como la cromatografía sobre columna, la electroforesis sobre gel de agarosa o también la electroforesis capilar. En unos métodos que usan la electroforesis sobre gel de agarosa, las proteínas de la muestra biológica se separan mediante electroforesis en forma de un perfil de electroforesis en el que las proteínas y en particular las globulinas, se revelan en forma de picos o de bandas susceptibles de incluir una proteína monoclonal, cuya naturaleza se debe confirmar después, por ejemplo mediante la técnica de inmunofijación sobre gel de agarosa. Esta técnica combina dos etapas usando una electroforesis sobre gel de agarosa y después una inmunoprecipitación. Varias alícuotas de una misma muestra biológica se depositan en paralelo sobre un gel de agarosa, y después la aplicación de un campo eléctrico permite la separación de las proteínas, y en particular de las inmunoglobulinas. Se incubaba a continuación cada pista con un tipo de anticuerpos específicos de los tipos de inmunoglobulinas buscadas (IgG, IgA, IgM, kappa y lambda, y eventualmente kappa libre, lambda libre, IgD e IgE), conduciendo a la formación de inmunocomplejos entre las inmunoglobulinas de la muestra y los anticuerpos. Después de un lavado del gel que permite eliminar las proteínas que no han precipitado, una etapa de coloración permite revelar la posición de los inmunocomplejos: en el caso de la ausencia de proteínas monoclonales, sólo aparece un fondo coloreado difuso (que corresponde a la multitud de anticuerpos monoclonales que constituyen el "fondo policlonal"); en el caso de la presencia de proteínas monoclonales, unas bandas coloreadas se revelan en unas regiones específicas del gel. Usando una pista de referencia (sin antisuero), se puede así tipificar cada banda monoclonal visible sobre el gel.

Una técnica de tipificación usada en electroforesis capilar es la inmunosustracción tal como se describe en la patente US nº 5.228.960. Esta técnica consiste en incubar unas alícuotas de una muestra biológica con unos anticuerpos específicos capaces de sustraer un constituyente dado (por ejemplo unas inmunoglobulinas) de dicha muestra. Este constituyente sigue siendo adsorbido sobre la fase sólida sobre la cual se ha fijado el anticuerpo: por lo tanto, ya no está presente en la muestra analizada mediante electroforesis capilar. Las diferentes alícuotas tratadas en las que se han sustraído ciertas inmunoglobulinas según la especificidad de los anticuerpos usados se inyectan entonces en el capilar, y después las proteínas contenidas en las alícuotas se separan mediante la aplicación de un campo eléctrico en los bornes del capilar. Los perfiles obtenidos se comparan con un perfil de una alícuota no tratada.

Se han propuesto otras técnicas de identificación de las proteínas monoclonales, separadas mediante electroforesis capilar a partir de una muestra, por ejemplo en la patente EP 0 690 988 (B1). La patente europea en cuestión describe la asociación con la separación electroforética capilar, de una etapa de inmunosustracción, con el objetivo de facilitar la clasificación de las proteínas Mc. Según esta patente, la inmunosustracción se realiza "on-capilar" según un método que comprende una etapa de separación electroforética de una primera parte de la muestra en sus diferentes constituyentes, y la detección de estos constituyentes, y después la mezcla de una segunda parte de la muestra con por lo menos una pareja capaz de ligar específicamente un analito predeterminado contenido en la muestra, entendiéndose que la pareja específica para esta unión tiene una movilidad electroforética diferente de la de dicho analito. La segunda parte de la muestra se separa a continuación en sus diferentes constituyentes mediante electroforesis capilar y se detectan los constituyentes. Una etapa de comparación de los constituyentes separados se realiza a continuación con los constituyentes separados sin la presencia de las parejas específicas que ligan un analito buscado.

La patente europea EP 0 690 988 precisa que la pareja destinada a unir los analitos es una molécula modificada, en particular un anticuerpo anti-proteína Mc, que ha sufrido una modificación química de manera que su tiempo de migración en electroforesis capilar, la conduzca fuera de la región gamma del perfil electroforético. Una modificación química propuesta de los anticuerpos es la que consiste en hacer que reaccionen con el anhídrido succínico para aportarles unas funciones carboxílicas suplementarias, negativas a pH alcalino. En las condiciones de análisis descritas (pH 10), la carga negativa global de los anticuerpos está por lo tanto aumentada.

Las condiciones descritas para realizar la modificación de los anticuerpos, según la patente europea EP 0 690 988, así como los resultados experimentales reportados, que se refieren únicamente al análisis y a la separación de inmunoglobulinas G purificadas y no al análisis de un suero, permiten dudar de la pertinencia del método propuesto con el objetivo de buscar unas proteínas monoclonales en una muestra biológica "real", por ejemplo en un suero.

El documento WO 96/33412 describe unas composiciones, unos procedimientos y unos dispositivos para realizar unas dosificaciones ultrarrápidas por unión, preferentemente mediante electroforesis capilar. En un modo de realización, una primera pareja de unión presenta una etiqueta detectable y se modifica una segunda pareja de unión (por ejemplo un anticuerpo) para ser fuertemente cargada.

Se proporcionan unos ejemplos de compuestos cargados. Algunos de ellos aportan una o varias cargas negativas para cada función química modificada del anticuerpo. Existen entre ellos unos polímeros que poseen varias funciones ácidos carboxílicos y que están unidos mediante un agente de acoplamiento.

5 La combinación de una muestra que contiene un analito con el que las dos parejas de unión pueden interactuar y sobre el que se pueden fijar provoca la formación de un complejo de tres elementos. La diferencia de movilidad electroforética entre las formas libre y unida al complejo de la primera pareja de unión marcado es tal que permite la electroseparación y la detección ulterior de un analito. Las composiciones, los procedimientos y los dispositivos descritos en este documento permiten determinar cuantitativamente la concentración de un analito en una muestra.
10 Este analito puede ser un anticuerpo monoclonal. Se describen asimismo unos kits/estuches.

La presente invención propone un método alternativo aplicable eficazmente sobre una muestra biológica, que asocia la realización de una electroforesis capilar para la separación de los constituyentes de una muestra biológica y la inmunosustracción para permitir la tipificación de las proteínas Mc eventualmente presentes en la muestra biológica
15 analizada.

Una de las ventajas del método de la invención es permitir un desplazamiento, fuera de la zona que corresponde al perfil de migración de las proteínas de la muestra, en particular fuera de la zona de migración de las globulinas, del pico de electroforesis que corresponde a una proteína Mc cuando está presente en una muestra biológica y que ha sido
20 separada mediante electroforesis capilar. Este desplazamiento sustrae el pico que representa la proteína Mc separada, de su posición esperada al final de la etapa de migración sin interferir con la separación de las demás proteínas de la muestra. Al contrario del método descrito en la patente US nº 5.228.960, la proteína monoclonal reconocida por el anticuerpo está presente en la muestra inyectada para realizar la electroforesis capilar. Se sustrae simplemente del perfil puesto que se desplaza de su posición inicial. Por consiguiente, este método permite una lectura fiable de
25 los resultados del análisis, disipando cualquier eventual confusión entre unos picos cercanos que corresponden a las proteínas separadas de la muestra.

La invención se refiere asimismo a unos anticuerpos modificados químicamente para aportarles unas funciones químicas, suplementarias, negativas a pH alcalino (en este caso unas funciones carboxílicas), mediante la reacción de
30 ciertas funciones químicas del anticuerpo con un agente modificador: cada una de las funciones químicas modificadas aporta así varias cargas negativas suplementarias al anticuerpo. Estos anticuerpos se usan después para la inmuno-sustracción/inmunodesplazamiento específico de los picos que corresponden a unas proteínas Mc de una muestra biológica.

Los anticuerpos así preparados en el marco de la invención, presentan con relación a los anticuerpos de partida ya cargados negativamente cuando tienen un pH alcalino, un suplemento de cargas negativas cuando tienen un pH
35 alcalino, debido a la adquisición de funciones tales como unas funciones ácidos carboxílicos suplementarias. Estos anticuerpos se designan a continuación mediante la expresión "anticuerpos modificados sobrecargados negativamente" o también mediante los términos "anticuerpos modificados".
40

La invención tiene asimismo por objeto unos kits para la realización de una separación de las proteínas de una muestra biológica mediante electroforesis capilar y para la detección mediante inmunosustracción con el fin de identi-
45 ficarlas y, llegado el caso, cuantificarlas, de unas proteínas monoclonales susceptibles de estar contenidas en la muestra biológica ensayada.

La invención se refiere asimismo a un método de preparación de anticuerpos modificados químicamente para injertarles unas cargas negativas suplementarias a pH alcalino (anticuerpos modificados sobrecargados negativamente),
50 en unas condiciones que permiten su uso en una inmunosustracción.

La invención se refiere por lo tanto a un método para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica, que comprende el uso de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente de tal manera que migran a una
55 zona situada fuera de la zona de migración de las proteínas de la muestra biológica cuando se separan durante la electroforesis, presentando dichos anticuerpos una especificidad antigénica para una proteína monoclonal determinada.

La invención se define mediante las reivindicaciones.

Durante la separación de las proteínas de una muestra biológica, en un capilar lleno de un electrolito, las proteínas migran bajo el efecto de un campo eléctrico: las proteínas son así arrastradas en una migración del ánodo hacia
60 el cátodo. La diferencia entre velocidad electroforética propia (relacionada con la carga de la proteína) y flujo electrosmótico (relacionado con la carga de la superficie interna del capilar) permite la separación de las proteínas a detectar.

Las proteínas de una muestra inyectada en el capilar definen por lo tanto un perfil de migración electroforético que se puede dividir en varias zonas, ilustradas en las figuras de la presente solicitud, y que corresponden a las zonas
65 gamma (la más cercana del cátodo), beta2, beta1, alfa2, alfa1 y albúmina (siendo esta última zona la más cercada del ánodo). Las inmunoglobulinas contenidas en una muestra biológica migran de la zona alfa1 a la zona gamma, incluyendo las proteínas Mc.

Con el objetivo en particular de permitir la separación electroforética de proteínas monoclonales contenidas en una muestra biológica así como su tipificación fiable, por medio de una reacción de inmunosustracción, los inventores han puesto a punto unas condiciones de realización de la inmunosustracción que permiten la sustracción del pico que corresponde a una proteína monoclonal, del perfil de migración de las proteínas de la muestra (y en particular del perfil de migración de las globulinas) y su desplazamiento fuera de la región comprendida entre la zona gamma a la zona alfa 1.

Más precisamente, la proteína monoclonal buscada en la muestra no se sustrae del medio analizado sino que se desplaza bajo el efecto de su unión con un anticuerpo modificado sobrecargado negativamente que la reconoce específicamente, en unas condiciones tales que el complejo formado entre dicha proteína monoclonal y dicho anticuerpo modificado se desplaza fuera del perfil de migración de las globulinas de la muestra (las globulinas corresponden a las fracciones electroforéticas gammas, beta-2, beta-1, alfa-2 y alfa-1 en el perfil electroforético).

Más precisamente todavía, el complejo proteína Mc-anticuerpo cargado negativamente a pH alcalino se encuentra después de la etapa de migración electroforética, en la zona más anódica del perfil de las proteínas separadas.

El complejo anticuerpo modificado-proteína Mc es por lo tanto visible fuera del perfil así definido por las inmunoglobulinas separadas, y está en particular alejado de la zona gamma hacia la albúmina, siendo eventualmente visible en la proximidad de la albúmina y de alfa-1, sin que ello moleste la eventual detección de una proteína monoclonal anódica (es decir, que migra a alfa-1/alfa-2) puesto que el complejo tiene una movilidad intermedia entre la de la proteína monoclonal y la del anticuerpo modificado.

El anticuerpo modificado es en principio aportado en exceso para la reacción y la fracción de anticuerpo que no ha reaccionado es visible hacia el ánodo más allá del pico que corresponde a la albúmina (es decir, de migración más anódica que la albúmina).

Un primer método según la invención para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica y la inmunosustracción, comprende las siguientes etapas:

a) separar los constituyentes de una primera parte alícuota de la muestra biológica mediante electroforesis capilar, en presencia de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada y susceptibles de formar un complejo de tipo antígeno-anticuerpo con una proteína monoclonal eventualmente presente en la muestra biológica, y detectar los constituyentes separados de la muestra biológica;

b) comparar el perfil electroforético obtenido en la etapa a) con un perfil electroforético de los constituyentes de otra parte alícuota de la misma muestra separada mediante electroforesis capilar en ausencia de dichos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente de especificidad antigénica determinada.

Se observará que las muestras biológicas comprenden normalmente una fracción de inmunoglobulinas policlonales que constituyen un "fondo policlonal" situado en la región gamma (o próxima a esta última) del perfil electroforético. Estas inmunoglobulinas policlonales aparecen en forma de un pico más amplio que el de las inmunoglobulinas Mc (puesto que contienen un gran número de inmunoglobulinas de movilidades muy parecidas), en las condiciones de realización de una electroforesis capilar propias de la separación de proteínas Mc; este fondo policlonal se puede disminuir durante la puesta en contacto de la muestra con los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, según el tipo de inmunoglobulinas que lo constituyen (G, A, M, kappa o lambda). La distinción entre pico monoclonal y fondo policlonal se realiza en este caso localizando el pico Mc focalizado a detectar con relación al pico ancho policlonal.

En un modo de realización preferido de la invención, se realiza paralelamente la puesta en contacto de partes alícuotas de una muestra biológica determinada con diferentes anticuerpos, formando una gama de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, presentando cada tipo de anticuerpo de esta gama una especificidad antigénica determinada para un isotipo de inmunoglobulinas.

Así, se puede realizar paralelamente el análisis de una misma muestra biológica con dichos anticuerpos modificados de especificidad diferente, siendo la especificidad antigénica de estos anticuerpos elegida en función de las proteínas monoclonales buscadas que serían reconocidas por estos anticuerpos y en función del número de capilares en paralelo sobre el aparato de electroforesis.

Según otro modo de realización particular de la invención, en uno de los métodos descritos anteriormente, la muestra biológica se divide en por lo menos dos partes alícuotas, y el método comprende las siguientes etapas, previas a la separación de los constituyentes de la muestra biológica mediante electroforesis:

1) poner en contacto un medio que contiene unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada con una parte alícuota de la muestra biológica, en unas condiciones de incubación que permiten la reacción inmunológica entre dichos anticuerpos y una proteína diana específicamente reconocida por dichos anticuerpos, cuando ésta está presente en la muestra biológica, y poner en contacto otra parte alícuota de la muestra biológica con dicho medio desprovisto sin embargo de los anticuerpos modificados,

- 2) inyectar en el capilar de electroforesis, unas partes alícuotas de la muestra biológica incubadas según la etapa 1).

En otro modo de realización particular de la invención, el método de análisis electroforético capilar comprende las siguientes etapas, previas a la separación de los constituyentes de la muestra biológica mediante electroforesis:

- 1) inyectar un medio que contiene unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada, en el capilar de electroforesis, e inyectar dicho medio desprovisto sin embargo de dichos anticuerpos modificados en otro capilar de electroforesis;
- 2) inyectar la muestra biológica en los capilares de electroforesis tratados según la etapa 1), en unas condiciones que permiten la reacción inmunológica entre los anticuerpos y la o las proteína(s) diana(s) cuando está(n) presente(s) en la muestra biológica.

Para el análisis de una muestra biológica, cuando la gama de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente comprende n tipos de anticuerpos de especificidad diferente determinada, se separará la muestra biológica en por lo menos n+1 alícuotas.

Los anticuerpos usados para preparar los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente son unas inmunoglobulinas seleccionadas de entre unos anticuerpos anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-IgE, anti-IgD, anti-kappa, anti-lambda, anti-kappa libre y anti-lambda libre.

De manera preferida, los anticuerpos se seleccionan de entre los anticuerpos anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda. Según un modo de realización particular de la invención, se usa una gama de anticuerpos que comprende estos 5 anticuerpos. Según otro modo de realización de la invención, se usa una mezcla de la totalidad o parte de estos anticuerpos, por ejemplo una mezcla de 5 anticuerpos (antisuero pentavalente) o una mezcla de 3 anticuerpos (antisuero trivalente) por ejemplo que contiene unos anticuerpos anti-cadenas pesadas IgG, IgA, IgM.

También se puede limitar la realización del método de la invención al uso de sólo ciertos anticuerpos identificados anteriormente.

Para obtener unos anticuerpos sobrecargados negativamente, se realiza una reacción de los anticuerpos que presentan la especificidad antigénica elegida con un compuesto que aporta unas cargas suplementarias negativas a pH alcalino, por ejemplo un anhídrido cargado negativamente. Se hacen reaccionar por ejemplo unas funciones aminas de los anticuerpos con un anhídrido, de lo cual resulta la formación de una función ácido carboxílico suplementaria sobre el anticuerpo (y por lo tanto de una carga negativa suplementaria a pH alcalino) para cada función amina modificada.

En el marco de la presente invención, el anhídrido comprende por lo menos una función ácido carboxílico.

Para la realización de estos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, el anhídrido usado es ventajosamente un anhídrido benceno tricarboxílico. Este anhídrido aporta dos funciones ácido carboxílico (y por lo tanto dos cargas negativas suplementarias a pH alcalino) para cada función amina modificada: una primera función gracias a la reacción del anhídrido con la función amina, una segunda función debido a su estructura. El anhídrido se denominará así anhídrido cargado negativamente, puesto que es portador de por lo menos una función ácido carboxílico cargada negativamente a pH alcalino.

Se puede obtener un anticuerpo suficientemente modificado y por lo tanto suficientemente cargado negativamente a pH alcalino efectuando la reacción del anticuerpo con el anhídrido cargado negativamente, mediante la disolución extemporánea del anhídrido, en particular del anhídrido benceno tricarboxílico, en dimetilformamida (DMF) y la puesta en contacto del anhídrido disuelto con el anticuerpo en disolución para permitir la aportación de cargas negativas al anticuerpo, siendo dicha reacción efectuada a 37°C en unas condiciones que permiten el injerto de funciones ácido carboxílico sobre el anticuerpo.

El injerto del anhídrido sobre el anticuerpo se realiza con más eficacia por cuanto que la disolución de anhídrido en la DMF se pone en el último momento en contacto con el anticuerpo para obtener unos anticuerpos con unas funciones ácido carboxílico suplementarias (y por lo tanto unas cargas negativas suplementarias a pH alcalino), de manera que se previene la alteración del anhídrido con el agua contenida en la disolución de anticuerpo.

Un método de preparación de los anticuerpos modificados se describe con mayor detalle en la continuación de la solicitud.

Para aportar unas funciones ácido carboxílico suplementarias (y por lo tanto unas cargas negativas suplementarias a pH alcalino) al anticuerpo, se puede, como variante, usar el ácido melítico (que aporta las cargas negativas a pH alcalino) al que se asocia el agente de acoplamiento EDCI o hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida). El ácido melítico reacciona con las funciones aminas de los anticuerpos en presencia del EDCI.

Los anticuerpos modificados usados en el método de análisis electroforético capilar de la invención están normalmente en exceso con relación a la proteína diana que reconocen cuando ésta está presente en la muestra biológica.

Este exceso permite no sólo una desaparición total de la proteína Mc diana del perfil proteico, sino también una posición óptima del complejo anticuerpo modificado-proteína Mc sobre el perfil: una relación demasiado baja entre los anticuerpos modificados que presentan una especificidad antigénica determinada y las proteínas dianas de la muestra reconocidas por este anticuerpo no permitiría una sustracción total del pico Mc y proporcionaría una migración más catódica del complejo que cuando esta relación es más elevada.

En un modo de realización particular de la invención, la concentración de anticuerpos cargados negativamente de cada especificidad usados para la inmunosustracción es de aproximadamente 10 g/l.

La invención tiene asimismo por objeto unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, que son el producto de la reacción de anticuerpos con un anhídrido que aporta por lo menos 2 funciones ácido carboxílico, preferentemente el anhídrido 1,2,4-benceno tricarboxílico.

Los anticuerpos usados en el método de análisis mediante electroforesis capilar e inmunosustracción son así ventajosamente el producto de la reacción del anticuerpo con un anhídrido cargado negativamente, comprendiendo dicha reacción la disolución extemporánea del anhídrido en dimetilformamida (DMF), y la puesta en contacto del anhídrido disuelto con el anticuerpo en disolución para permitir la reacción del anhídrido y del anticuerpo, siendo dicha reacción efectuada a 37°C en unas condiciones que permiten el injerto de funciones químicas suplementarias sobre el anticuerpo, en particular unas funciones ácidos carboxílico, negativas a pH alcalino.

El método de análisis de muestras biológicas se puede realizar sobre diferentes tipos de muestras biológicas, tales como unas muestras de suero, de plasma, de orina o de líquido cefalorraquídeo.

Según la naturaleza de la muestra biológica usada y/o su origen (es decir, según el expediente médico del paciente), la interpretación de los resultados procedentes de la separación electroforética debe tener eventualmente en cuenta unas interferencias que se pueden producir entre los anticuerpos sobrecargados negativamente y las proteínas de la muestra. Dichas interferencias son perceptibles y analizables por el experto en la materia, y han sido observadas para las muestras que contienen un fibrinógeno, es decir, las muestras de plasma o los sueros de ciertos pacientes tratados con unos compuestos anticoagulantes. Los inventores han observado que el fibrinógeno puede reaccionar, mediante una reacción no específica, es decir, una reacción que no es del tipo antígeno-anticuerpo, con los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente de la invención. En este caso, cuando un fibrinógeno está presente, lo que se traduce sobre un perfil electroforético por la presencia de un pico entre las zonas β y γ , este pico está suprimido de su zona normal de migración después de que la muestra haya sido tratada con los anticuerpos sobrecargados negativamente de la invención, manifestándose esta supresión independientemente de la especificidad de los anticuerpos sobrecargados negativamente usados. En otras palabras, el pico que marca la presencia de fibrinógeno en la muestra se revela únicamente en el perfil electroforético de control (ELP) y desaparece del perfil de las proteínas sometidas a las reacciones inmunológicas con los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente (mediante inmunodesplazamiento en una zona fuera de este perfil).

Las condiciones de realización de la electroforesis capilar en vena líquida son las condiciones usadas habitualmente por el experto en la materia para las etapas de inyección de la muestra en el tubo capilar, de separación de los constituyentes de la muestra mediante migración electroforética bajo el efecto de una corriente de electroendosmosis. Estas etapas comprenden en particular el uso de tampones de electroforesis tales como los descritos en las solicitudes de patente WO 02/057736 y WO 02/057737, entendiéndose que los tampones de electroforesis se eligen para permitir la separación de proteínas Mc en forma de picos. Unas condiciones de realización de una electroforesis capilar son, por ejemplo, las condiciones apropiadas para usar el autómata Capillarys (SEBIA), incluyendo los tampones vendidos con la denominación SEBIA CAPILLARYS B1B2+ y CAPILLARYS PROTEIN (E) 6 y CAPILLARYS PROTEIN (E) 5.

Por ejemplo, el tampón de análisis usado para la migración electroforética es ventajosamente un tampón alcalino, cuyo pH está comprendido en el intervalo de 9 a 11, preferentemente alrededor de 10, comprendiendo en particular un compuesto tampón y por lo menos un aditivo susceptible de aumentar la fuerza iónica del tampón de análisis.

El método de análisis electroforético capilar descrito anteriormente permite, mediante el efecto de la modificación química de la movilidad de los anticuerpos usados para realizar la etapa de inmunosustracción, remediar las consecuencias que podrían resultar de la co-migración de las proteínas monoclonales con los constituyentes proteicos de la muestra durante la etapa de separación electroforética. Así, el método de la invención permite evitar las interferencias entre las proteínas monoclonales reconocidas por los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente y las demás proteínas que constituyen la muestra biológica. Esta ventaja esencial para la detección fiable de las proteínas monoclonales de una muestra biológica, es el resultado en particular del hecho de que el complejo de proteína Mc-anticuerpo modificado, migra después de las globulinas y por lo tanto permite la tipificación de la proteína Mc reconocida por el anticuerpo modificado sobrecargado negativamente independientemente de la posición de la proteína monoclonal durante la migración electroforética.

Además, la inmunosustracción del pico que corresponde al complejo proteína Mc-anticuerpo cargado negativamente es total en el sentido en el que el pico que correspondería a la proteína monoclonal ya no se detecta en la zona que corresponde al perfil de migración de las globulinas de la muestra biológica.

ES 2 318 251 T3

Por consiguiente, el método de la invención es ventajosamente aplicable a la detección y a la tipificación de todos los tipos de inmunoglobulinas monoclonales IgG, IgA, IgM, IgD, IgE y cadenas libres independientemente de su movilidad en la medida en la que las zonas gammas, betas y alfas del perfil de migración no interfieren con la zona de migración del anticuerpo modificado sobrecargado negativamente y del complejo que forma con las proteínas Mc cuando éstas están presentes en la muestra biológica.

El método de la invención es por lo tanto aplicable para el análisis electroforético capilar de proteínas monoclonales en una muestra biológica.

Para la detección y la tipificación de proteínas monoclonales en una muestra biológica, se efectúan ventajosamente varios análisis capilares en paralelo, siendo la muestra biológica dividida en diferentes partes alícuotas, y por lo menos en un número de partes alícuotas igual o superior al número de tipos de inmunoglobulinas usados para la búsqueda de las proteínas Mc.

Para la realización de la tipificación de las proteínas Mc en una muestra biológica, se realizarán normalmente por lo menos 6 análisis capilares paralelos.

Ventajosamente, los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente son unas inmunoglobulinas cuya especificidad antigénica se selecciona de entre las inmunoglobulinas anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda y/o anti-kappa libre y/o anti-lambda libre.

Pueden añadirse unas inmunoglobulinas anti-IgD, y/o anti-IgE.

Además del hecho de que la proteína Mc eventualmente presente en la muestra biológica se pueda tipificar mediante el método de la invención, dicha proteína Mc, cuando está presente, se puede cuantificar. Para ello, se determina la superficie del pico que corresponde a la proteína Mc que ha sido sustraída del perfil.

El método de la invención se puede usar asimismo para identificar otras proteínas (aparte de las inmunoglobulinas) visibles sobre el perfil electroforético; se podrán usar, por ejemplo, unos anticuerpos modificados de especificidad anti-haptoglobina-humana, -alfa 1 antitripsina, -complemento C3, -complemento C4, -transferrina, -RBP, β 2-microglobulina, - α 1-microglobulina, o unos anticuerpos de otras especificidades. Gracias a estos anticuerpos, sería posible así identificar las proteínas que constituyen una fracción de un perfil electroforético, o bien localizar un fenotipo particular de estas proteínas que tienen una movilidad diferente de la normal.

Las condiciones de realización de la invención descritas en la presente solicitud, con vistas a detectar unas proteínas distintas de inmunoglobulinas, se aplican por analogía.

La invención tiene, por otro lado, por objeto un procedimiento para la preparación de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, que comprende las etapas siguientes:

- disolver extemporáneamente un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico en dimetilformamida (DMF),
- poner en contacto los anticuerpos con el anhídrido disuelto en unas condiciones que permiten la reacción del anhídrido y del anticuerpo con el fin de obtener un anticuerpo modificado sobrecargado negativamente a pH alcalino.

El anhídrido elegido para aportar unas cargas suplementarias negativas a pH alcalino al anticuerpo es un anhídrido que posee por lo menos una función ácido carboxílico.

El anhídrido elegido para aportar unas cargas suplementarias negativas a pH alcalino al anticuerpo es preferentemente el anhídrido benceno tricarboxílico.

La preparación de los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente se describe en detalle en la parte experimental.

Se subraya que para ser eficaz en lo que se refiere a la aportación de cargas negativas, las etapas definidas anteriormente comprenden ventajosamente la disolución del anhídrido en dimetilformamida pura, y después la mezcla de esta disolución de anhídrido en el momento del injerto con el anticuerpo, es decir, tardíamente.

El respeto de estas condiciones permite evitar una destrucción del anhídrido por el agua contenida en la disolución de anticuerpos, puesto que dicha destrucción alteraría la eficacia de la preparación de los anticuerpos cargados disminuyendo la aportación de cargas negativas a pH alcalino.

De manera preferida, la reacción entre el anhídrido y el anticuerpo, en particular entre el anhídrido benceno tricarboxílico y el anticuerpo se efectúa a una temperatura de 37°C, o a una temperatura apropiada que permite aumentar el número de moléculas de anhídridos injertados sobre el anticuerpo, por ejemplo durante un tiempo de aproximadamente una hora.

Antes de ser puesto en contacto con el anhídrido, el antisuero a inyectar se dializa ventajosamente contra una disolución de tampón PBS o de tampón fosfato. Además, cuando el anticuerpo se pone en contacto con la disolución de anhídrido en la DMF, se añade preferentemente sosa, lo que permite tamponar mejor las funciones ácido carboxílico del anhídrido benceno tricarboxílico ya presentes así como las que se forman a medida que tiene lugar la reacción del anhídrido con el anticuerpo (de manera que conserva un pH neutro en el medio de reacción, lo que permite que continúe la reacción del anhídrido con las funciones aminas del anticuerpo).

Según un modo de realización particularmente preferido de la invención, durante la puesta en contacto con el anhídrido en la DMF, el anticuerpo previamente dializado contra un tampón PBS o un tampón fosfato a pH 7,4 se pone en contacto con sosa 5N, y se añaden preferentemente tantos equivalentes de sosa como funciones de ácido carboxílico (1) se han formado durante la reacción y (2) aportadas por el anhídrido. Los anticuerpos modificados se dializan a continuación en un medio que permite la conservación de los anticuerpos, y después estas disoluciones vuelven a la concentración adecuada de trabajo (aproximadamente 10 g/l) con el fin de situarse en unas condiciones en las que la relación anticuerpo/antígeno sea óptima.

La invención tiene asimismo por objeto unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, caracterizados porque comprenden unas funciones ácido carboxílico inyectadas de manera que les confieren una capacidad de migración electroforética fuera del perfil de migración de las inmunoglobulinas de una muestra biológica separadas en las mismas condiciones de separación mediante electroforesis capilar.

Los anticuerpos cargados negativamente pueden ser unos anticuerpos monoclonales. Puede tratarse alternatively de anticuerpos policlonales.

El contacto entre el anticuerpo y las proteínas antigénicas de la muestra se puede efectuar de dos maneras: una mezcla de la disolución de anticuerpos modificada con la muestra biológica, preferentemente diluida, en el soporte de muestras, por ejemplo, en la probeta Capillarys, previamente a su inyección en el capilar, o alternatively las inyecciones sucesivas de la disolución de anticuerpos modificada y después de la muestra diluida en el capilar. Este segundo modo de realización de la etapa de puesta en contacto permite una reacción antígeno/anticuerpo en el interior del capilar ("in-capilar") tan eficaz como el modo habitual de mezcla de las 2 disoluciones en la probeta u otro soporte de muestras, y ha sido posible debido a las diferencias de movilidad de los anticuerpos modificados con relación a las proteínas de la muestra y del orden de inyección de las 2 disoluciones: teniendo los anticuerpos modificados una movilidad mucho más baja que las proteínas de la muestra (debido a su carga negativa importante) y siendo inyectados en primer lugar, la inyección de la muestra después de la de los anticuerpos modificados provoca el paso de la muestra a través de la zona de anticuerpos, y permite por lo tanto la sustracción del perfil proteico de los antígenos reconocidos por los anticuerpos.

La invención se refiere asimismo a un kit de detección de proteínas monoclonales en una muestra biológica, que comprende unos anticuerpos según la invención y otros componentes, por ejemplo el medio destinado a contener los anticuerpos, sin embargo sin los anticuerpos (que permiten obtener el perfil de referencia) y/o unos tampones de electroforesis y/o unas disoluciones de lavado de los capilares y/o unas probetas de dilución específicas para volúmenes reducidos y/o un diluyente de la muestra a analizar, que permiten, por ejemplo, una buena superposición de las diferentes curvas obtenidas durante los diferentes análisis. Este kit comprende eventualmente unas indicaciones de uso para realizar el análisis electroforético y el inmunodesplazamiento de manera que se revelan y tipifican las proteínas Mc.

De manera preferida, este kit contiene una gama de anticuerpos de especificidad anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda.

Otro tipo de kit puede contener una mezcla de anticuerpos de especificidad anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda. Esta mezcla, que se puede denominar antisuero pentavalente, permite confirmar la naturaleza monoclonal de un pico aparecido sobre el perfil electroforético o de una deformación de una fracción de este perfil. Este kit es particularmente interesante puesto que las inmunoglobulinas Mc pueden aparecer no sólo en la zona gamma, sino también en las zonas beta y alfa, y pueden eventualmente estar enmascaradas por las proteínas habituales de estas zonas sobre el perfil obtenido en electroforesis capilar. En este modo de realización de la invención, la muestra se ensaya sobre 2 pistas: una pista de referencia (que contiene sólo el medio de los anticuerpos, sin los anticuerpos) y una pista que permite revelar la presencia de un pico monoclonal sobre el perfil electroforético (con la ayuda del antisuero pentavalente).

Otro tipo de kit puede contener una mezcla de anticuerpos de especificidad anti-cadenas pesadas (γ , α y μ , anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM que se puede denominar antisuero trivalente) y/o unos anticuerpos de especificidades anti-cadenas ligeras kappa y lambda (libres y unidas) y/o unos anticuerpos de especificidad anti-cadenas ligeras libres kappa y lambda. Este kit permitiría la detección y la identificación de proteínas de Bence Jones o cadenas ligeras libres Mc (kappa o lambda) en la orina o en el suero humanos mediante electroforesis capilar. En este modo de realización, cuando se usan estos antisueros, la muestra se ensaya sobre 6 pistas: una pista de referencia (que contiene sólo el medio de los anticuerpos, sin los anticuerpos), 5 pistas que permiten caracterizar la o las banda(s) Mc: presencia de cadenas pesadas con la ayuda del antisuero trivalente, y tipo de cadena ligera (kappa o lambda; libre o unida).

Las mezclas de anticuerpos modificados se pueden obtener mediante la modificación de una mezcla de anticuerpos en bruto, o mediante la mezcla de anticuerpos previamente modificados por tipo de anticuerpo. En el marco de la invención, se prefiere realizar una mezcla de anticuerpos previamente modificados para ser sobrecargados negativamente.

En el marco de la realización de la invención, la presentación de los resultados de la separación electroforética se puede realizar tal como se ilustra en los ejemplos, en forma de perfiles electroforéticos cuyo pico que corresponde a la proteína identificada mediante una reacción inmunológica específica con los anticuerpos sobrecargados negativamente ha desaparecido del perfil.

Alternativamente, estos resultados se pueden presentar en forma de perfiles electroforéticos que hacen aparecer sólo el pico que corresponde a la proteína identificada mediante una reacción inmunológica específica con los anticuerpos sobrecargados negativamente. En el marco de la realización del procedimiento de la invención, este pico desaparece del perfil de las proteínas separadas. Los resultados son, sin embargo, tratados para hacer aparecer sólo este pico.

Para ello, mediante unas técnicas apropiadas de tratamiento de datos, se sustrae cada perfil electroforético de una parte alícuota de la muestra considerada tratada mediante un anticuerpo modificado sobrecargado negativamente, del perfil de una parte alícuota no tratada, de la misma muestra. La sustracción de todos los perfiles de las partes alícuotas tratadas conduce a una imagen de tipo de las que se obtienen en una inmunofijación.

Ejemplos y figuras

Las figuras 1 a 13 ilustran unos ejemplos de detección de proteínas monoclonales en diferentes muestras biológicas y la tipificación de estas proteínas monoclonales, y mejoran así el pronóstico y el tratamiento de estas patologías. En las figuras 2 a 13, la superficie gris del perfil representa las proteínas séricas separadas en presencia de los anticuerpos de la invención; el perfil de las proteínas séricas separadas fuera de la presencia de los anticuerpos aparece asimismo según un trazo más fino. El perfil de las proteínas separadas no tratadas con los anticuerpos de la invención aparece asimismo solo en cada figura, con la denominación ELP.

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar de muestras clínicas se realiza en un aparato de EC equipado con 8 capilares de sílice fundida de diámetro interior de 25 micrones (CAPILLARYS, Sebia). La detección se realiza a 200 nm. Las muestras se disponen en el pasador de muestras del aparato y se inyectan automáticamente mediante inyección hidrodinámica. La separación de las muestras se realiza en menos de 5 minutos aplicando un campo eléctrico de aproximadamente 400 V/cm. El capilar se lava antes de cada análisis mediante sosa 0,25 M, y después mediante el tampón de análisis.

Protocolo para la modificación de los anticuerpos mediante el anhídrido tricarbóxico

- a) Se han dializado 10 ml del antisuero a inyectar (anti-human IgG, A, M, anti-kappa o lambda DAKO Dinamarca) a 10 g/l contra una disolución tampón fosfato 100 mM pH 7,4.
- b) Se ha preparado una disolución de anhídrido de 1,2,4-bencenotricarbóxico a 100 mM en DMF.
- c) Se ha mezclado entonces la disolución dializada de anticuerpos con sosa 5N y después con la disolución de anhídrido en la DMF (213 μ l de sosa 5N + 10 ml de disolución de anticuerpos + 5,33 ml de anhídrido en la DMF).
- d) Entonces, se ha dispuesto el medio de reacción bajo agitación suave sobre un péndulo durante una hora a 37°C.
- e) La mezcla se ha dializado entonces contra la disolución tampón fosfato 100 mM pH 7,4 con varios cambios de baño de diálisis.
- f) Una vez terminada la diálisis, se ha dispuesto el cilindro en PEG 6000 en polvo durante 1 h.
- g) Una vez terminada la concentración, se ha dializado entonces este último contra fosfato 100 mM pH 7,4 + 1 g/l de azida de sodio.
- h) El volumen del cilindro ha vuelto a 10 ml mediante una disolución de fosfato 100 mM pH 7,4 + 1 g/l de azida de sodio.
- i) La disolución obtenida se ha filtrado sobre una membrana de porosidad 0,45 μ m y después se ha conservado a 4°C. Se puede usar cualquier otro medio de conservación con la condición de que su fuerza iónica sea suficiente para asegurar la conservación de los anticuerpos (es decir, próxima a la del agua fisiológica).

ES 2 318 251 T3

Protocolo para la modificación de los anticuerpos mediante el ácido melítico

- 5 a) Se han dializado 10 ml del antisuero a inyectar (anti-human IgG, A, M, anti kappa o lambda DAKO Dinamarca) a 10 g/l contra una disolución tampón PBS 40 mM pH 7,4.
- b) Se han añadido 50 µl/ml de sosa 5N.
- c) Se han añadido 18 mg/ml de ácido melítico y después 50 mg/ml de EDCI.
- 10 d) Entonces, el medio de reacción se ha puesto bajo agitación suave sobre un péndulo durante una hora a 37°C.
- e) Se ha dializado entonces la mezcla contra la disolución tampón fosfato 100 mM pH 7,4 con varios cambios del baño de diálisis.
- 15 f) Una vez terminada la diálisis, se ha dispuesto el cilindro en PEG 6000 en polvo durante 1 h.
- g) Una vez terminada la concentración, se ha dializado entonces este último contra fosfato 100 mM pH 7,4 + 1 g/l de azida de sodio.
- 20 h) El volumen del cilindro ha vuelto a 10 ml mediante una disolución de fosfato 100 mM pH 7,4 + 1 g/l de azida de sodio.
- i) La disolución obtenida se ha filtrado sobre una membrana de porosidad 0,45 µm y se ha conservado el conjunto a 4°C.
- 25

Protocolo para la inmunotipificación de un suero

- 30 El Capillarys (SEBIA) es un aparato que efectúa 8 análisis capilares en paralelo. La probeta de inmunotipificación es una probeta CAPILLARYS específica para la tipificación constituida por 6 pocillos de 100 µl y por un doble pocillo de 400 µl. Contiene 60 µl de fosfato 100 mM en el pocillo 1, 60 µl de anti-IgG modificado en el pocillo 2, de anti-IgA modificado en el pocillo 3, de anti-IgM modificado en el pocillo 4, de anti-kappa modificado en el pocillo 5, de anti-lambda modificado en el pocillo 6, conteniendo el doble pocillo 7/8 380 µl de diluyente de inmunotipificación (alcohol bencílico 0,02 M) en el tampón de análisis Sebia usado.
- 35 a) Se ha depositado el tubo de suero a tipificar en la posición 1 sobre el portador CAPILLARYS sobre el que se ha dispuesto una probeta de “inmunotipificación”.
- 40 b) El portador ha sido introducido en el aparato: el autómatas ha realizado entonces una dilución 1/20 del suero en el doble pocillo 7/8, se ha homogeneizado el doble pocillo y se han repartido 40 µl en cada uno de los pocillos 1 a 6, homogeneizando cada uno de estos pocillos.
- c) Se ha efectuado a continuación el análisis capilar en las siguientes condiciones:
- 45 El tampón de análisis puede ser el tampón Sebia Capillarys B1B2+ o el tampón Sebia Capillarys Protein:
- Tampón B1B2+: Temperatura 32°C, tensión de migración 7 kV, ventana de adquisición 100-235s, inyección 250 mbares * 5s;
- 50 Tampón Sebia Capillarys Protein (e): Temperatura 37°C, tensión de migración 6,5 kV, ventana de adquisición 110-275s, inyección 250 mbares * 5s;
- d) El análisis capilar obtenido en el pocillo 1 ha sido comparado con el de los cinco pocillos siguientes con el fin de tipificar el suero analizado.
- 55

Disposición de las condiciones de funcionamiento para unos sueros particulares

- 60 Si el suero posee una fracción gama baja, la dilución en el diluyente en b) está a 1/10^a. La fracción gama se considerará como baja si su análisis sobre Capillarys en tampón B1B2+ da un valor inferior a las normales definidas para esta fracción con este tampón, es decir aproximadamente inferior a 10% (o <7,5 g/l).

- 65 Si el suero posee una fracción gama superior a aproximadamente 20 g/l, la dilución en el diluyente en b) está a 1/40^a.

ES 2 318 251 T3

Variante del protocolo para la inmunotipificación de un suero: inmunosustracción in-capilar

En este caso, se usan 2 probetas:

5 1 probeta constituida por 6 pocillos que contienen: 100 μ l de fosfato 100 mM en el pocillo 1, 100 μ l de anti-IgG modificado en el pocillo 2, de anti-IgA modificado en el pocillo 3, de anti-IgM modificado en el pocillo 4, de anti-kappa modificado en el pocillo 5, de anti-lambda modificado en el pocillo 6;

10 1 probeta para la dilución del suero constituida por 7 pocillos que contienen: 380 μ l de diluyente de inmunotipificación (alcohol bencílico 0,02 M en el tampón Sebia Capillarys B1B2+) en el doble pocillo 7/8;

a) Se ha introducido un primer portador que contiene la probeta de antisueros en el aparato: el autómata ha efectuado entonces una inyección de estos anticuerpos en los capilares (250 mbares * 5s).

15 b) Se han introducido a continuación un segundo portador que contiene la probeta para la dilución de suero y un tubo de suero en posición 1 en el aparato: el autómata ha realizado entonces una dilución 1/20ª en el doble pocillo 7/8, se ha homogeneizado el doble pocillo y se ha repartido en los pocillos 1 a 6 (40 μ l de suero a 1/20ª + 60 μ l de tampón de análisis por pocillo); los sueros diluidos se inyectan entonces en los capilares (250 mbares * 5s).

20 c) El tampón de análisis puede ser el tampón Sebia Capillarys B1B2+ o el tampón Sebia Capillarys Protein (e):

Tampón B1B2+: Temperatura 32°C, tensión de migración 7 kV, ventana de adquisición 100-235s;

25 Tampón Sebia Capillarys Protein (e): Temperatura 37°C, tensión de migración 6,5 kV, ventana de adquisición 110-275s;

30 d) El análisis capilar obtenido en el pocillo 1 ha sido comparado con el de los cinco pocillos siguientes con el fin de tipificar el suero.

Resultados

35 • Ejemplo 1

Análisis de un anti-human IgG DAKO antes y después de la modificación por el anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 105-350s); la modificación del anticuerpo permite retrasar fuertemente su migración: su tiempo de migración pasa de 122 a 267 s (Figuras 1a y 1b).

40

• Ejemplo 2

45 Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo Alambda que migra a beta-2 sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 2), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en beta-2 para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgA y anti-lambda. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará

50

55 • Ejemplo 3

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo G lambda que migra a beta-1 sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 3), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en beta-1 para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgG y anti-lambda. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará

65

perfiles.

• Ejemplo 4

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo A kappa que migra entre beta-1 y alfa-2 sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 4), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en beta-1/alfa-2 para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgA y anti-kappa. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 5

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo G lambda que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 5), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en gamma para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgG y anti-lambda. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 6

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo A lambda que migra entre beta-2 y beta-1 sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 6), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en beta-1/beta-2 para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgA y anti-lambda. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 7

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo M kappa que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 7), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en gamma para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgM y anti-kappa. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 8

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo lambda libre que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 8 alícuotas de este suero con 7 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda, -kappa libre, -lambda libre) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 8), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en gamma para las alícuotas tratadas mediante los anti-lambda y anti-lambda libre. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 9

Comparación de la inmunotipificación obtenida con un anticuerpo anti-human IgG modificado por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico o por el ácido melítico/EDCI sobre un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo Gkappa que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 3 alícuotas de este suero con 2 anti-human IgG modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico y por el ácido melítico/EDCI y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 9), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en gamma para las alícuotas tratadas mediante los 2 anticuerpos modificados. Se observará asimismo en los 2 casos la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 10

Inmunotipificación in-capilar de un suero que contiene una proteína monoclonal de tipo G kappa que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han dispuesto en una 1ª probeta el medio de los anticuerpos (sin anticuerpos) y 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda), se han diluido 6 alícuotas de este suero en el tampón Sebia Capillarys B1B2+ que contiene el marcador de inyección (probeta 2). Se han inyectado los anticuerpos y después las alícuotas, y se han realizado las 6 migraciones. Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 10), se observa claramente la desaparición del pico monoclonal en gamma para las alícuotas tratadas mediante los anti-IgG y anti-kappa. En las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 11

Uso del antisuero pentavalente (mezcla de anticuerpos anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa y -lambda modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico) con el fin de verificar la naturaleza Mc de un pico respaldado sobre beta-1 en un suero mediante análisis sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 2 alícuotas de este suero con el antisuero pentavalente y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 11), se observa claramente la desaparición del pico respaldado sobre beta-1 sobre la pista tratada con el antisuero pentavalente, indicando la naturaleza Mc de este pico (proteína Mc de tipo M kappa). Se observará asimismo la desaparición del fondo policlonal, la ausencia de fracción beta-2 para este suero así como la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 12

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína Mc de tipo lambda libre que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys B1B2+ (ventana de adquisición 100-235s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (antisuero trivalente (mezcla de los anticuerpos anti-IgG, -IgA, -IgM), anti-kappa, anti-lambda, anti-kappa libre, anti-lambda libre) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 12), se observa claramente la desaparición del fondo policlonal, pero no del pico Mc sobre la pista tratada con el antisuero trivalente. Se observa en paralelo la desaparición del pico Mc sobre las pistas anti-lambda y anti-lambda libre. Sobre las pistas anti-kappa y anti-kappa libre, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de fracción beta-2 para este suero así como la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

• Ejemplo 13

Inmunotipificación de un suero que contiene una proteína Mc de tipo M kappa que migra a gamma sobre Capillarys con el tampón Sebia Capillarys Protein (e) (ventana de adquisición 110-275s): se han mezclado 6 alícuotas de este suero con 5 anticuerpos modificados por el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico (anti-IgG, -IgA, -IgM, -kappa, -lambda) y con el medio de estos anticuerpos (sin anticuerpos; pista ELP). Por comparación con la pista ELP (en negro; Figura 13), se observa claramente la desaparición del pico Mc en gamma sobre las alícuotas tratadas con los anti-IgM y anti-kappa. Sobre las demás pistas, únicamente se observa la disminución del fondo policlonal. Se observará asimismo la ausencia de interferencia de los inmunocomplejos y de los anticuerpos modificados con la migración de las globulinas. El pico que migra antes de las gamas es un marcador de inyección que facilita la superposición de los perfiles.

REIVINDICACIONES

1. Método para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica, que comprende la utilización de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente de tal manera que migran a una zona situada fuera de la zona de migración de las globulinas de la muestra biológica cuando éstas se separan durante la electroforesis, presentando dichos anticuerpos una especificidad antigénica para unas proteínas dianas monoclonales determinadas y siendo obtenidos mediante la reacción con (i) el ácido melítico, en presencia de EDCI (hidrocloruro de 1(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) o (ii) un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico.

2. Método según la reivindicación 1, para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- a) separar los constituyentes de una primera parte alícuota de la muestra biológica mediante electroforesis capilar, en presencia de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada y susceptibles de formar un complejo de tipo antígeno-anticuerpo con una proteína monoclonal eventualmente presente en la muestra biológica, y detectar los constituyentes separados de la muestra biológica;
- b) comparar el perfil electroforético obtenido en la etapa a) con un perfil electroforético de los constituyentes de otra parte alícuota de la misma muestra separada mediante electroforesis capilar en ausencia de dichos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente de especificidad antigénica determinada.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usan unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, formando una gama de anticuerpos que presentan unas especificidades antigénicas diferentes, puestos en contacto con una misma parte alícuota de la muestra biológica, para realizar la separación mediante electroforesis capilar de los constituyentes de la muestra.

4. Método según la reivindicación 3, en el que cada tipo de anticuerpo de dicha gama de anticuerpos presenta una especificidad antigénica determinada para un isotipo de inmunoglobulinas.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica dividida en por lo menos 2 partes alícuotas, que comprende las siguientes etapas, previas a la separación de los constituyentes de la muestra biológica mediante electroforesis:

- 1) poner en contacto un medio que contiene unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada con una parte alícuota de la muestra biológica, en unas condiciones de incubación que permiten la reacción inmunológica entre dichos anticuerpos y una proteína monoclonal diana específicamente reconocida por dichos anticuerpos, cuando ésta está presente en la muestra biológica, y poner en contacto otra parte alícuota de la muestra biológica con dicho medio desprovisto sin embargo de los anticuerpos modificados,
- 2) inyectar en el capilar de electroforesis las partes alícuotas de la muestra biológica incubadas según la etapa 1).

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para el análisis electroforético capilar de una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas, previas a la separación de los constituyentes de la muestra biológica mediante electroforesis:

- 1) inyectar un medio que contiene unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente que presentan una especificidad antigénica determinada, en el capilar de electroforesis, e inyectar dicho medio desprovisto sin embargo de dichos anticuerpos modificados en otro capilar de electroforesis;
- 2) inyectar la muestra biológica en los capilares de electroforesis tratados según la etapa 1), en unas condiciones que permiten la reacción inmunológica entre los anticuerpos y la o las proteína(s) monoclonal(es) diana(s) cuando ésta(s) está(n) presente(s) en la muestra biológica.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra biológica se divide en por lo menos n+1 partes alícuotas cuando la gama de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente comprende n tipos de anticuerpos de especificidades diferentes determinadas.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque los anticuerpos se seleccionan de entre los anticuerpos anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque se usan unos anticuerpos anti-IgG, unos anticuerpos anti-IgA, unos anticuerpos anti-IgM, unos anticuerpos anti-kappa, unos anticuerpos anti-lambda, unos anticuerpos anti-kappa libre y unos anticuerpos anti-lambda libre.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo modificado sobrecargado negativamente está en exceso con relación a la o a las proteína(s) monoclonal(es) diana(s) que reconocen cuando ésta(s) está(n) presente(s) en la muestra biológica.
- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los anticuerpos modificados sobrecargados negativamente son el producto de la reacción con el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el anticuerpo sobrecargado negativamente es el producto de la reacción del anticuerpo con un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico, comprendiendo dicha reacción la disolución extemporánea del anhídrido en dimetilformamida (DMF) y la puesta en 10 contacto del anhídrido disuelto con el anticuerpo en disolución para permitir la reacción del anhídrido y del anticuerpo, siendo dicha reacción efectuada a 37°C en unas condiciones que permiten el injerto de cargas negativas sobre el anticuerpo.
- 15 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la electroforesis capilar se realiza en un tampón alcalino, a un pH comprendido entre 9 y 11, que contiene un compuesto tampón y por lo menos un aditivo susceptible de aumentar la fuerza iónica del tampón de análisis.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra biológica se selecciona de entre 20 unas muestras de plasma, de orina o de líquido cefalorraquídeo.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra biológica es una muestra de suero.
16. Método para la búsqueda y la tipificación de proteínas monoclonales denominadas proteínas Mc en una muestra biológica, que comprende el análisis electroforético capilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 de 25 diferentes partes alícuotas de la muestra biológica, estando cada una de las partes alícuotas puesta en contacto con anticuerpos seleccionados respectivamente de entre las inmunoglobulinas anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda, anti-kappa libre y anti-lambda libre modificadas para ser sobrecargadas negativamente.
17. Método para la búsqueda y la tipificación de proteínas monoclonales (proteínas Mc) en una muestra biológica, 30 en el que la presencia de una proteína Mc en la muestra biológica se detecta mediante inmunosustracción del pico que corresponde a dicha proteína Mc, en el perfil electroforético de las proteínas de la muestra biológica, efectuándose la migración del complejo anticuerpo modificado sobrecargado negativamente-proteína Mc fuera del perfil electroforético de las globulinas de la muestra biológica, siendo dicho anticuerpo sobrecargado negativamente obtenido mediante la 35 reacción con (i) el ácido melítico, en presencia de EDCI (hidrocloruro de 1(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) o (ii) un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico.
18. Procedimiento para la preparación de anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, que comprende las etapas siguientes: 40
- disolver extemporáneamente un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico en dimetilformamida (DMF),
 - poner en contacto los anticuerpos con el anhídrido disuelto en unas condiciones que permiten la reacción 45 del anhídrido y del anticuerpo con el fin de obtener un anticuerpo modificado sobrecargado negativamente a pH alcalino.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el anhídrido es el anhídrido bencenotricarboxílico.
20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, en el que el anhídrido está disuelto de forma 50 extemporánea en DMF pura.
21. Anticuerpos modificados sobrecargados negativamente, **caracterizados** porque se injertan unas funciones ácido sobre los anticuerpos de manera que les confieren una capacidad de migración electroforética fuera del perfil de 55 migración de las inmunoglobulinas de tipo IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, separadas en las mismas condiciones de separación por electroforesis capilar, siendo dichas funciones ácido injertadas sobre dichos anticuerpos mediante la reacción con (i) el ácido melítico, en presencia de EDCI (hidrocloruro de 1(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida) o (ii) un anhídrido que comprende por lo menos una función ácido carboxílico.
22. Anticuerpos modificados sobrecargados negativamente según la reivindicación 21, tales como los obtenidos 60 mediante la realización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
23. Anticuerpos modificados sobrecargados negativamente según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, seleccionados de entre las inmunoglobulinas anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa, anti-lambda, anti-kappa libre y anti-lambda libre. 65
24. Anticuerpos modificados sobrecargados negativamente según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, mezclados en forma de un antisuero pentavalente que contiene dichos anticuerpos modificados sobrecargados negativa-

ES 2 318 251 T3

mente anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa y anti-lambda, o en forma de un antisuero trivalente que contiene dichos anticuerpos sobrecargados negativamente anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM.

5 25. Anticuerpos modificados sobrecargados negativamente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, **caracterizados** porque se trata de anticuerpos policlonales.

10 26. Kit para la detección y la tipificación de proteínas monoclonales en una muestra biológica, que comprende unos anticuerpos modificados sobrecargados negativamente según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, y un diluyente apropiado.

27. Uso de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para la detección mediante electroforesis capilar e inmunodesplazamiento de proteínas monoclonales presentes en una muestra biológica.

15 28. Uso de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, para la tipificación de proteínas monoclonales presentes en una muestra biológica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

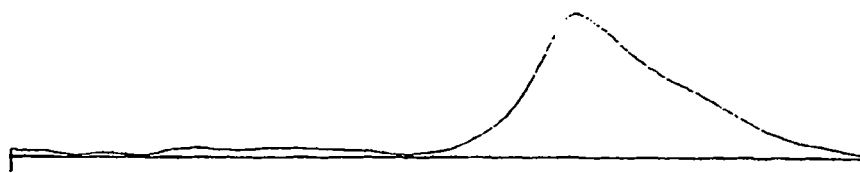
FIG 1a



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-IgG DAKO, ventana 105-350 segundos, 122 segundos

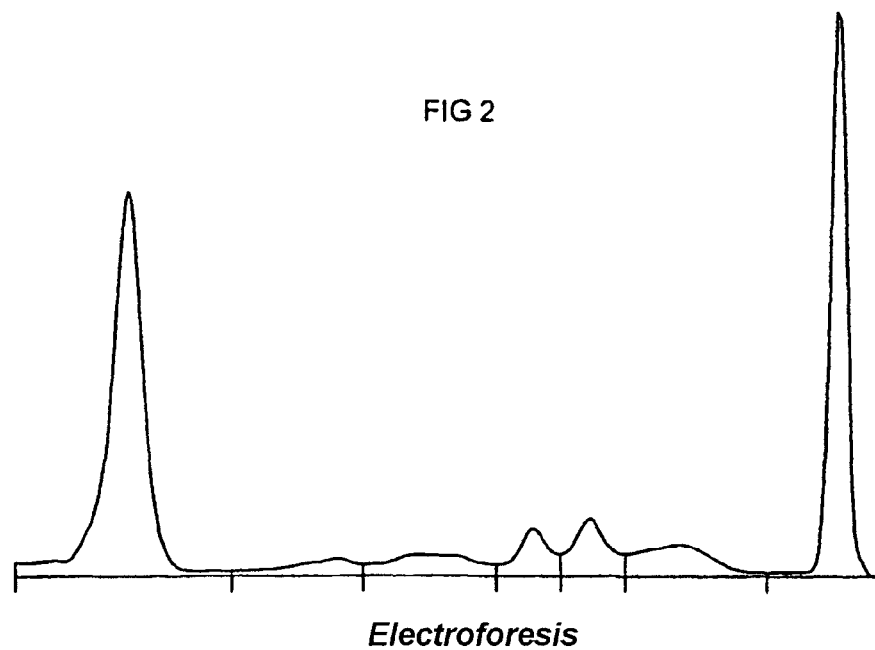
FIG 1b



Electroforesis de las proteínas séricas

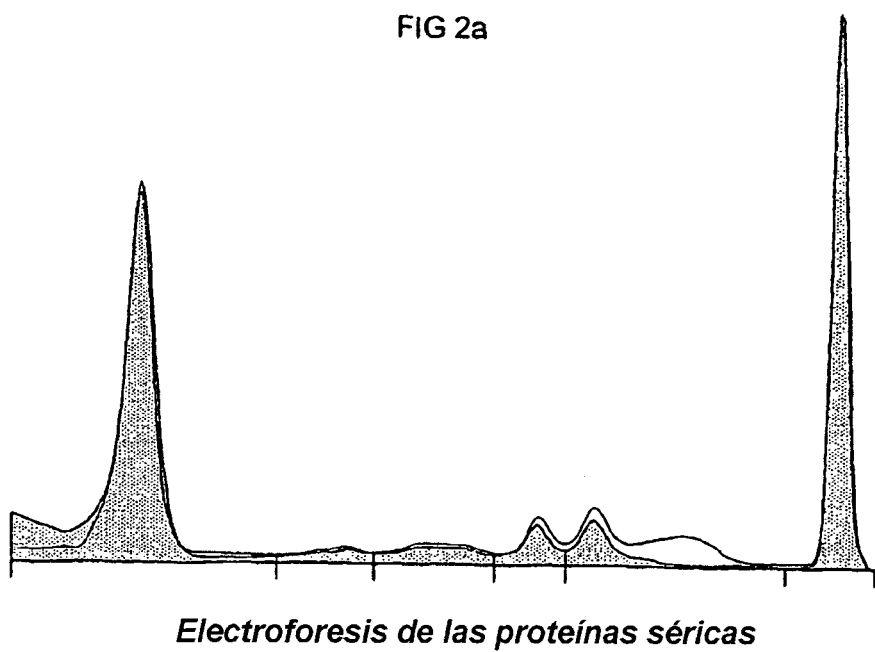
Anti-IgG modificado, ventana 105-350 segundos, 267 segundos

FIG 2



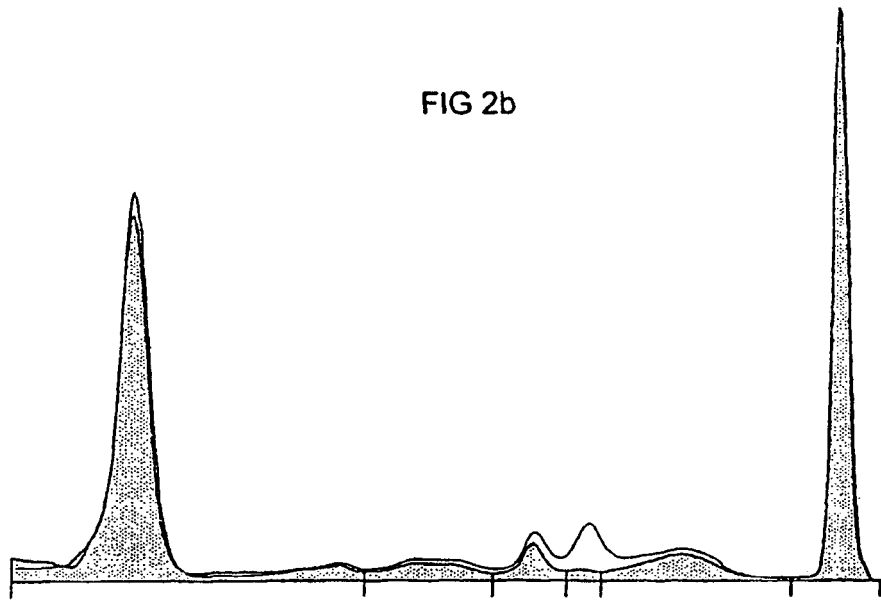
Suero con Alambda en beta-2 - ELP

FIG 2a



anti IgG

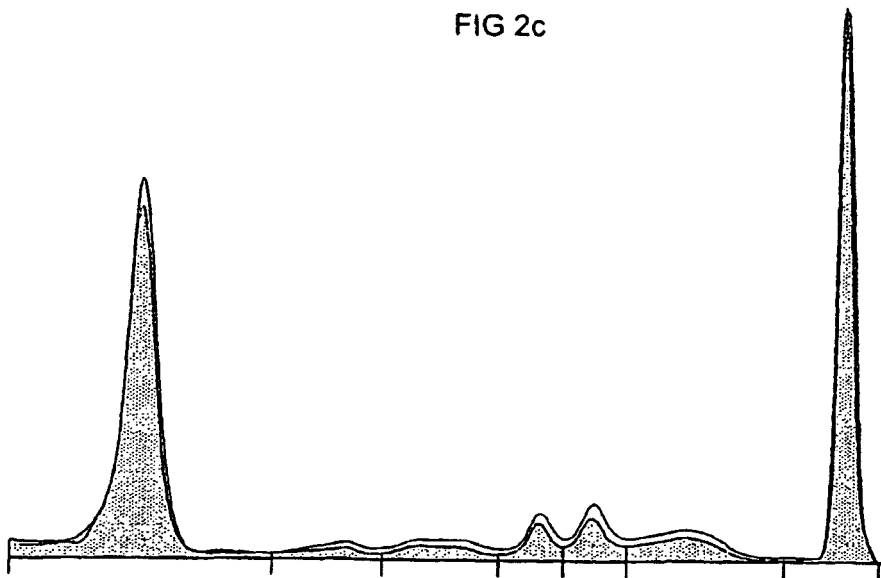
FIG 2b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgA

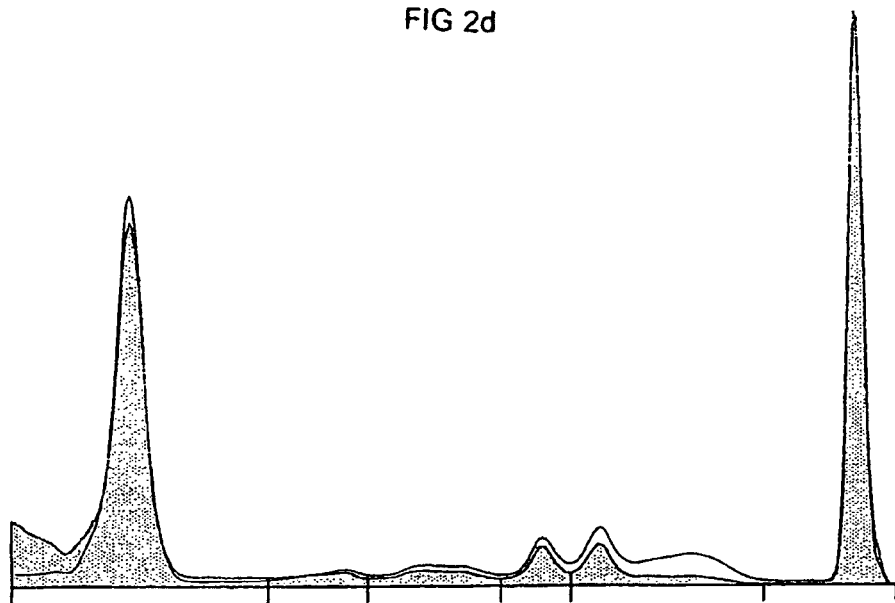
FIG 2c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgM

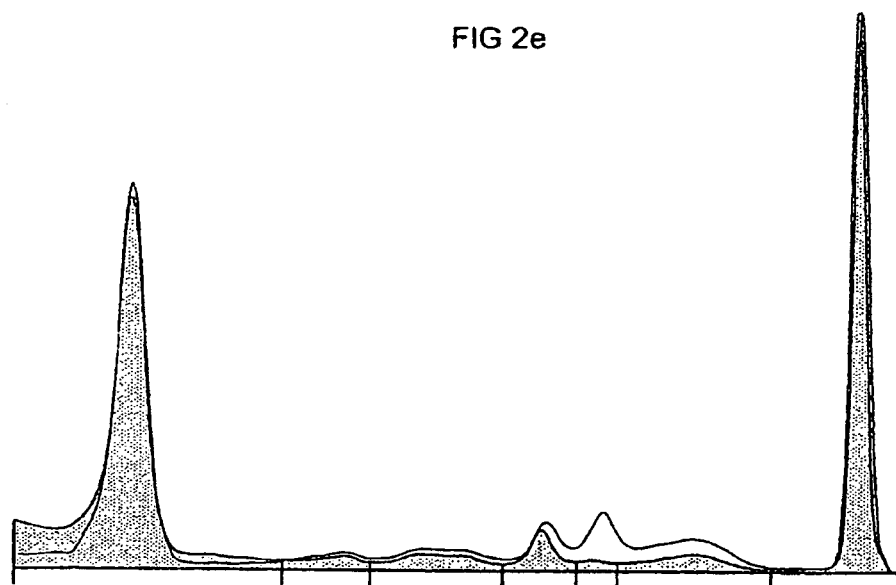
FIG 2d



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Kappa

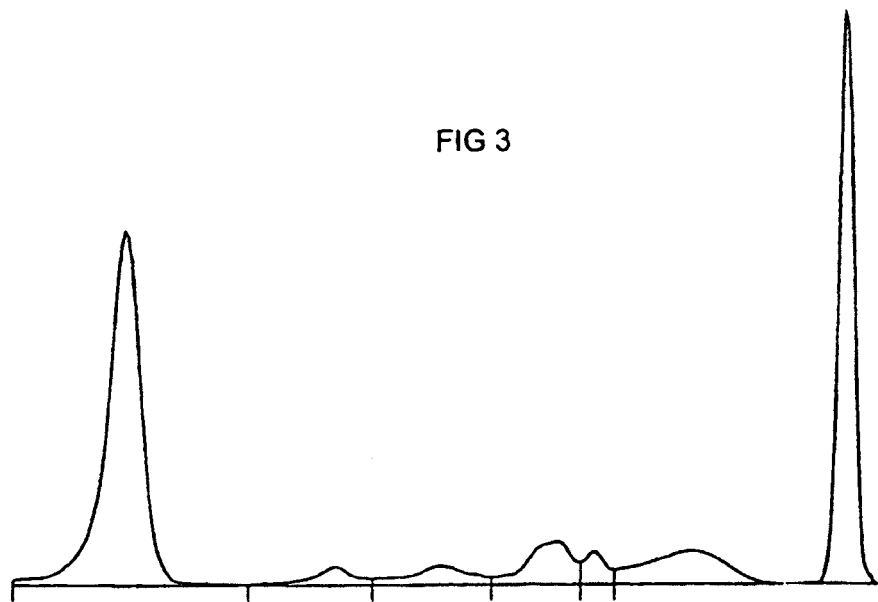
FIG 2e



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Lambda

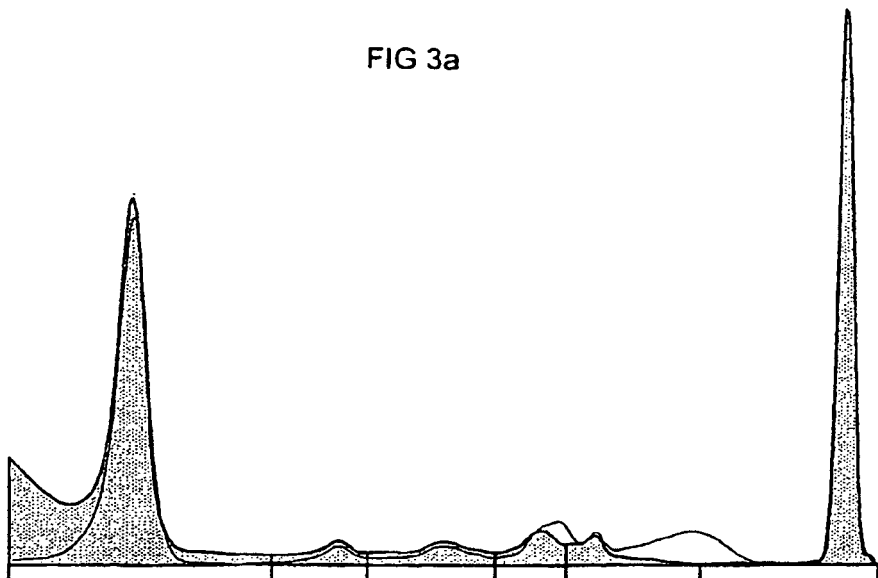
FIG 3



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con Glambda en beta-1 - ELP

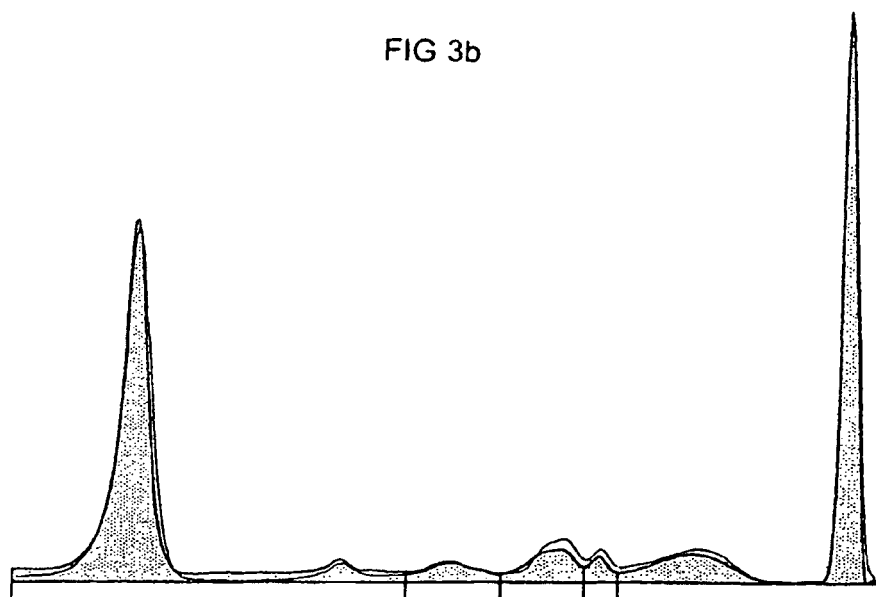
FIG 3a



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgG

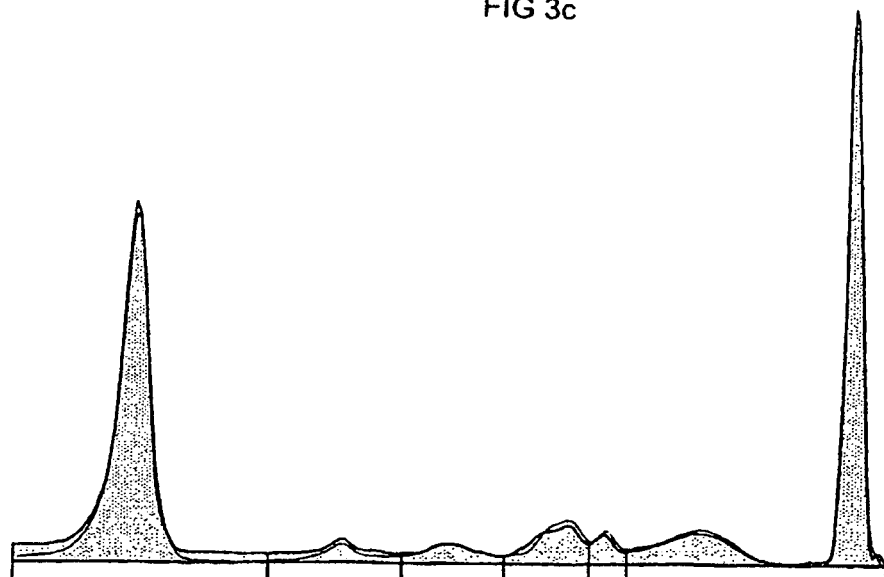
FIG 3b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgA

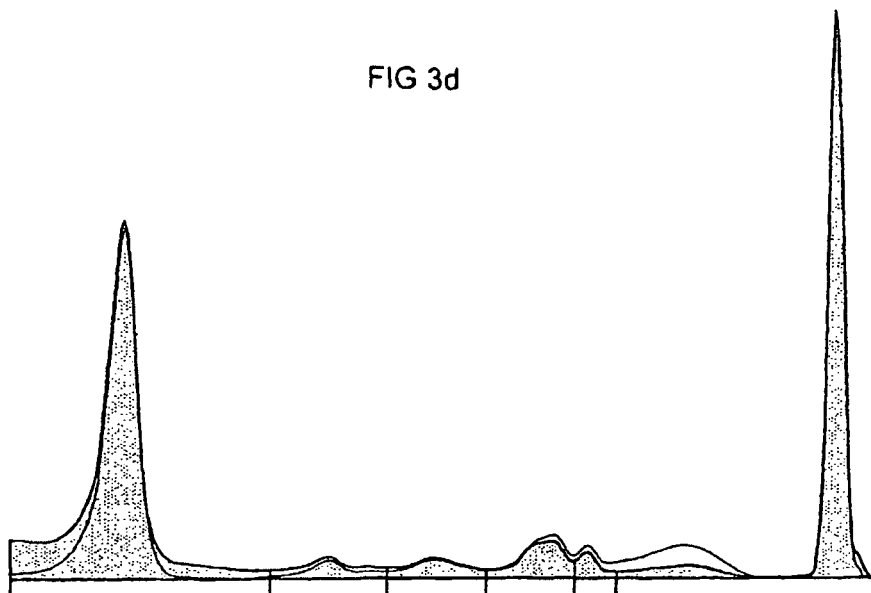
FIG 3c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgM

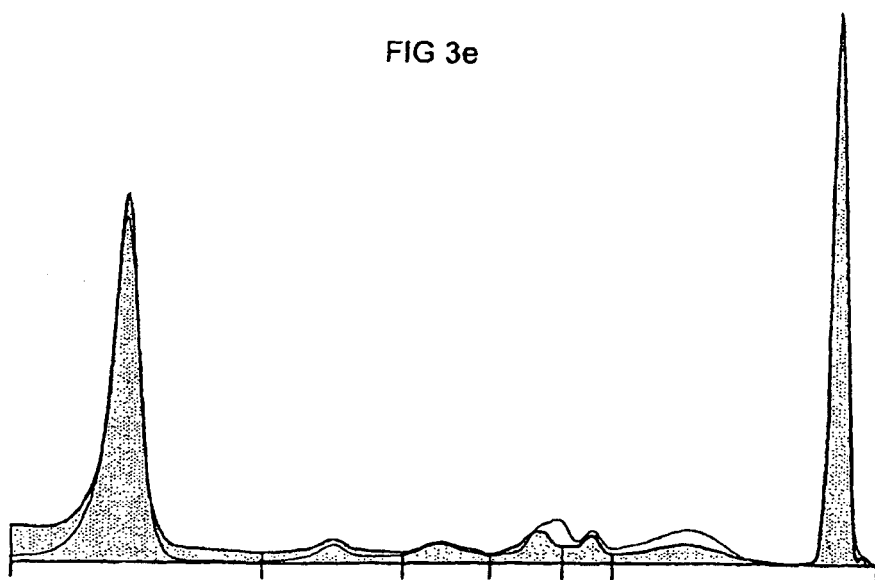
FIG 3d



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti Kappa

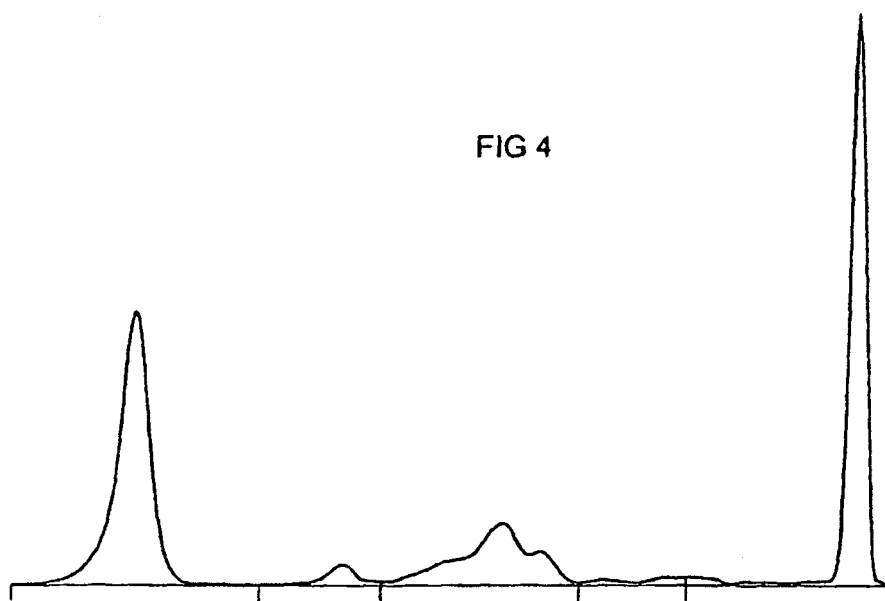
FIG 3e



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Lambda

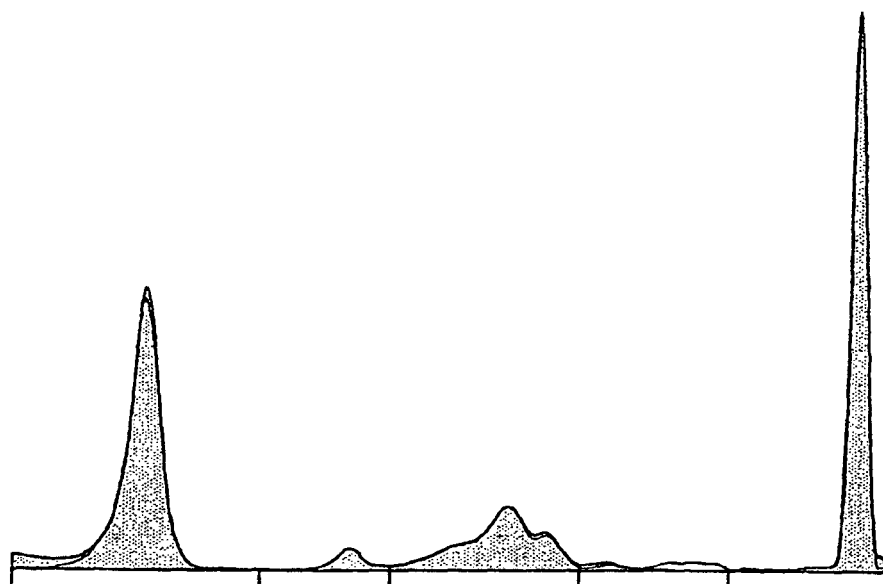
FIG 4



Electroforesis

Suero con Akappa en alfa-2/beta-1 - ELP

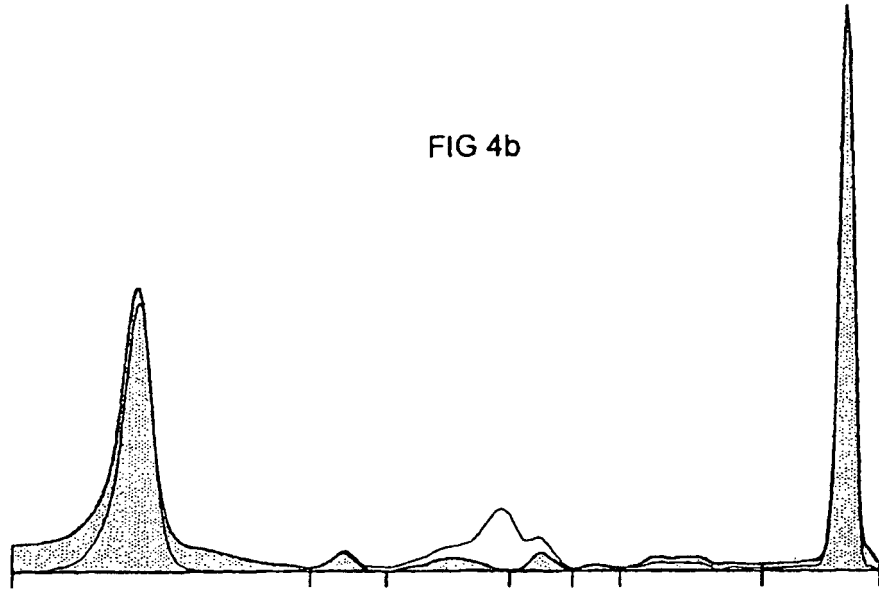
FIG 4a



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti IgG

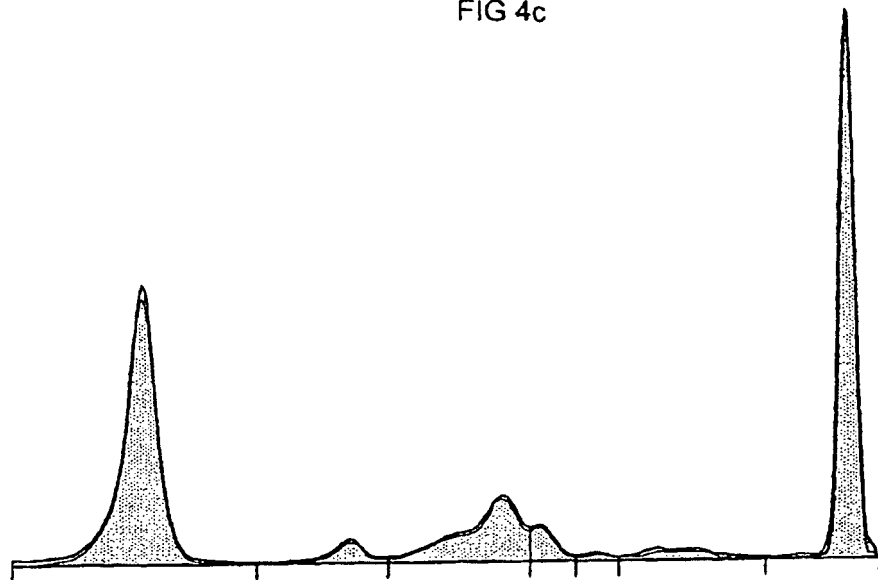
FIG 4b



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti IgA

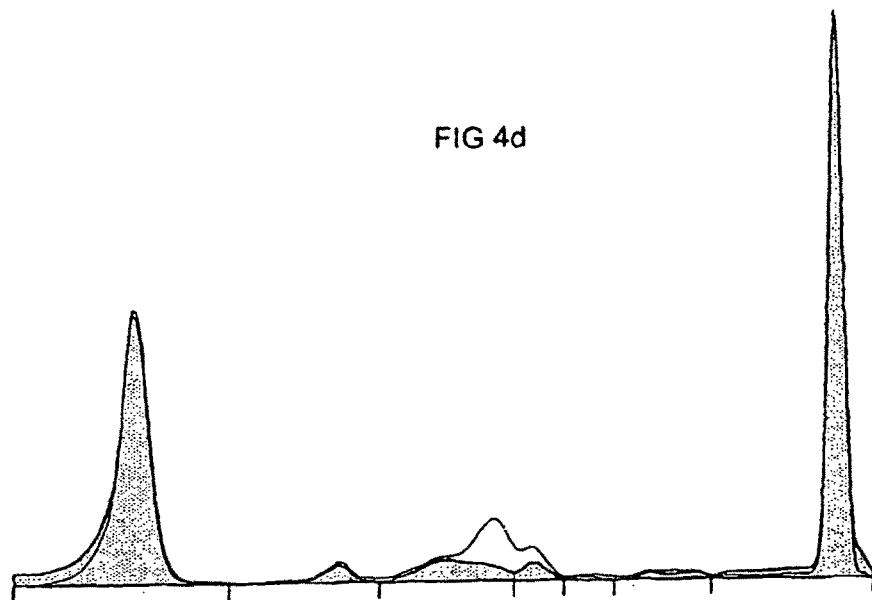
FIG 4c



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti IgM

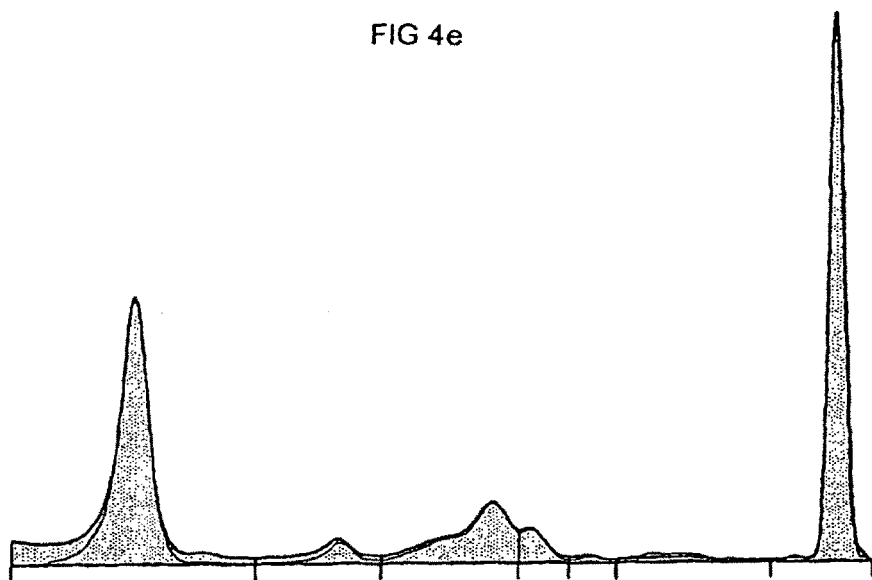
FIG 4d



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti Kappa

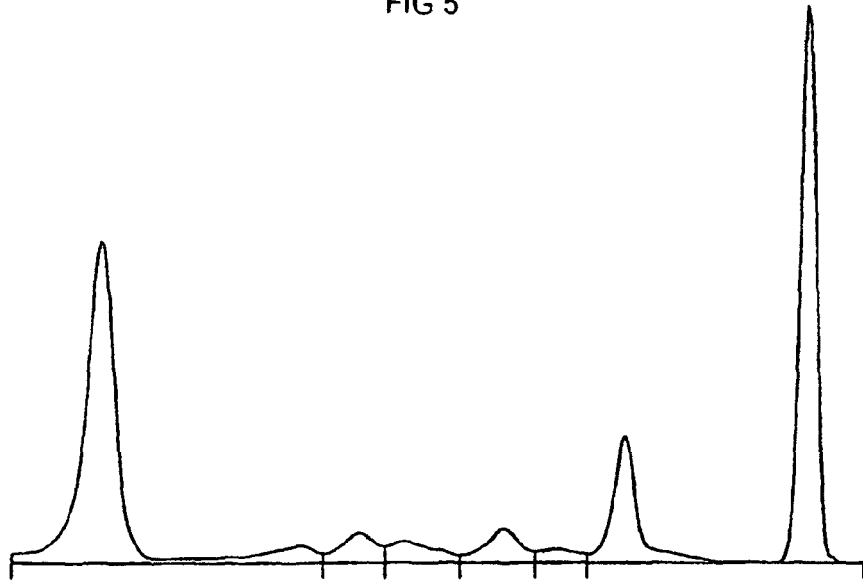
FIG 4e



Electroforesis de las proteínas séricas

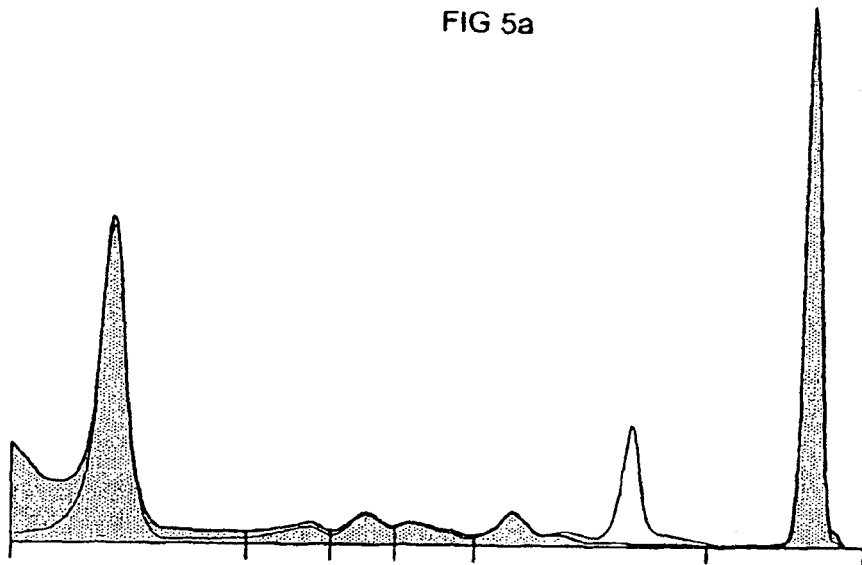
Anti Lambda

FIG 5



Suero con Glambda - ELP

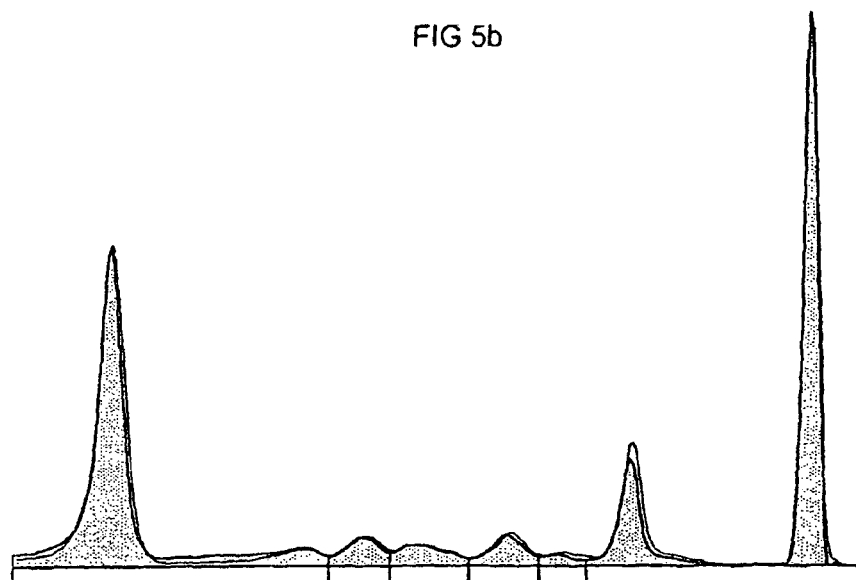
FIG 5a



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgG

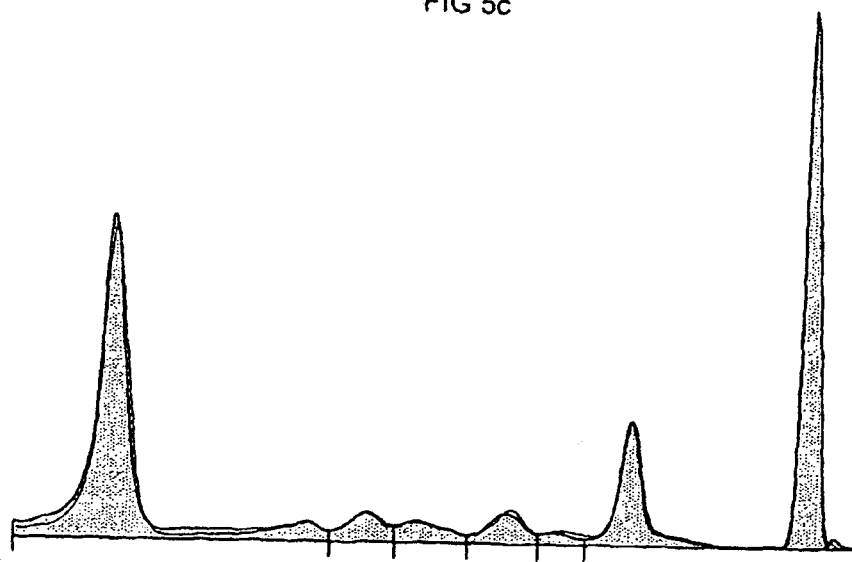
FIG 5b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgA

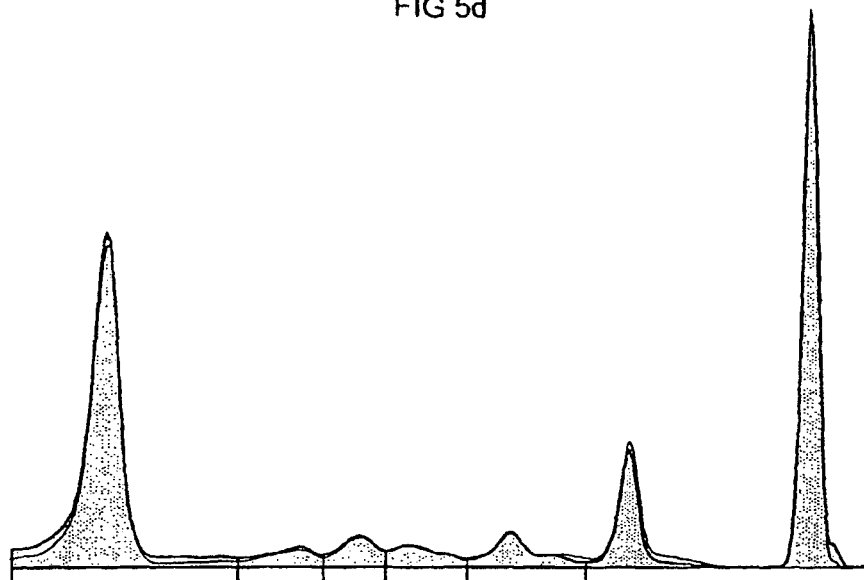
FIG 5c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgM

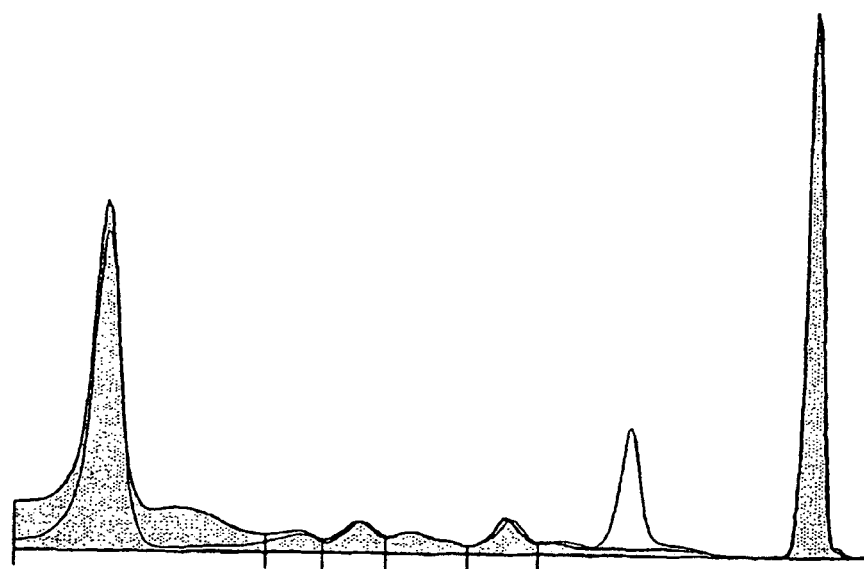
FIG 5d



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Kappa

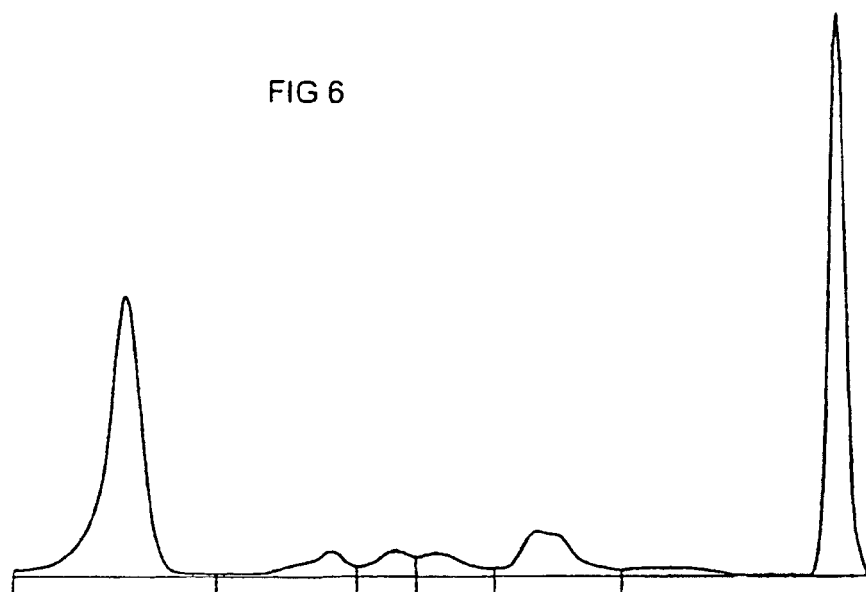
FIG 5e



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Lambda

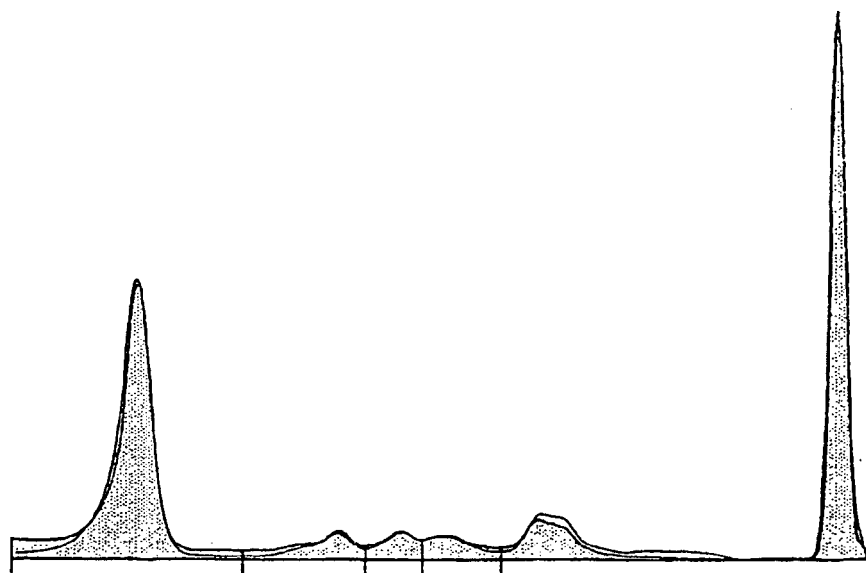
FIG 6



Electroforesis de las proteínas séricas

... Suero con Alambda en beta-1/beta-2 - ELP

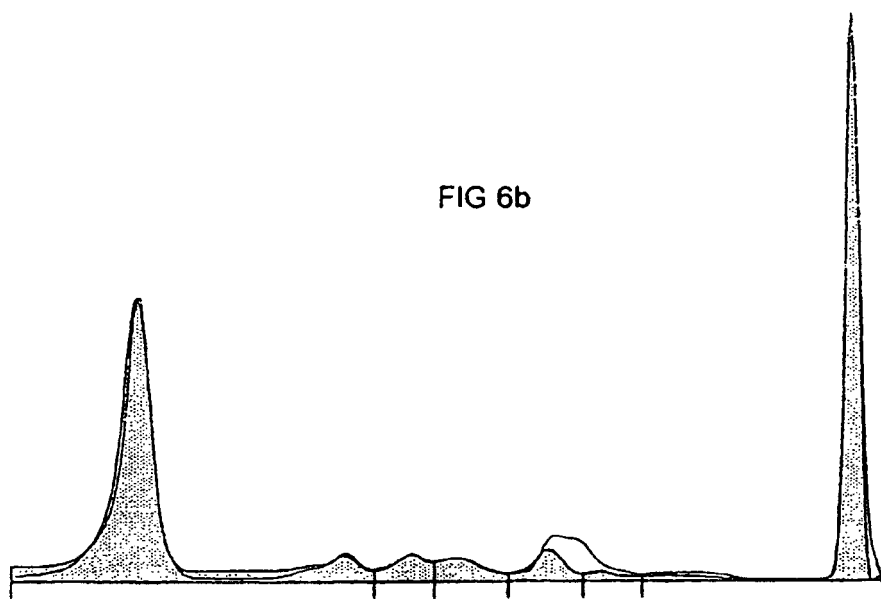
FIG 6a



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgG

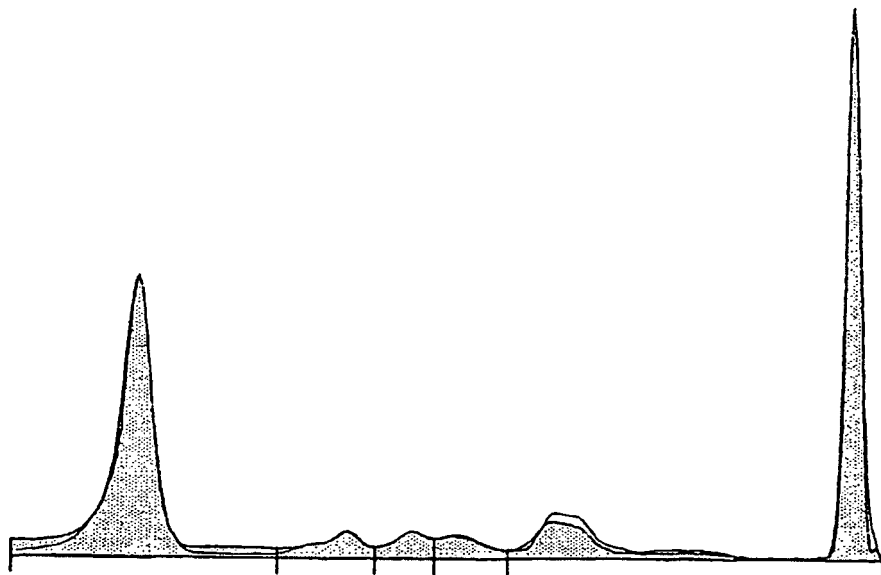
FIG 6b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgA

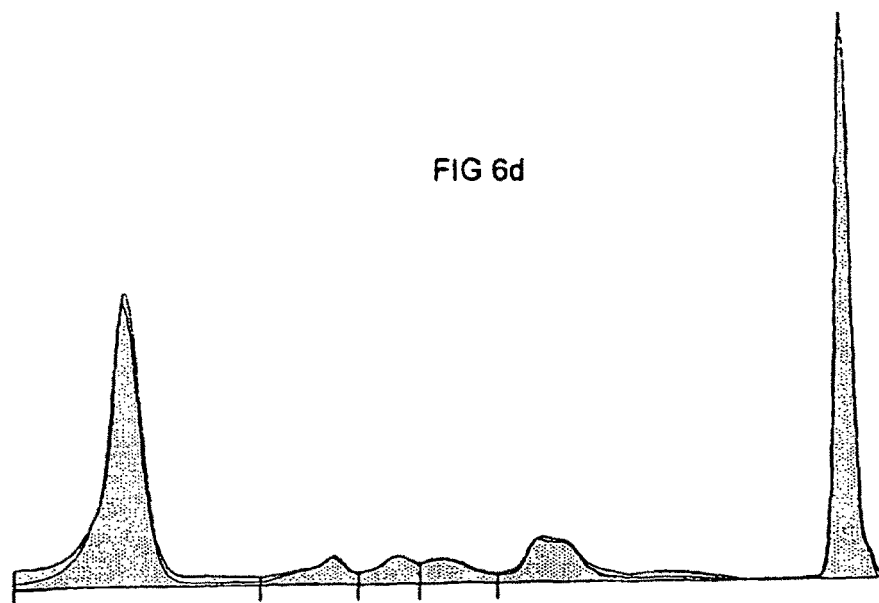
FIG 6c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgM

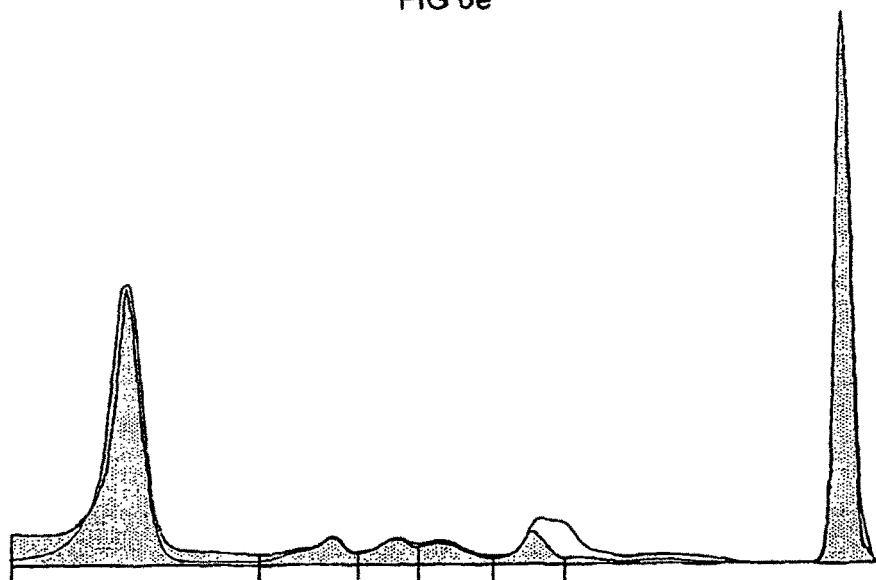
FIG 6d



Electroforesis de las proteínas séricas

anti Kappa

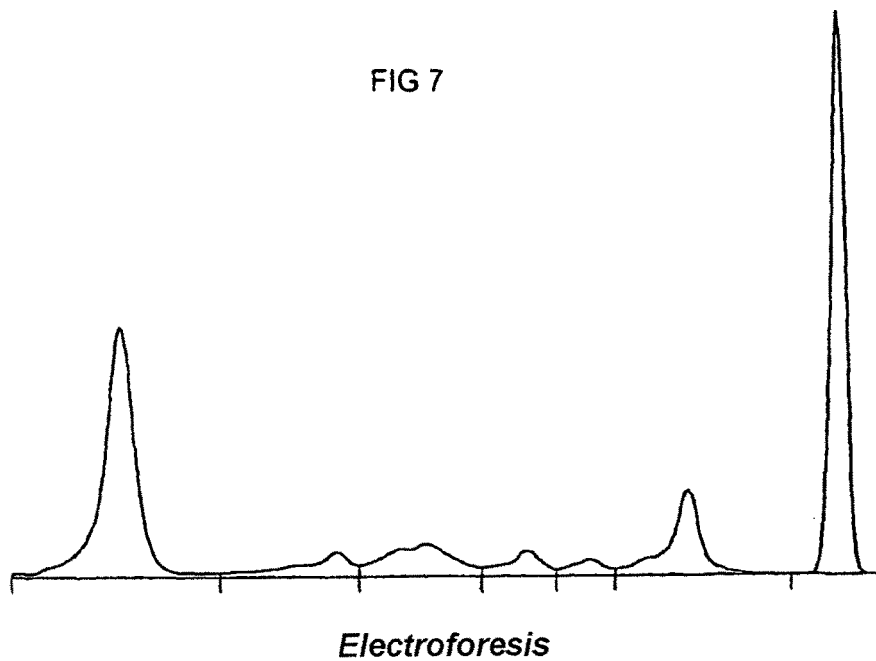
FIG 6e



Electroforesis de las proteínas séricas

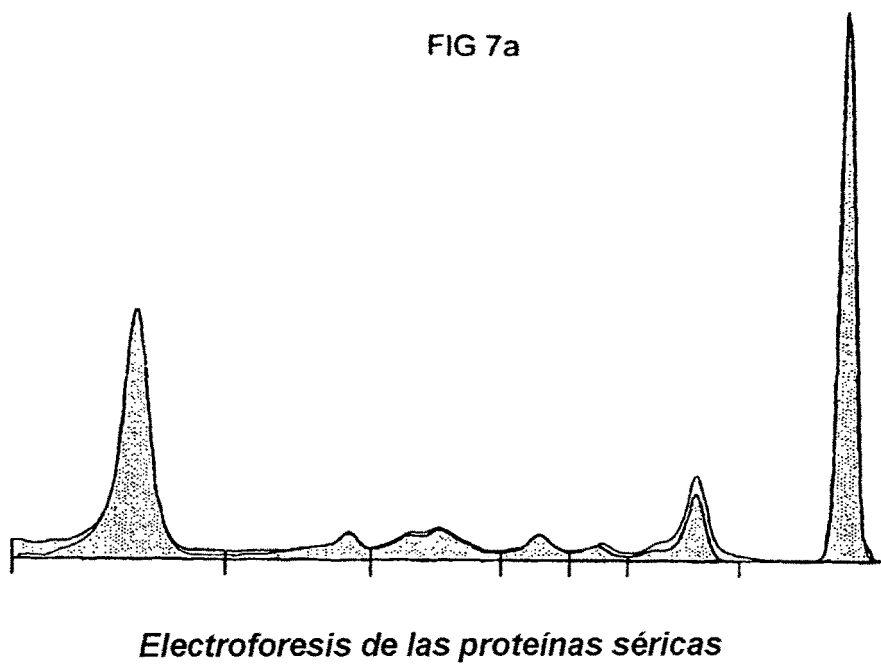
anti Lambda

FIG 7



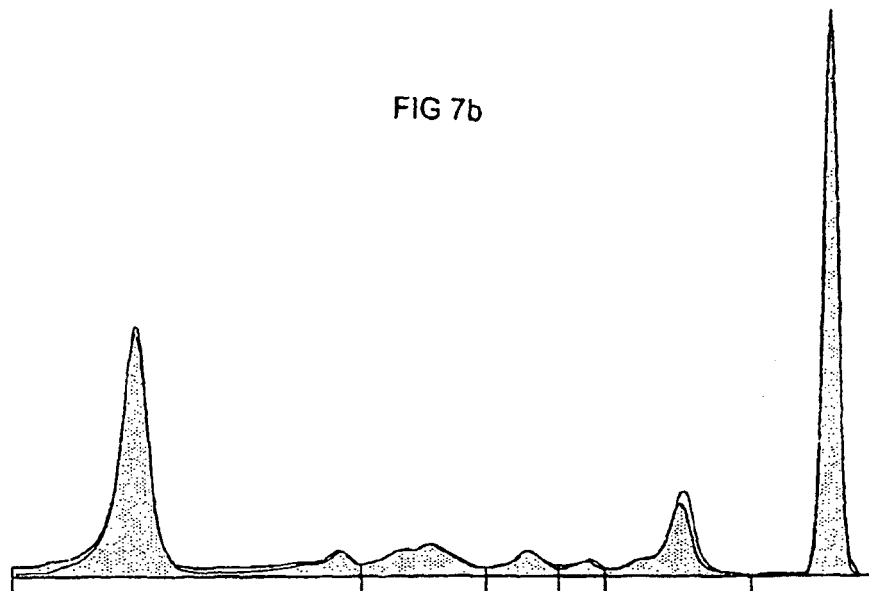
Suero con Mkappa - ELP

FIG 7a



anti IgG

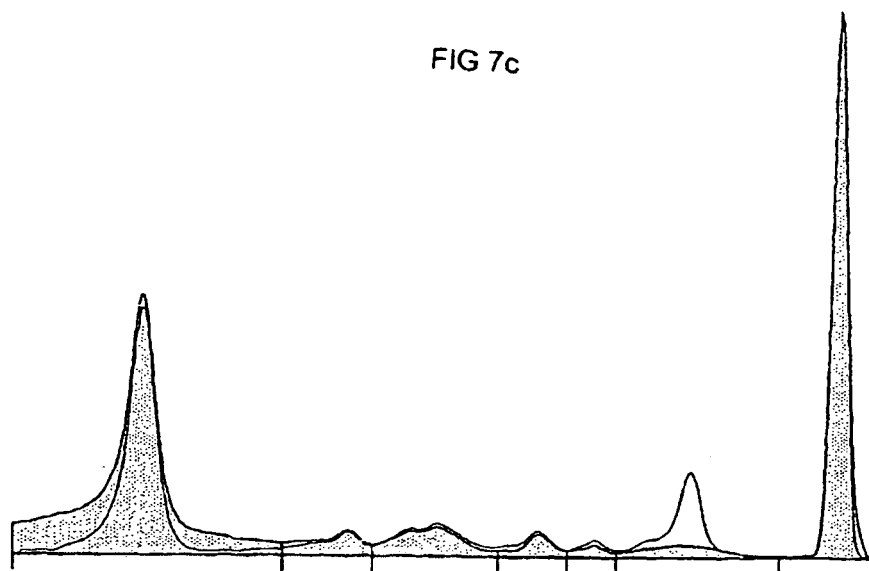
FIG 7b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgA

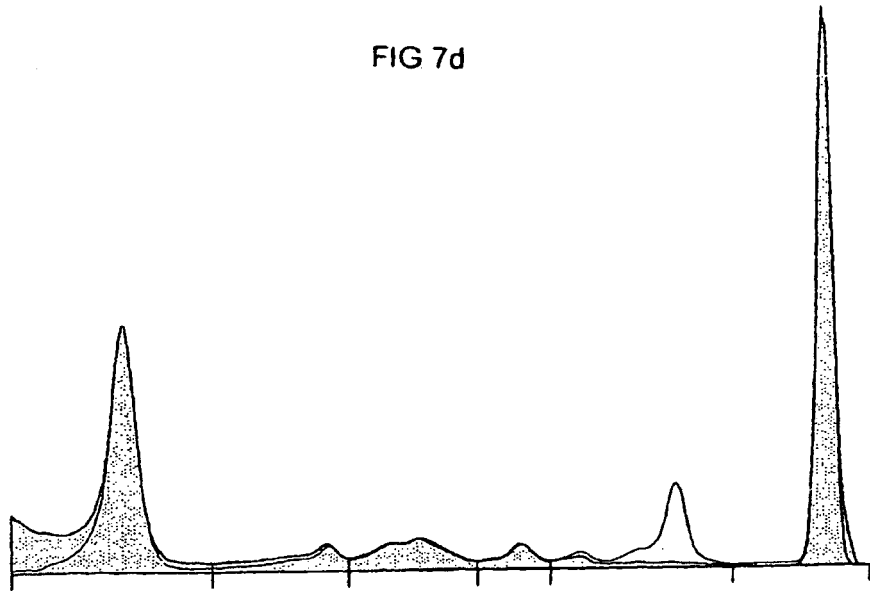
FIG 7c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti IgM

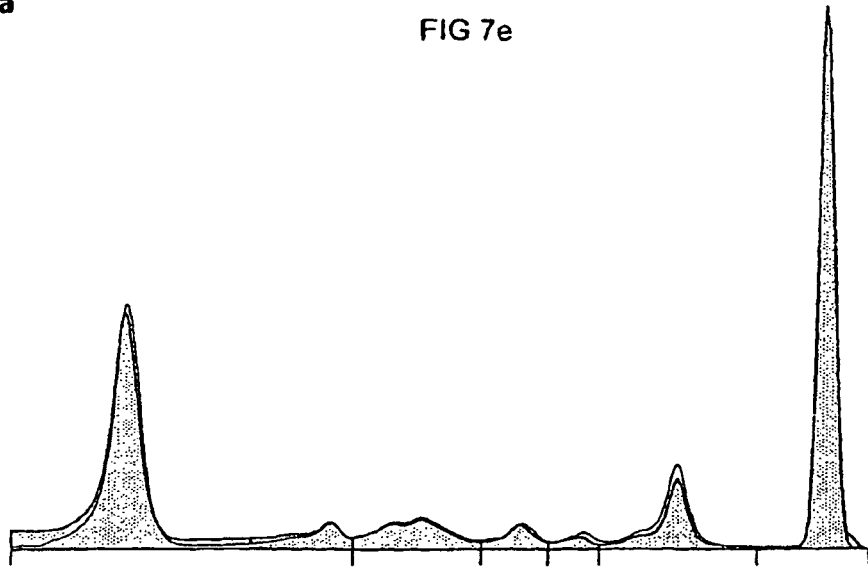
FIG. 7d



Electroforesis de las proteínas séricas

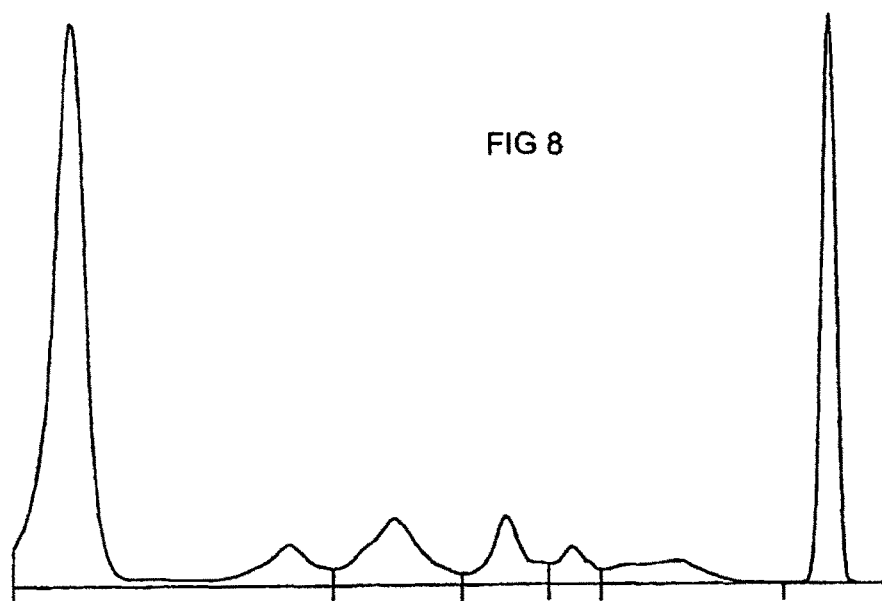
anti Kappa

FIG 7e



Electroforesis de las proteínas séricas

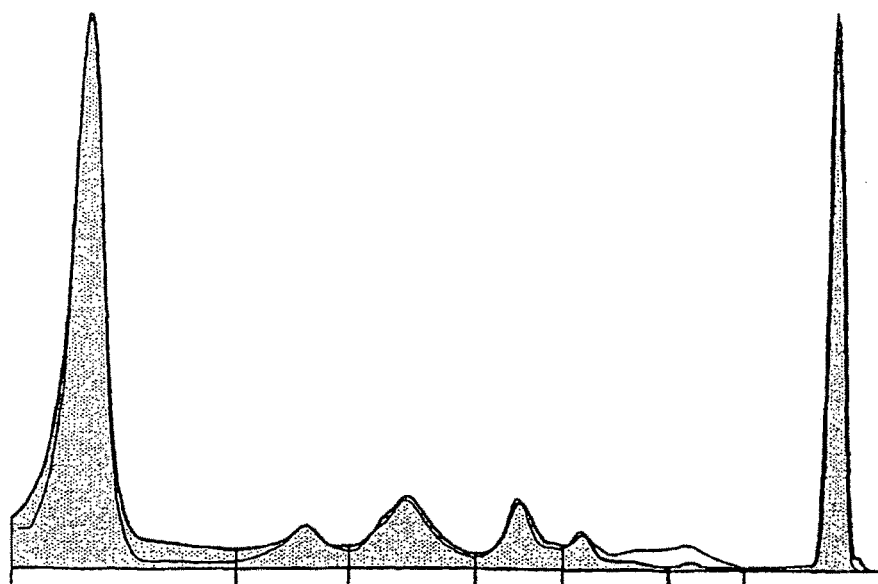
anti Lambda



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con Lambda libre en gamma - ELP

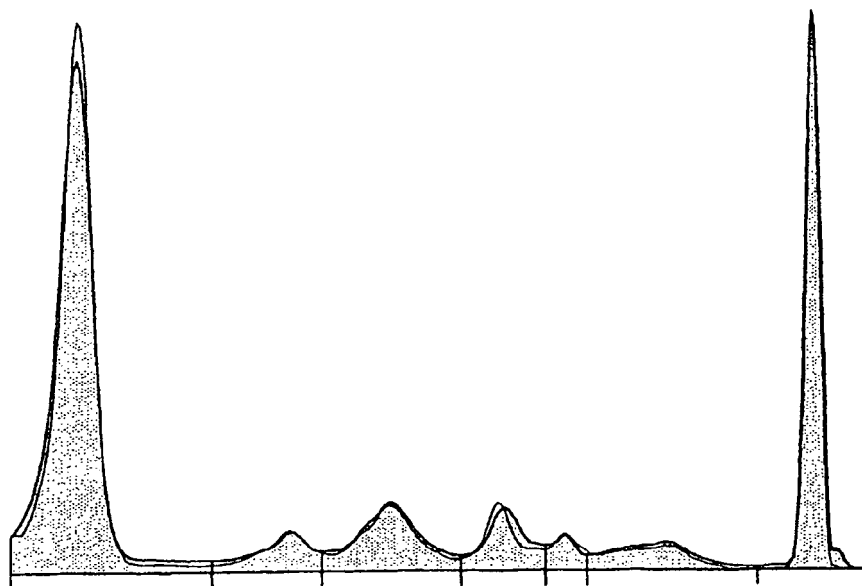
FIG 8a



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-IgG

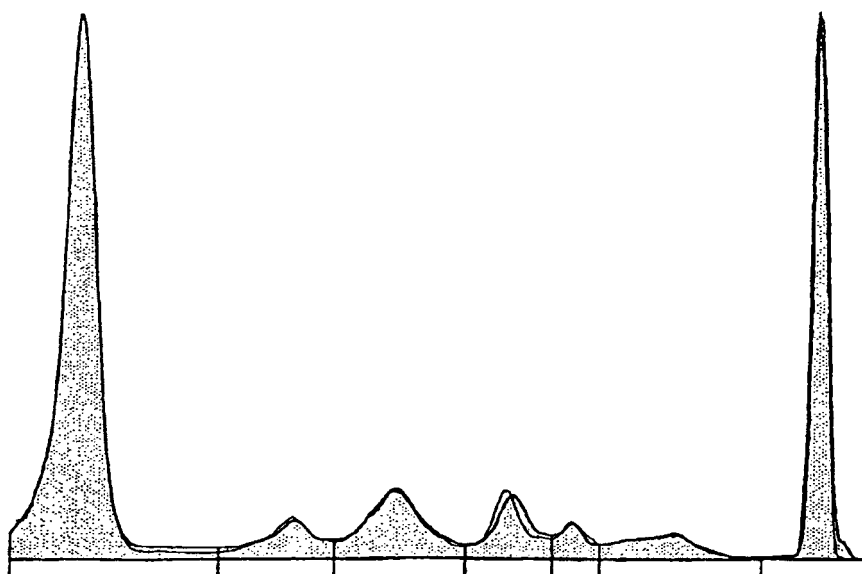
FIG 8b



Electroforesis de las proteínas séricas

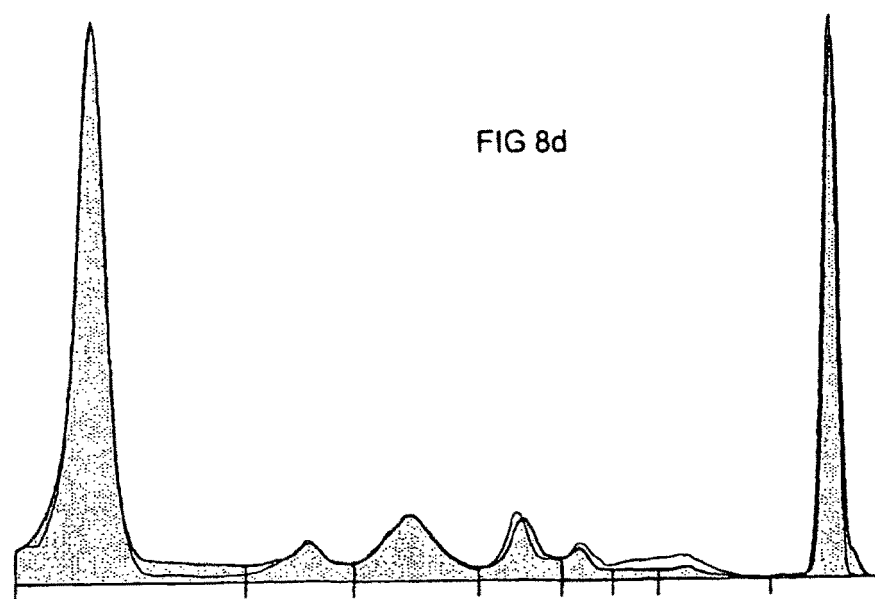
anti-IgA

FIG 8c



Electroforesis de las proteínas séricas

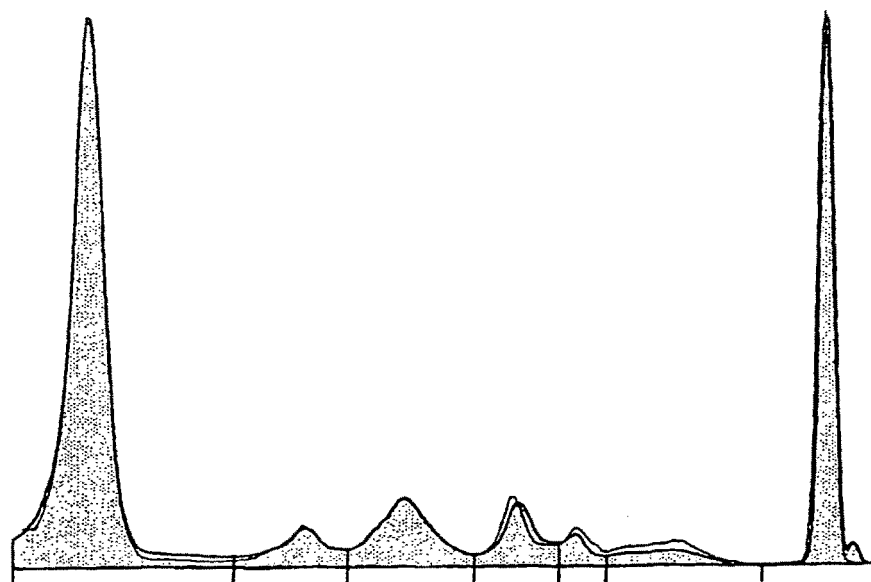
anti-IgM



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-Kappa

FIG 8e



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-Lambda

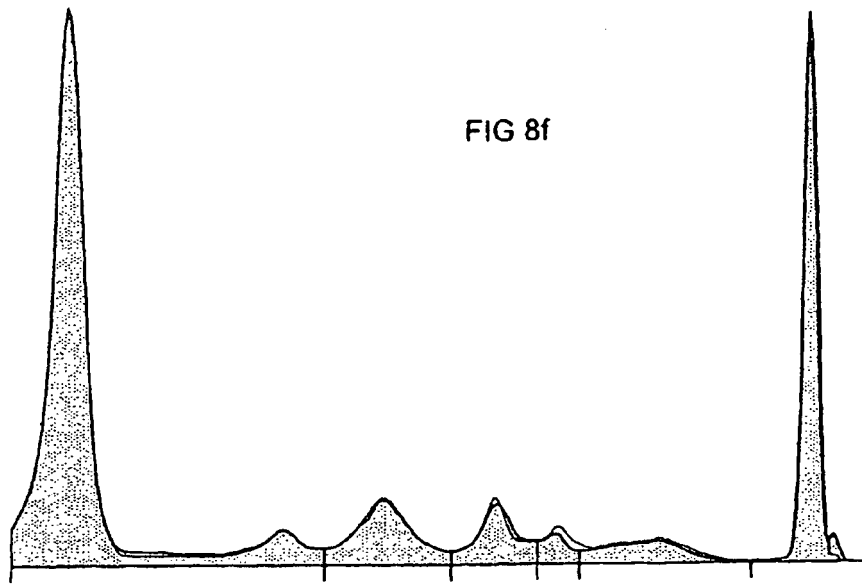
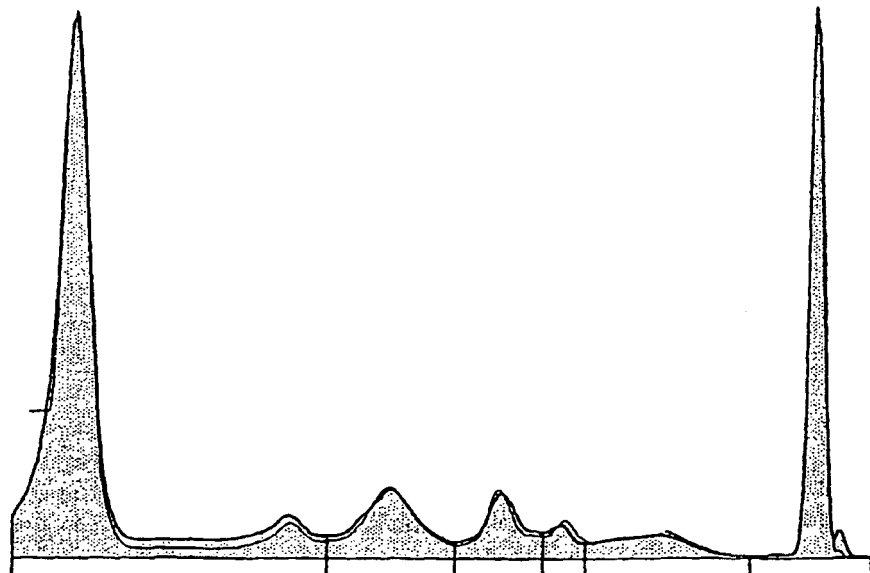


FIG 8f

Electroforesis de las proteínas séricas

anti-Kappa libre

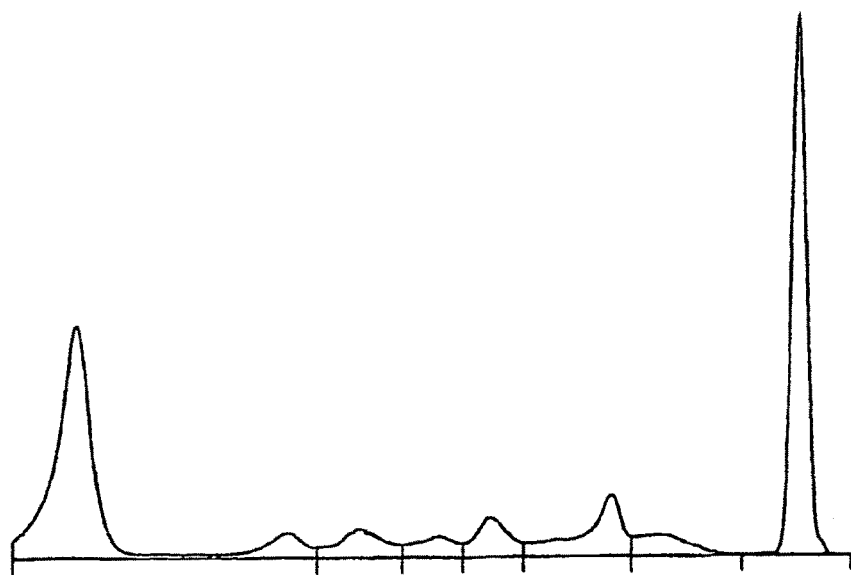
FIG 8g



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-Lambda libre

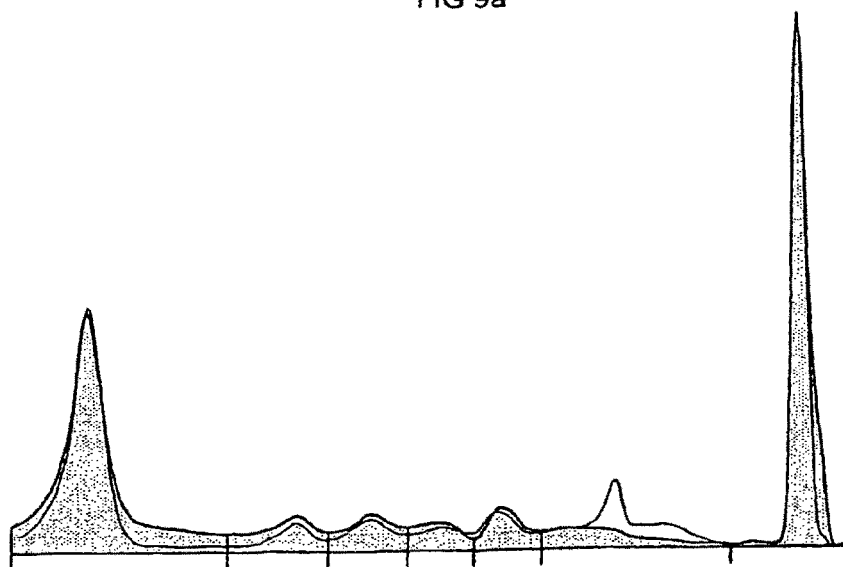
FIG 9



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con Lambda en gamma - ELP

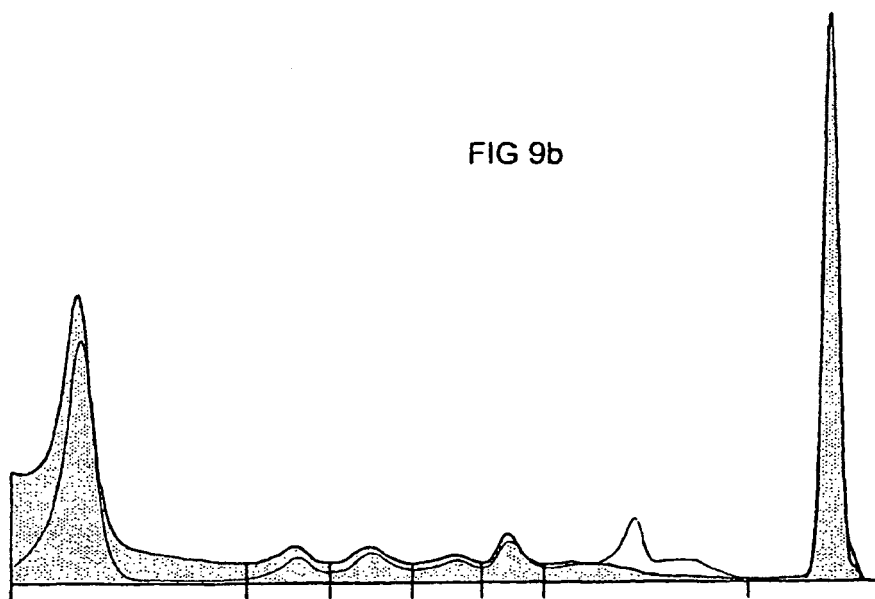
FIG 9a



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-IgG injertado con anhídrido tricarboxílico

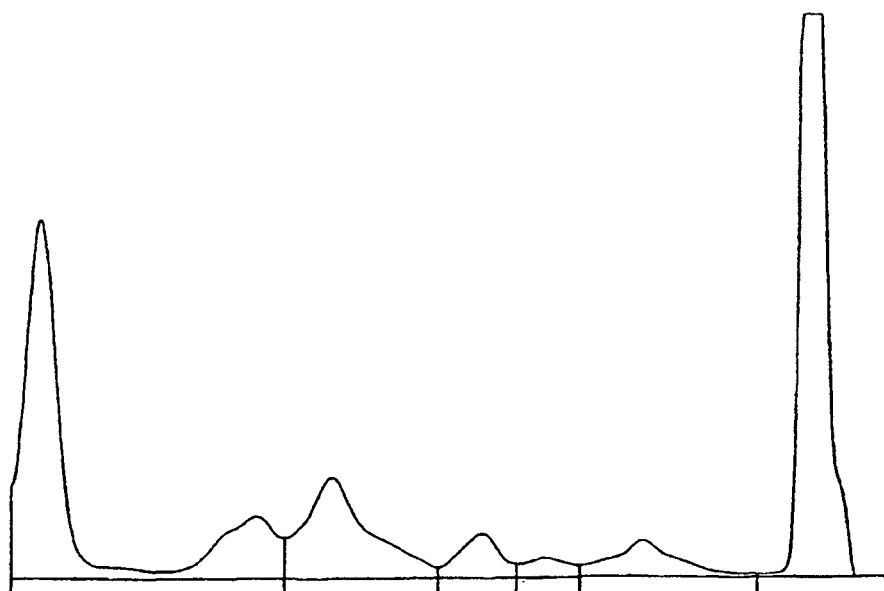
FIG 9b



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-IgG injertado con ácido melítico

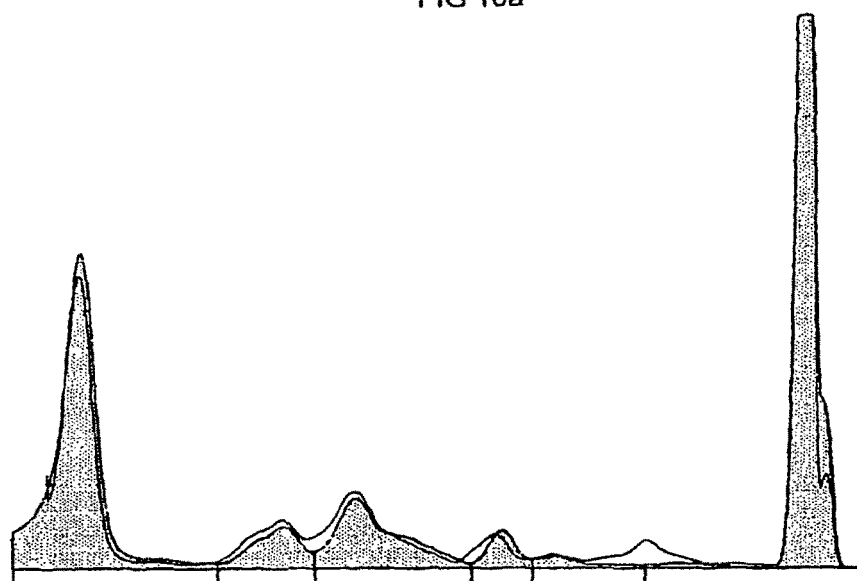
FIG 10



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con Gkappa en gamma, método in-capilar - ELP

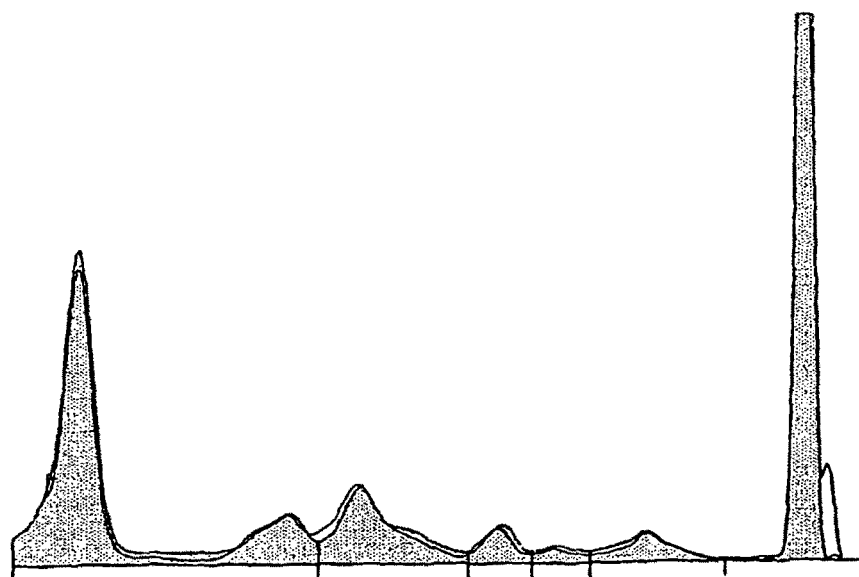
FIG 10a



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-IgG

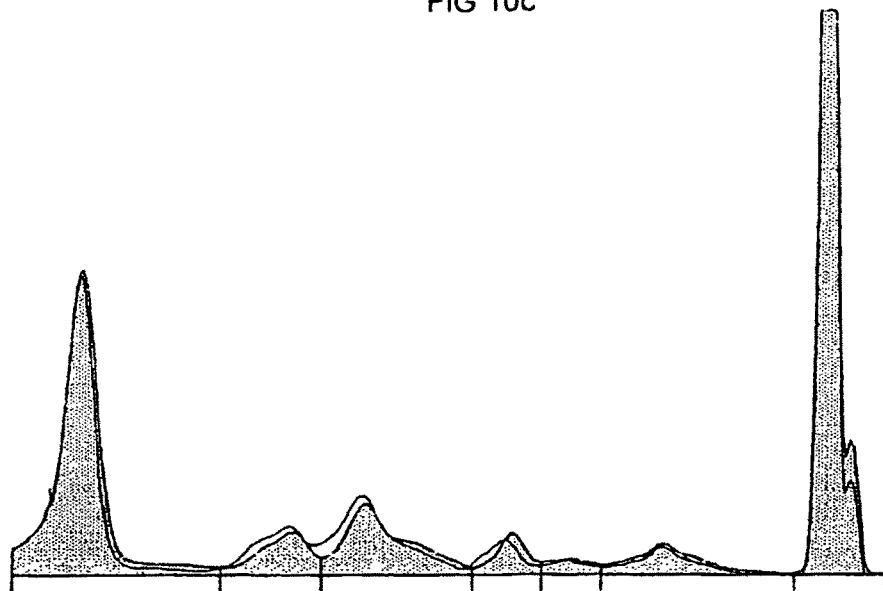
FIG 10b



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-IgA

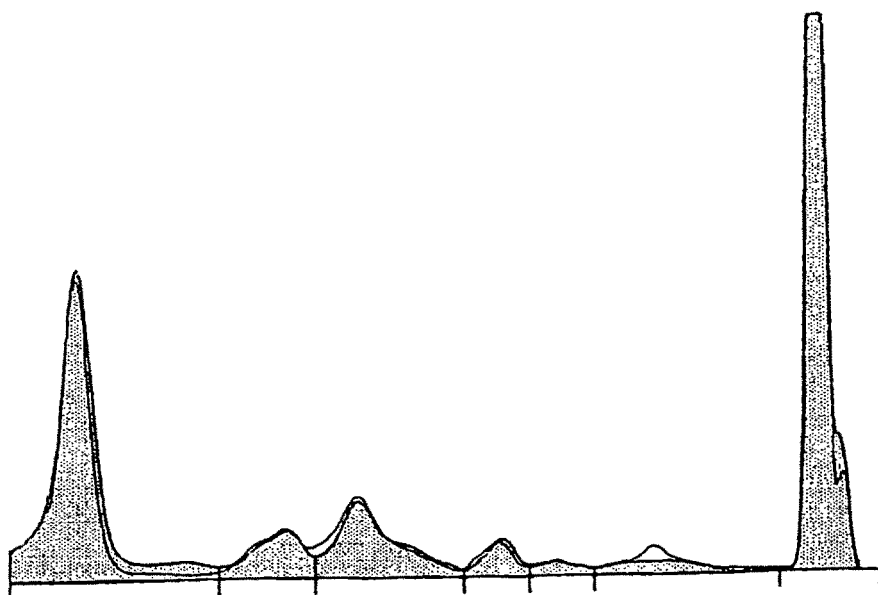
FIG 10c



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-IgM

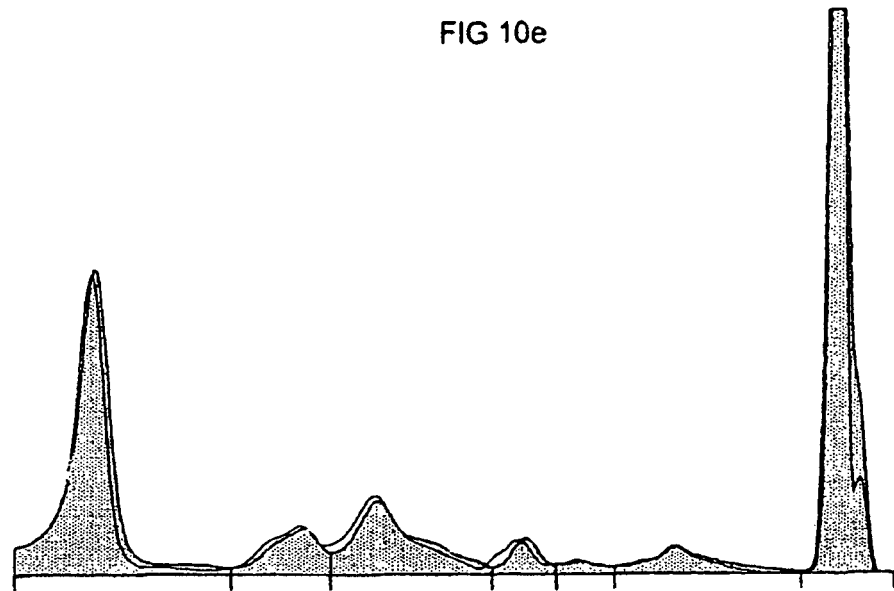
FIG 10d



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-kappa

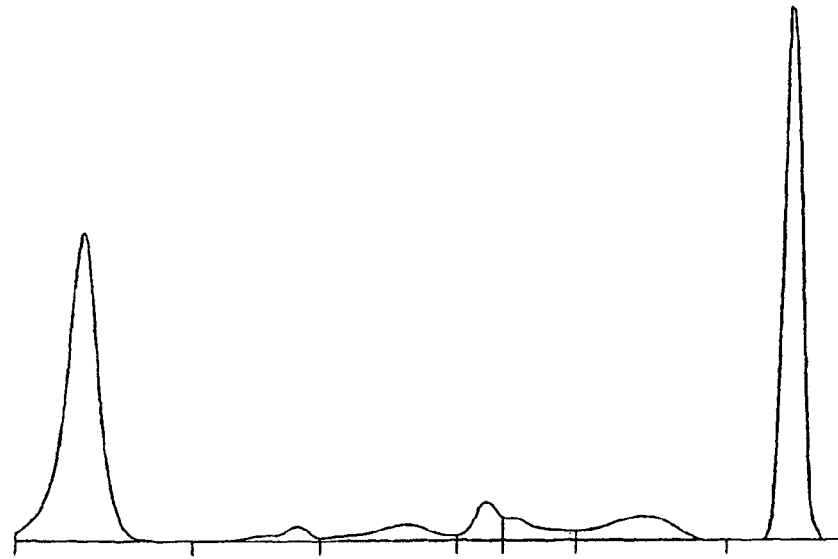
FIG 10e



Electroforesis de las proteínas séricas

anti-lambda

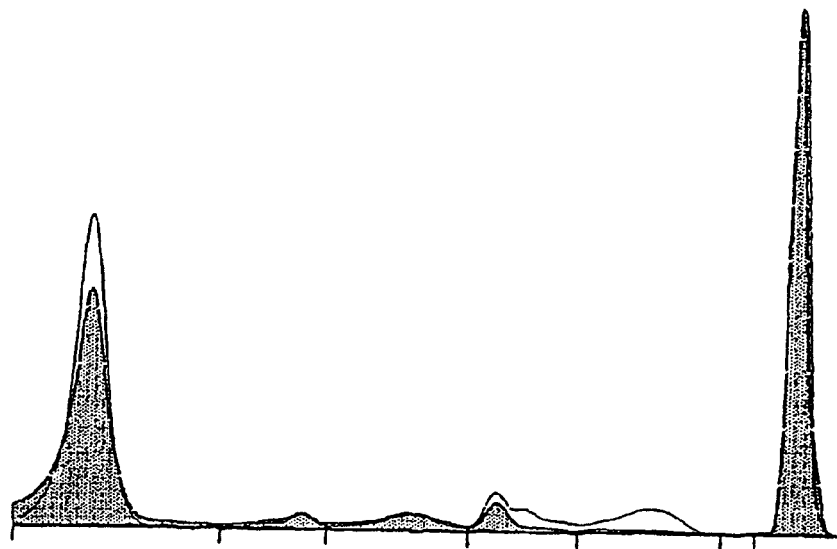
FIG 11



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con pico respaldado sobre beta-1 - ELP

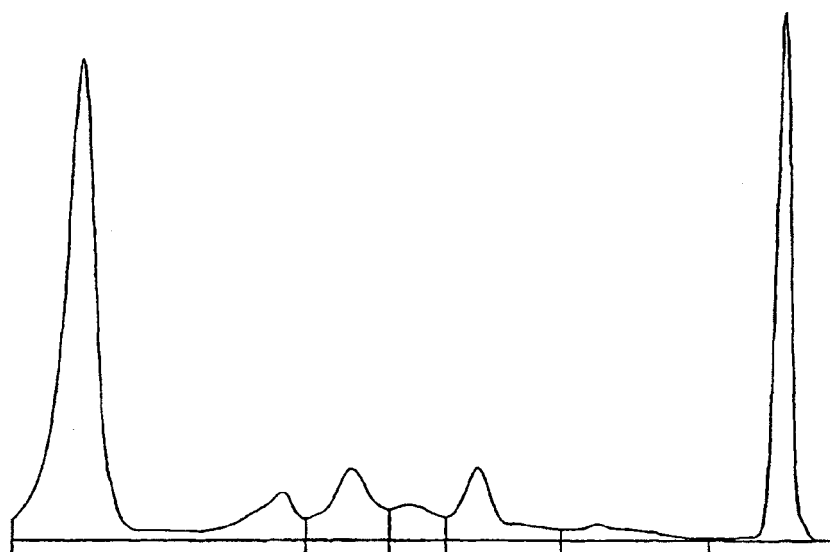
FIG 11a



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con pico respaldado sobre beta-1 - Pentavalente

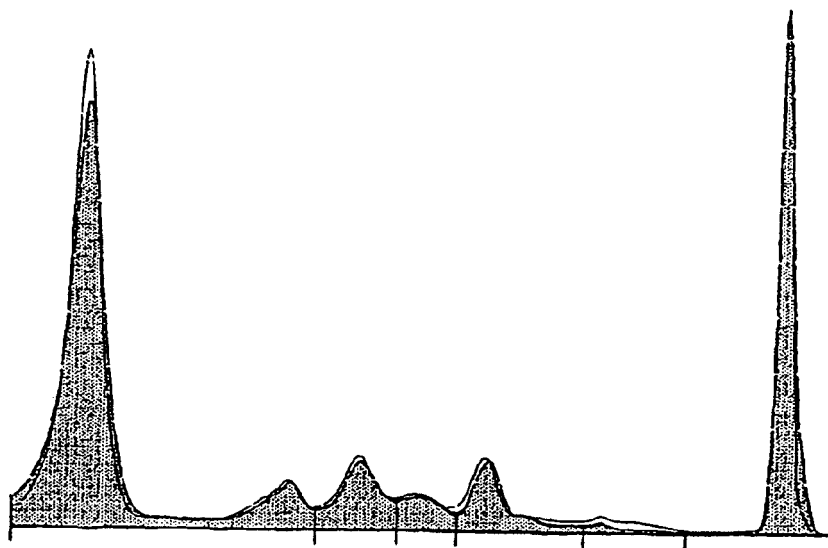
FIG 12



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con lambda libre en gamma - ELP

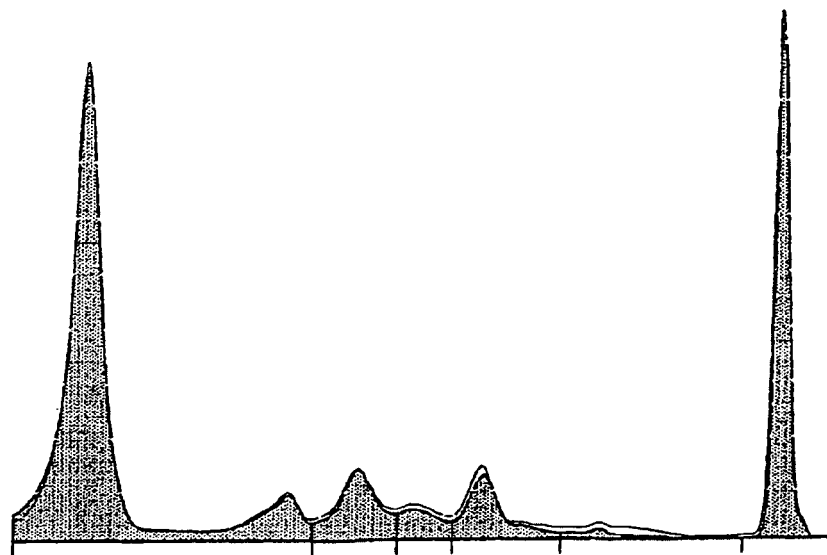
FIG 12a



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con lambda libre en gamma - Trivalente

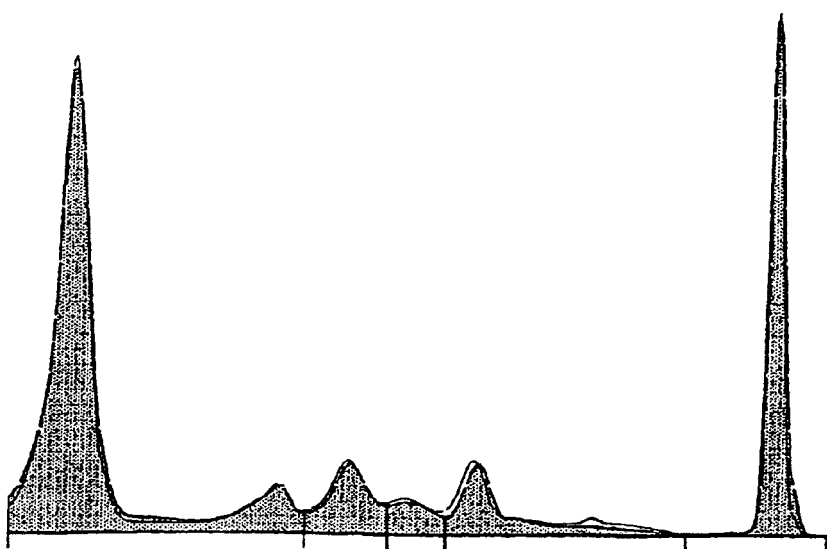
FIG 12b



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con lambda libre en gamma anti-kappa

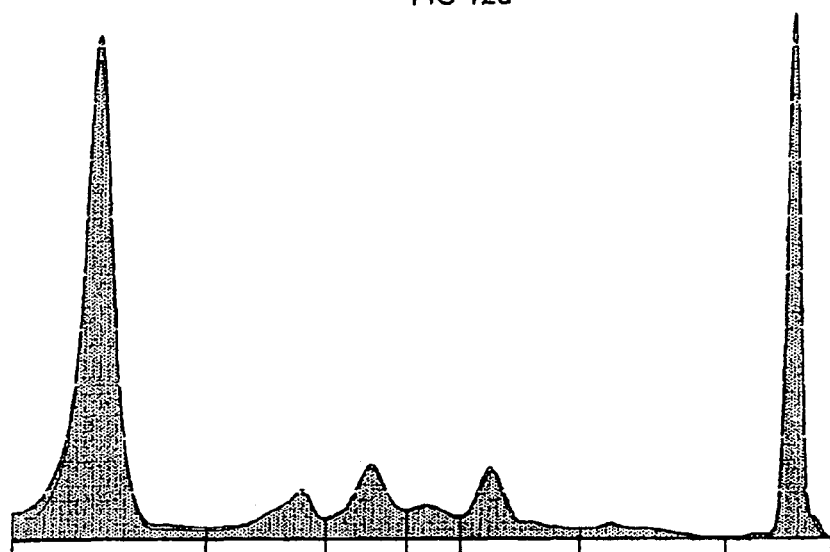
FIG 12c



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con lambda libre en gamma anti-lambda

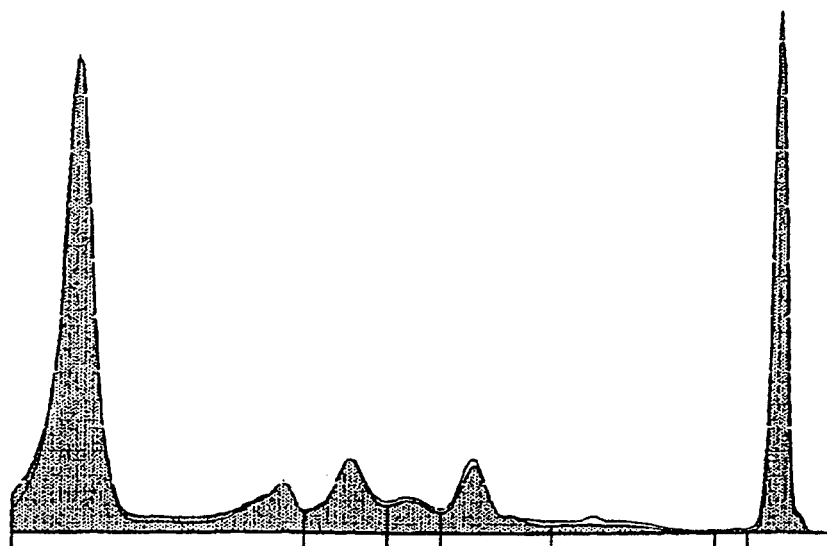
FIG 12d



Electroforesis de las proteínas séricas

Suero con lambda libre en gamma anti-kappa libre

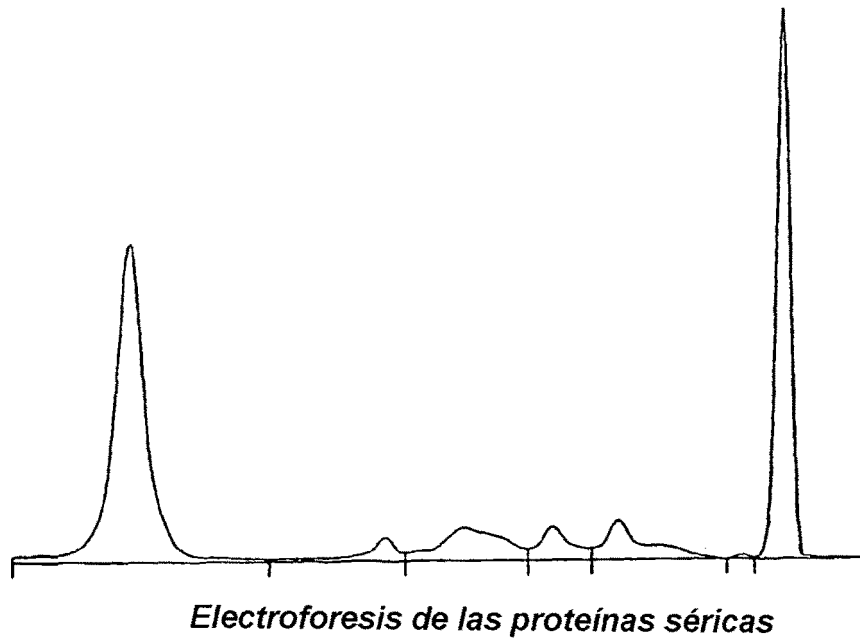
FIG 12e



Electroforesis de las proteínas séricas

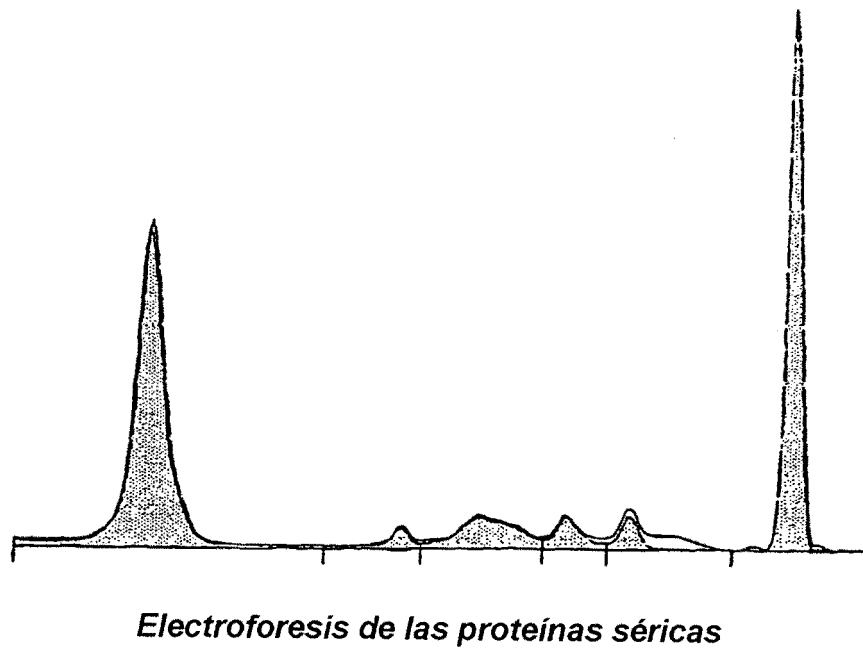
Suero con lambda libre en gamma anti-lambda libre

FIG 13



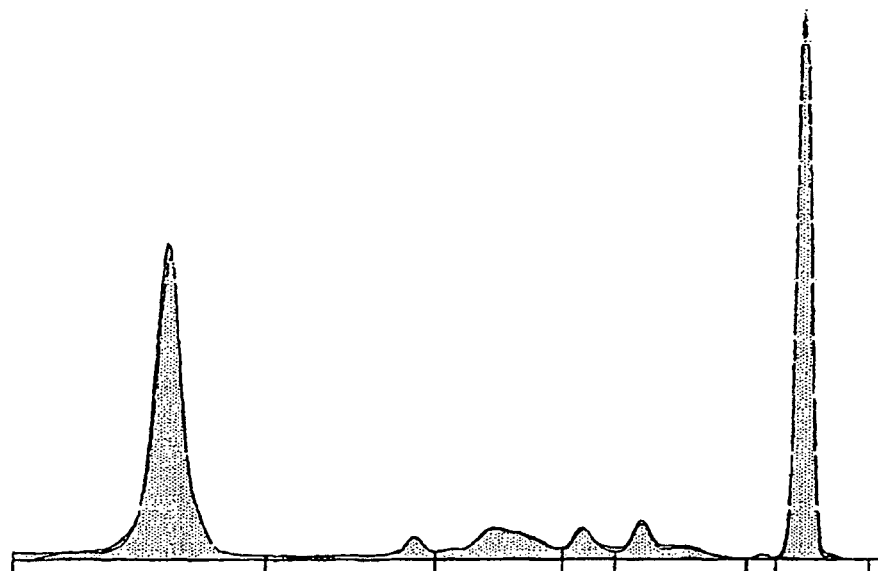
Suero con Mkappa en gamma, Tampón de proteínas ELP

FIG 13a



Anti-IgG

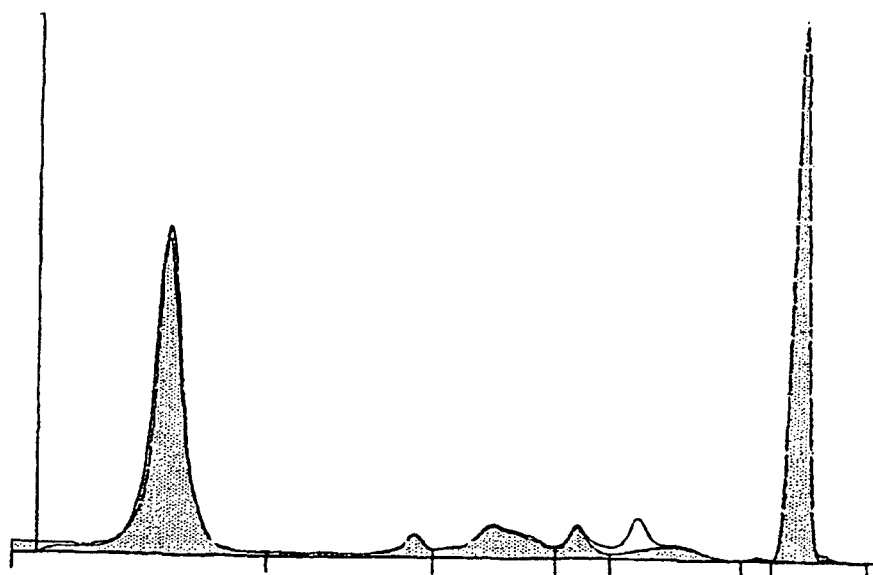
FIG 13b



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-IgA

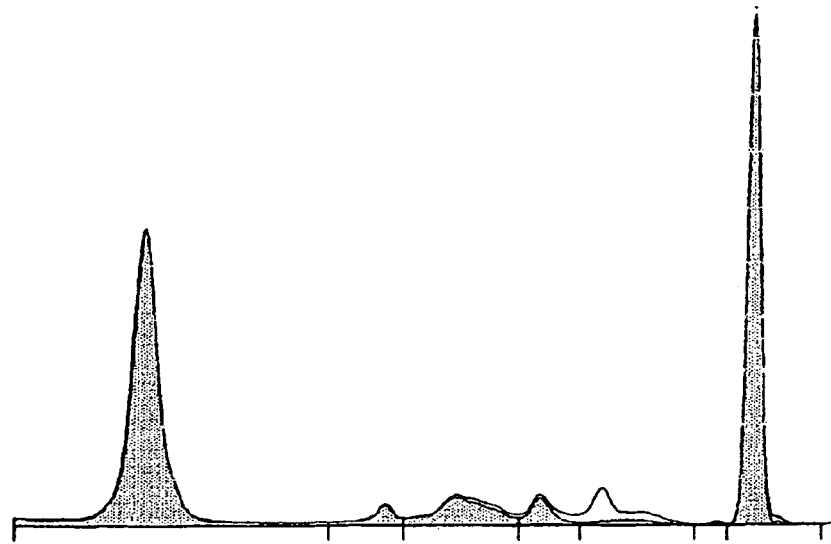
FIG 13c



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-IgM

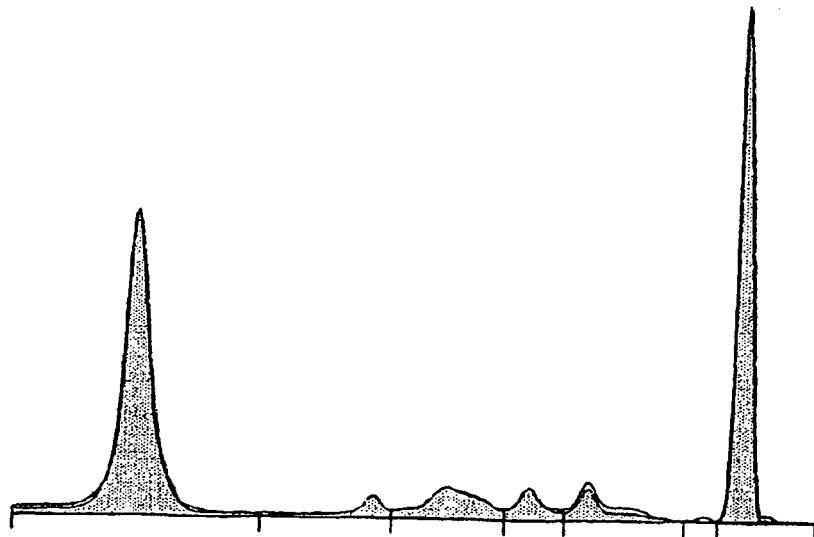
FIG 13d



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-kappa

FIG 13e



Electroforesis de las proteínas séricas

Anti-lambda