

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 783**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2017** **PCT/GB2017/050489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017** **WO17144900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2017** **E 17708320 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** **EP 3420361**

54 Título: **Kit de espectrometría de masas**

30 Prioridad:

25.02.2016 GB 201603291

29.07.2016 US 201662368606 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.03.2023

73 Titular/es:

THE BINDING SITE GROUP LIMITED (50.0%)

8 Calthorpe Road Edgbaston

Birmingham, West Midlands B15 1QY, GB y

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

MURRAY, DAVID L.;

HARDING, STEPHEN;

BARNIDGE, DAVID R.;

WALLIS, GREGG;

MILLS, JOHN y

ASHBY, JAMIE

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 936 783 T3

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

DESCRIPCIÓN

Kit de espectrometría de masas

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos específicos anti-inmunoglobulina (o fragmentos de los mismos) que comprenden una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada y, como mínimo, una cadena ligera de los anticuerpos. Estos se utilizan en el aislamiento o la purificación de inmunoglobulinas a partir de muestras. También se da a conocer la utilización de inmunoglobulinas de control para su incorporación en muestras que se utilizarán como patrones en espectrometría de masas.
- 10 Las moléculas de anticuerpo (también conocidas como inmunoglobulinas) tienen una simetría doble y típicamente se componen de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que contienen, cada una, dominios variables y constantes. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se combinan para formar un sitio de unión al antígeno, de modo que ambas cadenas contribuyen a la especificidad de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo. La estructura tetramérica básica de los anticuerpos comprende dos cadenas pesadas unidas covalentemente por un enlace disulfuro. Cada cadena pesada está unida a su vez a una cadena ligera, de nuevo por medio de un enlace disulfuro. Esto produce una molécula sustancialmente en forma de "Y".
- 15 Las cadenas pesadas son las más grandes de los dos tipos de cadena que se encuentran en los anticuerpos, con una masa molecular típica de 50.000-77.000 Da, en comparación con la cadena ligera más pequeña (25.000 Da).
- 20 Hay cinco clases principales o clase o clases de cadenas pesadas que son γ , α , μ , δ y ϵ , que son las cadenas pesadas constituyentes para: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente. La IgG es la principal inmunoglobulina del suero humano normal y representa el 70-75 % del conjunto total de inmunoglobulinas. Este es el principal anticuerpo de las respuestas inmunitarias secundarias. Forma un solo tetrámero de dos cadenas pesadas más dos cadenas ligeras.
- 25 La IgM representa aproximadamente el 10 % del conjunto de inmunoglobulinas. Las moléculas, junto con las cadenas J, forman un pentámero de cinco de las estructuras básicas de 4 cadenas. Las cadenas pesadas individuales tienen un peso molecular de aproximadamente 65.000 Da y la molécula completa tiene un peso molecular de aproximadamente 970.000 Da. La IgM está confinada en gran medida en el conjunto intravascular y es el anticuerpo temprano predominante.
- 30 La IgA representa el 15-20 % del conjunto de inmunoglobulinas séricas humanas. Más del 80 % de la IgA se presenta como un monómero. Sin embargo, parte de la IgA (IgA secretora) existe en forma dimérica.
- 35 La IgD representa menos del 1 % de la inmunoglobulina plasmática total. La IgD se encuentra en la membrana superficial de linfocitos B maduros.
- 40 La IgE, aunque escasa en el suero normal, se encuentra en la membrana superficial de basófilos y mastocitos. Se asocia con enfermedades alérgicas tales como el asma y la fiebre del heno.
- Además de las cinco clases principales o clases, hay cuatro subclases de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Además, hay dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2).
- 45 Hay dos tipos de cadena ligera: Lambda (λ) y Kappa (κ). Hay aproximadamente el doble de moléculas de κ que de λ producidas en seres humanos, pero esto es bastante diferente en algunos mamíferos. Cada cadena contiene aproximadamente 220 aminoácidos en una única cadena polipeptídica que se pliega en un dominio constante y uno variable. Las células plasmáticas producen uno de los cinco tipos de cadenas pesadas junto con moléculas de κ o λ .
- 50 Normalmente hay aproximadamente un 40 % de exceso de producción de cadenas ligeras libres sobre la síntesis de cadenas pesadas. Cuando las moléculas de cadena ligera no están unidas a moléculas de cadena pesada, se conocen como "moléculas de cadena ligera libres". Las cadenas ligeras κ habitualmente se encuentran como monómeros. Las cadenas ligeras λ tienden a formar dímeros.
- 55 Hay una serie de enfermedades proliferativas asociadas con células productoras de anticuerpos.
- En muchas de dichas enfermedades proliferativas, una célula plasmática prolifera para formar un tumor monoclonal de células plasmáticas idénticas. Esto da como resultado la producción de grandes cantidades de inmunoglobulinas idénticas y se conoce como gammapatía monoclonal.
- 60 Enfermedades tales como el mieloma y la amiloidosis sistémica primaria (amiloidosis AL) representan aproximadamente el 1,5 % y el 0,3 %, respectivamente, de las muertes por cáncer en el Reino Unido. El mieloma múltiple es la segunda forma más común de neoplasia hematológica después del linfoma no Hodgkin. En poblaciones caucásicas la incidencia es de aproximadamente 40 por millón por año. Convencionalmente, el diagnóstico de mieloma múltiple se basa en la presencia de un exceso de células plasmáticas monoclonales en la
- 65

médula ósea, inmunoglobulinas monoclonales en el suero o la orina y alteraciones relacionadas de órganos o tejidos, tales como hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia o lesiones óseas. El contenido normal de células plasmáticas de la médula ósea es de aproximadamente el 1 %, mientras que en mieloma múltiple el contenido típicamente es superior al 10 %, frecuentemente superior al 30 %, pero puede estar por encima del 90 %.

La amiloidosis AL es un trastorno de la conformación de proteínas caracterizado por la acumulación de fragmentos de cadenas ligeras libres monoclonales como depósitos de amiloide. Típicamente, estos pacientes presentan insuficiencia cardíaca o renal, pero también pueden estar implicados los nervios periféricos y otros órganos.

Hay una serie de otras enfermedades que pueden identificarse por la presencia de inmunoglobulinas monoclonales en el torrente sanguíneo, o incluso en la orina, de un paciente. Estas incluyen plasmacitoma y plasmacitoma extramedular, un tumor de células plasmáticas que surge fuera de la médula ósea y puede producirse en cualquier órgano. Cuando está presente, la proteína monoclonal es típicamente IgA. Los plasmocitomas solitarios múltiples pueden producirse con o sin evidencia de mieloma múltiple. La macroglobulinemia de Waldenström es un trastorno linfoproliferativo de bajo grado que se asocia con la producción de IgM monoclonal. Hay aproximadamente 1.500 casos nuevos por año en los Estados Unidos y 300 en el Reino Unido. La cuantificación de IgM sérica es importante tanto para el diagnóstico como para el seguimiento. Los linfomas no Hodgkin de linfocitos B causan aproximadamente el 2,6 % de todas las muertes por cáncer en el Reino Unido y se han identificado inmunoglobulinas monoclonales en el suero de aproximadamente el 10-15 % de los pacientes utilizando procedimientos de electroforesis estándar. Los informes iniciales indican que las cadenas ligeras libres monoclonales pueden detectarse en la orina del 60-70 % de los pacientes. En la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, se han identificado proteínas monoclonales mediante inmunoanálisis de cadenas ligeras libres.

Adicionalmente, existen las llamadas afecciones GMSI. Estas son gammapatías monoclonales de significado incierto. Este término denota la presencia inesperada de una inmunoglobulina monoclonal intacta en individuos que no tienen evidencia de mieloma múltiple, amiloidosis AL, macroglobulinemia de Waldenström, etc. La GMSI se puede encontrar en el 1 % de la población mayor de 50 años, en el 3 % mayor de 70 años y hasta en el 10 % mayor de 80 años. La mayoría de estas están relacionadas con IgG o IgM, aunque más raramente están relacionadas con IgA o son bicionales. Aunque la mayoría de las personas con GMSI mueren por enfermedades no relacionadas, la GMSI puede transformarse en gammapatías monoclonales malignas.

En, como mínimo, algunos casos de las enfermedades destacadas anteriormente, las enfermedades presentan concentraciones anormales de inmunoglobulinas monoclonales o cadenas ligeras libres. Cuando una enfermedad produce la replicación anormal de una célula plasmática, a menudo da como resultado la producción de más inmunoglobulinas por ese tipo de célula a medida que ese "monoclón" se multiplica y aparece en la sangre.

La electroforesis por inmunofijación utiliza un anticuerpo precipitante contra las moléculas de inmunoglobulina. Si bien esto mejora la sensibilidad de la prueba, esta no se puede utilizar para cuantificar inmunoglobulinas monoclonales debido a la presencia del anticuerpo precipitante. La electroforesis por inmunofijación también es bastante laboriosa de realizar y la interpretación puede ser difícil. La electroforesis capilar en zona se utiliza en muchos laboratorios clínicos para la separación de proteínas séricas y es capaz de detectar la mayoría de las inmunoglobulinas monoclonales. Sin embargo, en comparación con la inmunofijación, la electroforesis capilar en zona no detecta proteínas monoclonales en el 5 % de las muestras. Estos resultados denominados "falsos negativos" abarcan proteínas monoclonales de baja concentración.

Se han producido determinaciones de κ y λ total. Sin embargo, las determinaciones de κ total y λ total son demasiado insensibles para la detección de inmunoglobulina monoclonal o cadena ligera libre. Esto se debe a las altas concentraciones de fondo de cadenas ligeras policlonales unidas que interfieren en dichas determinaciones.

Más recientemente, se ha desarrollado una determinación sensible que puede detectar las cadenas ligeras κ libres y, por separado, las cadenas ligeras λ libres. Este procedimiento utiliza un anticuerpo policlonal dirigido contra las cadenas ligeras κ libres o λ libres. La posibilidad de generar dichos anticuerpos también se analizó como una de una serie de especificidades posibles diferentes, en la Patente WO 97/17372. Este documento da a conocer procedimientos para hacer tolerante a un animal para permitirle producir los anticuerpos deseados que son más específicos que los que podrían producir técnicas de la técnica anterior. La determinación de cadenas ligeras libres utiliza los anticuerpos para unirse a cadenas ligeras λ libres o κ libres. La concentración de las cadenas ligeras libres se determina por nefelometría o turbidimetría. Esto implica la adición de la muestra de prueba a una solución que contiene el anticuerpo apropiado en un recipiente o cubeta de reacción. Se hace pasar un haz de luz a través de la cubeta y, a medida que avanza la reacción antígeno-anticuerpo, la luz que pasa a través de la cubeta se dispersa cada vez más a medida que se forman inmunocomplejos insolubles. En nefelometría, la dispersión de la luz se controla midiendo la intensidad de la luz en un ángulo alejado de la luz incidente, mientras que en turbidimetría, la dispersión de la luz se controla midiendo la disminución de la intensidad del haz de luz incidente. Una serie de calibradores de concentración conocida de antígeno (es decir, κ libre o λ libre) se determinan inicialmente para producir una curva de calibración de la dispersión de la luz medida frente a la concentración de antígeno.

Se ha descubierto que esta forma de determinación detecta con éxito concentraciones de cadenas ligeras libres. Además, la sensibilidad de la técnica es muy alta.

La caracterización de la cantidad o tipos de cadenas ligeras libres (FLC, *free light chains*), cadenas pesadas o subclases, o el tipo de cadena ligera unida a clase o subclase de cadena pesada, es importante en una amplia gama de enfermedades, incluyendo las enfermedades de linfocitos B, tales como mieloma múltiple y otras enfermedades inmunomediadas tales como nefropatía.

La Patente WO2015/154052 da a conocer procedimientos de detección de cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina o mezclas de las mismas, utilizando espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*). Las muestras que comprenden cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas o mezclas de las mismas se inmunopurifican y se someten a espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra. Esto se puede utilizar para detectar proteínas monoclonales en muestras de pacientes. También se puede utilizar para determinar la huella molecular de, isotipar e identificar enlaces disulfuro en anticuerpos monoclonales.

La MS se utiliza para separar, por ejemplo, cadenas lambda y kappa en la muestra por masa y carga. También se puede utilizar para detectar el componente de cadena pesada de las inmunoglobulinas, por ejemplo, reduciendo los enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera utilizando un agente reductor. La MS también se describe en la Patente WO 2015/131169.

La purificación de inmunoglobulinas en una muestra en procedimientos de diagnóstico, típicamente utiliza anticuerpos anti-molécula completa, tales como anticuerpos anti-IgG o anti-IgA o anticuerpos anti-cadena ligera libre, tales como anticuerpos anti-K o anti-cadena ligera λ .

Un problema con esta técnica es que las cadenas ligeras o las cadenas pesadas de los propios anticuerpos purificadores pueden liberarse en la muestra que se va a analizar. Esta contaminación puede afectar a la precisión de la posterior caracterización de la muestra.

Como se indicó anteriormente, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de los anticuerpos normalmente se unen entre sí mediante enlaces disulfuro. Estos enlaces son relativamente débiles y pueden romperse para liberar la cadena pesada y las cadenas ligeras unas de otras.

La Patente WO2006/099481A describe la utilización de reticulaciones de tioéter intracatenarias e intercatenarias en una amplia gama de macromoléculas que incluyen polipéptidos tales como anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, F(ab) y F(ab')₂, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos humanos, anticuerpos armonizados o quiméricos y fragmentos de unión a epítopos. El documento describe que el objetivo de la reticulación es mejorar la estabilidad y las propiedades farmacéuticas y funcionales del anticuerpo o fragmento. En particular, el objetivo es reticular, por ejemplo, las cadenas pesada y ligera de diferentes anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos anti-antígeno viral, incluyendo los anticuerpos anti-RSV. El objetivo declarado es mejorar las propiedades farmacéuticas de los anticuerpos.

La Patente WO00/44788 describe la utilización de tioéteres para reticular diferentes moléculas de anticuerpos de diferentes especificidades con el objetivo de producir agentes terapéuticos mejorados. De manera similar, en la Patente WO91/03493 se muestran conjugados de F(ab)₃ o F(ab)₄ biespecíficos o triespecíficos con diferentes especificidades. Se han observado tioéteres en anticuerpos terapéuticos con niveles crecientes durante el almacenamiento (Zhang Q et al JBC manuscript (2013) M113.468367). Un disulfuro de cadena ligera-cadena pesada (LC214-HC220) puede convertirse en un enlace tioéter. Se observó que un anticuerpo terapéutico IgG1k se convertía en un tioéter en esa posición a una tasa del 0,1 % por día mientras circulaba en la sangre. También se observó que se formaban anticuerpos endógenos en individuos humanos sanos. Zhang et al repitieron la formación de tioéter *in vitro*. Esto se utilizó para ayudar a evaluar el impacto de seguridad de los enlaces tioéter en los anticuerpos monoclonales terapéuticos. Goldberg et al., Bioconjugate Chem., 1991, 2, 275, dan a conocer la utilización de anticuerpos monoclonales reticulados en determinaciones y purificación.

La Patente WO2015/154052 da a conocer la inmunopurificación de inmunoglobulinas y el posterior análisis mediante espectrometría de masas.

A diferencia de Zhang, que consideraba problemática la formación de reticulaciones, el solicitante se ha percatado de que, para algunas utilizaciones, la formación de anticuerpos reticulados puede tener ventajas inesperadas.

El solicitante se ha percatado de que sería beneficioso reducir la cantidad de contaminación, tal como la liberación de cadenas ligeras libres a partir de inmunoglobulinas intactas, fragmentos F(ab) o F(ab')₂ o la liberación de nanocuerpos a partir de la perla, a partir de anticuerpos purificadores.

La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

El primer aspecto de la presente invención da a conocer:

Un procedimiento de caracterización de una inmunoglobulina, que comprende poner en contacto una muestra que contiene la inmunoglobulina con una mezcla de anticuerpos específicos anti-inmunoglobulina policlonales o fragmentos específicos anti-inmunoglobulina de los mismos, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento; permitir que la inmunoglobulina se una al anticuerpo o fragmento; lavar el material no unido de la inmunoglobulina unida al anticuerpo o fragmento; eliminar la inmunoglobulina unida del anticuerpo o fragmento para producir una inmunoglobulina o fragmento purificado; y caracterizar la inmunoglobulina o fragmento purificado mediante espectroscopia de masas

Las reticulaciones son típicamente intramoleculares entre cadenas del mismo anticuerpo.

La reticulación típicamente comprende un enlace tioéter.

Una reticulación de tioéter comprende un enlace tioéter. Este es una unión entre residuos del anticuerpo en la que la unión tiene un solo enlace azufre en lugar de un enlace disulfato. Es decir, las reticulaciones de tioéter no incluyen uniones que comprenden más de un átomo de azufre, tales como puentes disulfuro que son familiares para los expertos en la materia. En cambio, una reticulación de tioéter comprende un solo enlace de azufre que une los residuos de una macromolécula. Uno o más átomos distintos de azufre adicionales pueden formar adicionalmente la unión.

Los residuos unidos por reticulaciones de tioéter pueden ser residuos naturales o residuos no naturales. La formación de la reticulación de tioéter puede dar como resultado una pérdida de átomos de los residuos, como reconocerán los expertos en la materia. Por ejemplo, la formación de una reticulación de tioéter entre las cadenas laterales de dos residuos de cisteína puede dar como resultado la pérdida de un átomo de azufre y átomos de hidrógeno de los residuos, sin embargo, un experto en la materia reconocerá que la reticulación de tioéter resultante une los residuos de cisteína.

Las reticulaciones de tioéter pueden unir dos residuos cualesquiera del anticuerpo. Uno o más de los residuos pueden seleccionarse, por ejemplo, entre cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, metionina y tirosina. Dos de los residuos pueden seleccionarse del grupo que consiste en cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, metionina y tirosina. Más típicamente, dos de los residuos son residuos de cisteína. Típicamente, solo hay una reticulación de tioéter entre la cadena pesada y la cadena ligera. De manera alternativa, se pueden utilizar dos, tres o más reticulaciones de tioéter. El par de cadenas pesadas del anticuerpo, o un fragmento del mismo, también pueden estar unidas por una o más reticulaciones no disulfuro, tales como enlaces tioéter.

Las reticulaciones de tioéter se describen en, por ejemplo, la Patente WO2006/099481 y Zhang et al (2013) J. Biol. Chem. vol 288(23), 16371-8 y Zhang & Flynn (2013) J. Biol. Chem, vol 288(43), 34325-35.

Pueden utilizarse fosfinas y fosfitos. En este caso, "fosfina" se refiere a cualquier compuesto que contiene, como mínimo, una unidad funcional con las fórmulas generales R3P (en las que P = fósforo y R = cualquier otro átomo). En los fosfitos, las posiciones R están ocupadas específicamente por átomos de oxígeno. Los compuestos que contienen R3P actúan como nucleófilos fuertes que pueden atacar los enlaces disulfuro. Esto puede dar como resultado la reducción de disulfuros, sin embargo, en algunas condiciones, también puede dar como resultado la formación de enlaces tioéter.

Los compuestos incluyen:

Tris(dimetilamino)fosfina (número CAS 1608-26-0)
Tris(dietilamino)fosfina (número CAS 2283-11-6)
Trimetilfosfito (Número CAS 121-45-9)
Tributilfosfina (Número CAS 998-40-3)

Referencias: Bernardes et al. (2008) Angew. Chem. Int. Ed., vol. 47, 2244-2247

Las reticulaciones también pueden comprender reticulantes tales como un reticulante de maleimida, que reacciona con tioles libres para reticularse con cadenas de la molécula de anticuerpo. Se puede hacer que se una a un lado de un grupo tiol y, adicionalmente, a otro resto, tal como un grupo carboxilo de lisina, como se describe en la Patente WO00/44788.

Pueden utilizarse reticulantes bifuncionales que comprendan dos restos reactivos unidos entre sí por un conector, especialmente un conector flexible. El conector puede comprender uno o más carbonos enlazados covalentemente entre sí en una cadena, por ejemplo, un alquilo sustituido o no sustituido. El conector, especialmente un conector C1-C10, de la manera más típica un conector C2-C6 o C3-C6. Los solicitantes han descubierto que los reticulantes

que contienen C2-C6, tales como α,α' -dibromo-*m*-xileno, BMOE (bismaleimidoetano) o BMB (bismaleimidobutano), son particularmente útiles con niveles relativamente altos de recuperación de proteína reticulada.

La bismaleimida es un reticulante homobifuncional reactivo con sulfhidrilo

Esta es una clase bien caracterizada de reticulante que contiene dos grupos maleimida conectados por un hidrocarburo u otro conector. Los grupos maleimida reaccionan espontáneamente con los grupos sulfhidrilo libres expuestos por reducción de disulfuros para formar un enlace tioéter no reducible en cada sulfhidrilo, reticulando así covalentemente las dos cistinas restantes.

Los compuestos incluyen:

Bis(maleimido)etano (número CAS 5132-30-9)
1,4-bis(maleimido)butano (número CAS 28537-70-4)

Referencias:

Auclair et al. (2010) Strategies for stabilizing superoxide dismutase (SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA, vol 107(50) - páginas 21394-9

Geula et al. (2012) Structure-based analysis of VDAC1 protein: defining oligomer contact sites. J Biol Chem, vol 287 (3), 475-85

Kida et al. (2007) Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispanning protein topogenesis. J Cell Biol, vol 171(7) páginas 1441-1452 incorporado en el presente documento como referencia

El α,α' -dibromo-*m*-xileno es un reticulante homobifuncional reactivo con sulfhidrilo que también se puede utilizar

El dibromo-*m*-xileno (Número CAS 626-15-3) es un miembro de la clase de compuestos de haluros de dialquilo y actúa como un reticulante homobifuncional que reacciona con grupos sulfhidrilo libres.

Referencia:

Joe et al. (2012) Development of α -Helical Calpain Probes by Mimicking a Natural Protein-Protein Interaction J Am Chem Soc., vol 134(42) - páginas 17704-13.

Compuestos de reticulación reactivos con sulfhidrilo alternativos que forman enlaces tioéter estables

Se conocen, como mínimo, seis clases de reactivos que reaccionan con sulfhidrilos libres y dan como resultado un producto reticulado covalentemente no reducible. La reactividad específica de estos compuestos a los grupos sulfhidrilo varía y algunos reaccionarán con agua, aminas y grupos carboxilo en determinadas condiciones. Además, muchos de estos compuestos tienen grupos conectores voluminosos, lo que puede limitar su capacidad de reticulación en entornos espaciales restringidos. La lista a continuación ofrece algunos ejemplos de cada clase, pero se proporciona una lista más completa y referencias en:

Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, Wong, S: ISBN 0-8493-5886-8

Bismaleimidas

Bis(maleimido)hexano; N,N'-metilenbismaleimida; bis(N-maleimidometil)éter; N,N'-(1,3-fenileno)-bismaleimida; bis(N-maleimido)-4,4'-bibencilo; naftaleno-1,5-dimaleimida

Derivados de haloacetilo

1,3-Dibromoacetona; N,N'-bis(yodoacetil)polmetilendiamina; N,N'-di(bromoacetil)fenilhidrazina; 1,2-di(bromoacetil)amino-3-fenilhidrazina; bromoacetil-hidrazida de ácido γ -(2,4-dinitrofenil)- α -bromoacetil-L-diaminobutírico

Haluros de dialquilo

Ácido α,α' -dibromo-*p*-xilenosulfónico; ácido α,α' -diyodo-*p*-xilenosulfónico; di(2-cloroetil)sulfuro; tri(2-cloroetil)amina; N,N-bis(β -bromoetil)bencilamina 2.4 s-triazinas Dicloro-6-metoxi-s-triazina; 2,4,6-tricloro-s-triazina (ácido cianúrico); 2,4-dicloro-6-(3'-metil-4-aminoanilino)-s-triazina; 2,4-dicloro-6-amino-s-triazina

Aziridinas

2,4,6-Tri(etilenimido)-s-triazina; N,N'-etileniminoil-1,6-diaminohexano; óxido de tri[1-(2-metilaziridenil)]-fosfina

5 Bis-epóxidos

1,2:3,4-Diepoxibutano; 1,2:5,6-diepoxihexano; bis(2,3-epoxipropil)éter; 1,4-butadioldiglicidoxiéter

10 La reticulación puede reemplazar uno o más enlaces disulfuro de origen natural o, de manera alternativa, puede producirse además del enlace disulfuro.

15 Típicamente, como mínimo, el 50 %, como mínimo, el 60 %, como mínimo, el 70 %, como mínimo, el 80 %, como mínimo, el 90 % o, como mínimo, el 95 % de los anticuerpos están reticulados. Se han observado eficiencias de reticulación del 70 % - 80 % utilizando, por ejemplo, bismaleimida. Los anticuerpos reticulados pueden purificarse aún más para producir niveles más altos de reticulación, por ejemplo, añadiendo un agente reductor para romper los enlaces disulfuro de los anticuerpos no reticulados restantes y separándolos utilizando, por ejemplo, electroforesis en gel.

20 El anticuerpo o fragmento puede ser específico anti-cadena ligera libre (tal como anti-cadena ligera libre kappa o anti-cadena ligera libre lambda), específico de subclase anti-cadena pesada, específico de tipo anti-cadena pesada o específico de tipo de cadena ligera-de clase anti-cadena pesada.

Las clases de cadena pesada pueden ser IgG, IgA, IgM, IgD o IgE, típicamente IgG o IgA.

25 Las subclases de cadena pesada incluyen IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los anticuerpos pueden ser específicos de especie, tales como anti-ser humano o anti-caballo o anti-oveja o anti-cerdo. El anticuerpo puede generarse en peces cartilaginosos, ovejas, cabras, caballos, conejos, vacas, camélidos, tales como llamas, ratas o ratones.

30 Los anticuerpos o fragmentos de la presente invención son capaces de unirse específicamente a las inmunoglobulinas.

35 Típicamente, el anticuerpo o el fragmento se une a un soporte. Este puede ser, por ejemplo, cualquier soporte cromatográfico adecuado generalmente conocido en la técnica para la purificación de proteínas, tal como una inmunopurificación de anticuerpos o fragmentos. Estos incluyen: perlas magnéticas, resinas de agarosa y otros soportes generalmente conocidos en la técnica. La unión covalente y no covalente de anticuerpos a soportes se conoce generalmente en la técnica. Esta se puede conseguir, por ejemplo, haciendo reaccionar los grupos amino libres de los anticuerpos con un soporte activado con un agente, tal como bromuro de cianógeno, N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) o cloruro de tresilo. La carbodiimida soluble en agua, EDC, puede utilizarse para formar funcionalidades éster activas con grupos carboxilato utilizando sulfo-NHS. También se ha utilizado en la técnica la utilización de anticuerpos o soportes biotinilados para unirse a los restos de estreptavidina homólogos en el otro del soporte o los anticuerpos.

45 El anticuerpo o fragmento es un anticuerpo o fragmento policlonal.

Puede darse a conocer la utilización de una mezcla de anticuerpos, o fragmentos, que tengan diferentes especificidades.

50 El fragmento del anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento F(ab')₂.

La muestra puede ser una muestra de tejido o fluido corporal. Esto incluye, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo u orina.

55 En el procedimiento de la presente invención también se da a conocer la utilización de un kit de purificación y determinación de inmunoglobulina que comprende una mezcla de anticuerpos (o fragmentos) específicos anti-inmunoglobulina policlonales y uno o más patrones de espectrometría de masas, comprendiendo los anticuerpos o fragmentos una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento. Dichos patrones proporcionan un patrón interno para dar una indicación del tamaño de los analitos detectados mediante espectrometría de masas.

65 Los solicitantes también se han percatado de que un patrón adecuado, también conocido en el presente documento como control, dentro de la muestra del individuo a analizar, proporcionaría una cantidad patrón interna de inmunoglobulina frente a la cual se puede cuantificar la cantidad de inmunoglobulina de la muestra del individuo. Además, si ese patrón se coloca dentro de la muestra del individuo durante la purificación de la inmunoglobulina

antes de cuantificarla, se puede tener en cuenta cualquier cambio en la inmunoglobulina o pérdidas debidas al proceso de purificación.

Además, la presencia de un control dentro de la muestra también ayuda a eliminar los errores causados por la propia muestra cuando se coloca sobre un objetivo de espectrometría de masas. Por ejemplo, en MALDI-TOF MS, la muestra generalmente se coloca sobre el objetivo y se seca. La distribución de inmunoglobulina en la muestra seca no es uniforme. La presencia del control asegura que, cuando se ioniza con láser, se extrae de la región ionizada por láser una muestra comparable tanto de la inmunoglobulina que se está analizando como del control. Convencionalmente, los ordenadores utilizan una intensidad máxima mediana que conduce a imprecisiones. El control elimina algunas de las imprecisiones y ayuda en la producción de mediciones cuantitativas, en lugar de cualitativas, de la inmunoglobulina.

Otro aspecto de la presente invención da a conocer un procedimiento de cuantificación de una cantidad de una inmunoglobulina o fragmento de la misma, en una muestra del individuo, que comprende:

(i) añadir a la muestra una cantidad predeterminada de uno o más analitos de inmunoglobulina de control o fragmentos de los mismos, que son distinguibles del analito o fragmento equivalente del individuo;

(ii) caracterizar la inmunoglobulina o fragmento de la misma mediante un procedimiento, según el primer aspecto de la presente invención.

(iii) medir la cantidad relativa del analito o fragmento del individuo y la cantidad del analito o fragmento de control en la muestra; y

(iv) comparar la cantidad relativa del analito o fragmento del individuo con la cantidad relativa del analito o fragmento de control, para cuantificar la cantidad de analito o fragmento en la muestra original del individuo.

Pueden utilizarse dos o más analitos de control diferentes. Estos pueden estar en diferentes concentraciones para permitir una mayor precisión en la cuantificación del analito de interés.

Potencialmente, la técnica de cuantificación utilizada para cuantificar el analito puede ser cualquier técnica adecuada generalmente conocida en la técnica para la cuantificación de inmunoglobulinas y sus fragmentos. Sin embargo, de la manera más típica se detectan inmunoglobulinas o fragmentos. El analito se puede medir utilizando espectrometría de masas. El analito de control es típicamente distinguible del analito del individuo utilizando la espectrometría de masas.

El analito de control se puede añadir a una muestra del individuo que contiene el analito del individuo, antes de una o más etapas, tales como etapas de purificación, para actuar como un control interno mientras se está preparando la muestra del individuo para la detección posterior del analito.

Esto utiliza, por ejemplo, una versión del analito de mayor o menor peso molecular y/o una con una carga diferente a la del analito que está siendo determinado en un individuo. Este puede ser, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de una inmunoglobulina. Sin embargo, potencialmente cualquier analito, incluyendo proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o glucoproteínas, puede ser el analito. Típicamente, el peso molecular está por encima de 500 Da, o por encima de 100 Da, por encima de 1500 Da, por encima de 5 kDa, de la manera más típica por encima de 10 kDa. El analito de control puede ser detectable al tener una carga o peso molecular diferente para alejar el analito de control de un pico de analito observado para el analito equivalente del individuo, de modo que tanto el control como el analito del individuo puedan medirse por separado.

Por ejemplo, si la inmunoglobulina es inmunoglobulina intacta, entonces la inmunoglobulina de control puede ser una versión de inmunoglobulina intacta de mayor o menor peso molecular. Si, por ejemplo, la inmunoglobulina en un individuo que se está cuantificando es cadenas ligeras lambda o kappa, entonces en el control se utilizan cadenas ligeras lambda o kappa de mayor o menor peso molecular. La inmunoglobulina intacta de control o la cadena pesada detectada puede ser la misma clase de inmunoglobulina (tal como IgA, IgD, IgE, IgM o IgG) que la del individuo que se está cuantificando.

Un peso molecular o carga mayor o menor en el control significa que, en muchas determinaciones, la posición observada del analito de control, tal como la inmunoglobulina o el fragmento, se desplaza con respecto al analito o fragmento del individuo. Esto permite, por ejemplo, determinar y medir un pico o una posición separados del control. Dado que la cantidad de analito o fragmento de control se predetermina antes de añadirlo a la muestra, entonces si la cantidad de analito o fragmento del individuo se determina y se compara con la cantidad conocida de analito o fragmento de control, entonces se puede cuantificar el analito o fragmento del individuo. Dado que algunas técnicas, tales como MS, también utilizan carga para ayudar a detectar el analito, la carga también se puede variar.

El control puede ser una inmunoglobulina intacta monoclonal, cadena pesada, cadena ligera kappa o cadena ligera lambda, fragmento Fc o fragmento Fab. Dichas proteínas monoclonales son, por definición, proteínas derivadas de

células clonales que producen una única forma de la proteína. Por lo tanto, la proteína puede utilizarse ya que tiene una masa molecular predefinida y se detectará en un pico predeterminado en un espectrograma de masas. Cuando la proteína que se está detectando del paciente es inmunoglobulinas, o fragmentos de inmunoglobulinas, estas pueden ser de naturaleza policlonal y, por lo tanto, tendrán muchas masas moleculares diferentes individualmente a concentraciones relativamente bajas, debido a la alta variabilidad entre diferentes inmunoglobulinas y los diferentes dominios de unión al antígeno de esas inmunoglobulinas o fragmentos. Por lo tanto, la espectrometría de masas de proteínas policlonales produce una gama de inmunoglobulinas del individuo de diferentes tamaños que son detectadas por la espectrometría de masas. La utilización de una proteína monoclonal, o fragmentos, de tamaño predeterminado produce un pico definido dentro de esa gama de proteínas del individuo que es fácilmente distinguible y puede utilizarse como control. Cuando la proteína que se está detectando es una inmunoglobulina monoclonal, ésta será fácilmente distinguible del control debido a la naturaleza única de la proteína monoclonal individual.

El individuo puede ser un paciente con una enfermedad asociada a células plasmáticas, tal como una gammapatía monoclonal. Esto incluye GMSI, amiloidosis AL, mieloma (tal como mieloma múltiple), plasmacitoma, macroglobulinemia de Waldenström y linfomas (tales como linfoma no Hodgkin de linfocitos B).

Pueden utilizarse dos o más analitos de control diferentes para permitir la detección simultánea de dos o más analitos diferentes a partir de la misma muestra.

MS como se utiliza en el presente documento incluye, por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), ionización por electropulverización de cromatografía líquida de microflujo acoplada a una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (micro LC-ESI-Q-TOF MS). Esto puede incluir, por ejemplo, la utilización del modo de iones positivos.

De manera alternativa, la técnica de espectrometría de masas incluye una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción-ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS). También se puede utilizar un espectrómetro de masas Orbitrap.

El aumento en el tamaño del peso molecular o la carga del control, por ejemplo, significa que el pico en la lectura de espectrometría de masas para el analito, tal como inmunoglobulina o fragmento, se desplaza en comparación con la inmunoglobulina o fragmento equivalente del individuo.

La inmunoglobulina o fragmento de control puede ser una inmunoglobulina intacta (con una o más cadenas ligeras unidas a una o más cadenas pesadas), una cadena pesada, una cadena ligera lambda o una cadena ligera kappa, tal como una cadena ligera libre lambda o una cadena ligera libre kappa. También se pueden detectar fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fc o Fab.

El analito de control, tal como inmunoglobulina, puede tener un peso molecular mayor en comparación con el analito del individuo, tal como inmunoglobulina, en virtud de la sustitución conservativa de uno o más aminoácidos dentro del analito, tal como inmunoglobulina.

Los ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen:

Residuo	Sustituciones conservativas	Residuo	Sustituciones conservativas
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

Un problema asociado con dichas sustituciones conservativas es que afectan potencialmente a la estructura de la inmunoglobulina de control en comparación con la estructura de la inmunoglobulina del individuo. Esto puede ser, por ejemplo, a través del plegamiento de la inmunoglobulina o, de manera alternativa, simplemente debido a la adición de uno o más grupos laterales diferentes a la cadena proteica que forman los epítomos en la superficie de la inmunoglobulina.

Típicamente, el analito, tal como inmunoglobulinas de muestras, se purifica hasta cierto punto antes de realizar la determinación del analito, tal como inmunoglobulina, como se describió anteriormente.

Una muestra de un individuo puede ser potencialmente una muestra de un tejido o un fluido biológico. El fluido biológico puede ser, por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, saliva o líquido cefalorraquídeo. De la manera más típica la muestra es sangre, suero o plasma. La muestra biológica puede ser de un individuo que tenga analitos tales como inmunoglobulinas, que incluye, pero no se limita a, un mamífero tal como un ser humano, perro, gato, primate, roedor, cerdo, oveja, vaca o caballo.

La muestra puede tratarse para eliminar los componentes que podrían interferir, por ejemplo, en la técnica de espectrometría de masas. Por ejemplo, la muestra se puede centrifugar, filtrar o someter a técnicas cromatográficas para eliminar componentes interferentes, tales como de células o fragmentos de células o tejidos. Por ejemplo, las muestras de sangre completa se pueden tratar utilizando técnicas de coagulación convencionales para eliminar glóbulos rojos y blancos y plaquetas. Una muestra también se puede desproteinizar. Por ejemplo, una muestra de plasma puede tener proteínas séricas precipitadas utilizando reactivos convencionales, tales como acetonitrilo, KOH, NaOH, seguido opcionalmente por centrifugación de la muestra. Las inmunoglobulinas, por ejemplo, pueden aislarse a partir de muestras o enriquecerse en una muestra utilizando procedimientos estándar. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, eliminar uno o más contaminantes que no sean inmunoglobulinas de una muestra. De manera alternativa, las muestras se pueden enriquecer o purificar utilizando inmunopurificación, centrifugación, filtración, filtración de agua, diálisis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad a proteínas A/G, purificación por afinidad, precipitación, electroforesis en gel, electroforesis capilar o fraccionamiento químico.

Típicamente, el analito de control se añade a la muestra antes de, como mínimo, una de esas técnicas de purificación. Es decir, se incluye dentro de la muestra de analito del individuo antes de someterse a una purificación o concentración de las inmunoglobulinas dentro de la muestra, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos anteriormente. Eso es típicamente antes de que se utilicen técnicas además de los procedimientos de espectrometría de masas utilizados para la detección del analito, tal como las inmunoglobulinas, tales como mediante LC-MS, Orbitrap MS o MALDI-TOF MS. La ventaja de incorporar esto dentro de la muestra es que el analito de control actúa como un control interno durante el proceso de purificación de la muestra. Se añade una cantidad conocida del analito o fragmento de control a la muestra y este se puede utilizar como control positivo para confirmar que las etapas de purificación han sido exitosas o para identificar dónde se han producido problemas durante la purificación del analito en la muestra del individuo.

Debido a que la inmunoglobulina de control se utiliza típicamente dentro de los procesos de purificación para la inmunoglobulina del individuo, la utilización de sustituciones de aminoácidos conservados dentro de, por ejemplo, la cadena de inmunoglobulina o fragmento, puede afectar a la forma en que se purifica la inmunoglobulina o fragmento de control en comparación con la inmunoglobulina o fragmento del individuo. Es decir, por ejemplo, cuando se utiliza una etapa de purificación por afinidad, tal como inmunopurificación, las diferencias sutiles con la estructura de la inmunoglobulina pueden afectar a la capacidad de copurificarse con la inmunoglobulina del individuo.

Por consiguiente, de la manera más típica la inmunoglobulina de control comprende una pluralidad de aminoácidos adicionales en el extremo N o más típicamente en el extremo C-terminal de la inmunoglobulina en comparación con la inmunoglobulina equivalente del individuo. Es decir, típicamente hay 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos adicionales para aumentar el peso molecular de la inmunoglobulina o fragmento en comparación con la inmunoglobulina o fragmento equivalente del individuo.

En una realización, por analitos equivalentes, tales como inmunoglobulina o fragmento, se entiende que cuando la muestra a detectar es un analito intacto, tal como inmunoglobulina, el peso molecular o la carga aumentados adicionales se proporcionan en un analito intacto, tal como inmunoglobulina purificada a partir de una fuente alternativa al individuo. Esta puede ser, por ejemplo, inmunoglobulina policlonal o monoclonal o inmunoglobulina policlonal. Cuando, por ejemplo, la inmunoglobulina intacta o la inmunoglobulina de cadena pesada a detectar es IgA, IgG, IgM, IgD o IgE, la inmunoglobulina intacta o la cadena pesada del control es del mismo tipo de inmunoglobulina, es decir, IgA, IgG, IgM, IgD o IgE que la inmunoglobulina o cadena pesada del individuo a detectar.

De forma similar, cuando se detectan cadenas ligeras kappa o cadenas ligeras lambda en la muestra, entonces la inmunoglobulina de control utiliza cadenas ligeras kappa o cadenas ligeras lambda de mayor peso molecular.

El analito de control que contiene aminoácidos adicionales o, de hecho, aminoácidos conservados, se puede producir de forma recombinante. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína, tal como una cadena pesada o una cadena ligera de inmunoglobulina, puede tener una pluralidad de codones añadidos a la región codificante N-terminal o C-terminal, para aumentar el número de aminoácidos producidos de forma recombinante dentro de una célula huésped adecuada, tal como una célula huésped procarionte o más típicamente una célula huésped eucariota, o en sistemas libres de células. Los aminoácidos pueden ser, por ejemplo, cualquier aminoácido natural o no natural adecuado, aunque típicamente alanina, por ejemplo, para producir un extremo C o N de polialanina.

La producción de anticuerpos recombinantes o fragmentos de los mismos es generalmente conocida. Véanse, por ejemplo, las revisiones de Frenzel A. et al (Frontiers in Immunology (2013), 4, Artículo 217) y Stech M. y Kubick S.

(Antibodies (2015), 4, 12-33) incorporadas en el presente documento como referencia.

Se puede añadir a la muestra del individuo una pluralidad de diferentes analitos de control, tales como inmunoglobulinas o fragmentos. Por ejemplo, en la muestra del individuo se pueden medir las cadenas ligeras libres kappa y las cadenas ligeras libres lambda. Por consiguiente, la inmunoglobulina o fragmento de control incluiría una cadena ligera lambda libre de control y una cadena ligera kappa libre de control. De forma similar, si se va a medir la inmunoglobulina intacta de cadena pesada o la cadena pesada, entonces el control puede incluir adicionalmente una inmunoglobulina intacta de control o cadena pesada de control adecuada.

De manera alternativa, el control puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento que tenga un peso molecular predeterminado mayor o menor que la parte de la inmunoglobulina que se está determinando. La producción de anticuerpos monoclonales es generalmente conocida. Por ejemplo, se puede seleccionar un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado sobre la base de su peso molecular para que sea el control. Puede, por ejemplo, armonizarse para permitir que se copurifique con anticuerpos a partir de una muestra de un ser humano.

El control se puede utilizar con un anticuerpo reticulado como se definió anteriormente.

Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención da a conocer un procedimiento de preparación de una muestra para analizar por espectrometría de masas, que comprende:

- (i) proporcionar una muestra de un individuo, comprendiendo la muestra inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas;
- (ii) añadir a la muestra una cantidad predeterminada de una inmunoglobulina o fragmento de control que tiene un peso molecular predeterminado;
- (iii) copurificar la inmunoglobulina o fragmento de control con la inmunoglobulina o fragmento mediante inmunopurificación utilizando una mezcla de anticuerpo o fragmento policlonal anti-inmunoglobulina, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento; y opcionalmente
- (iv) colocar la muestra copurificada sobre un objetivo de espectrometría de masas.

A continuación, el objetivo de espectrometría de masas puede colocarse en un espectrómetro de masas y analizarse utilizando el espectrómetro de masas. El objetivo es típicamente el sustrato sobre el que se coloca la muestra y, posteriormente, se coloca en el espectrómetro de masas para someter la muestra a análisis por espectrometría de masas.

También se dan a conocer espectrómetros de masas que comprenden dentro de ellos uno o más analitos o fragmentos de los mismos de control.

La muestra, los espectrómetros de masas, las inmunoglobulinas y los controles pueden ser como se definen en el presente documento.

En el procedimiento del primer aspecto de la presente invención se da a conocer la utilización de un kit de determinación que comprende una mezcla de fragmentos o anticuerpos policlonales específicos anti-inmunoglobulina, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento, y que comprende adicionalmente una inmunoglobulina o un fragmento de la misma patrón de espectrometría de masas. El kit puede comprender adicionalmente un objetivo de espectrometría de masas y/o se pueden proporcionar tampones o sales.

También se dan a conocer procedimientos de diagnóstico de enfermedades relacionadas con linfocitos B u otras enfermedades relacionadas con la inmunidad que comprenden purificar y caracterizar una inmunoglobulina utilizando un anticuerpo de la presente invención, un procedimiento de la presente invención y/o la utilización de un kit de determinación, según la presente invención, en los que la enfermedad relacionada con los linfocitos B u otra enfermedad relacionada con la inmunidad se selecciona de mieloma múltiple (MM) de inmunoglobulina intacta, MM de cadena ligera, MM no secretor, amiloidosis AL, enfermedad por depósito de cadenas ligeras, MM latente, plasmocitomas y GMSI (gammopatías monoclonales de significado incierto), otras discrasias de linfocitos B, cáncer, diabetes, cardiopatía, nefropatía, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico.

Esto también se puede utilizar en el diagnóstico de otras discrasias de linfocitos B o el diagnóstico o pronóstico de una serie de otros trastornos, tales como PTLD (*post-transplant lymphoproliferative disorder*, trastorno linfoproliferativo postrasplante) como se describe en la Patente WO2013/088126, o cáncer, diabetes, cardiopatía o nefropatía (Patentes WO2011/095818, WO2013/050731, EP1870710, WO2011/107965).

Varias otras enfermedades también se caracterizan de manera útil mediante la identificación y caracterización de

anticuerpos de muestras de un paciente. Estas incluyen: artritis reumatoide, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico.

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo solamente, con referencia a las siguientes figuras:

La **figura 1** muestra geles teñidos con azul de Coomassie que ilustran la formación de enlaces tioéter en fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ anti-kappa libre y $F(ab')_2$ anti-lambda libre. La formación de cadenas ligeras y pesadas reticuladas de la molécula de $F(ab')_2$ se indica en la imagen del gel SDS-PAGE (flecha a aproximadamente 50 kDa). El grado de reticulación es mayor a los 7 días.

La **figura 2** muestra geles teñidos con azul de Coomassie de fragmentos $F(ab')_2$ anti-kappa libre tratados (para inducir la formación de enlaces tioéter) y no tratados. (NR) muestras no reducidas (R) muestras reducidas. También se muestra la interpretación de las estructuras en cada banda.

La **figura 3** muestra de forma similar fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ anti-lambda libre.

La **figura 4** muestra la actividad de unión de anticuerpos $F(ab')_2$ anti-kappa libre y anti-lambda libre reticulados y no reticulados con tioéter a cadenas ligeras libres (FLC) y suero humano normal (NHS, *normal human serum*).

La **figura 5** muestra la reticulación de anticuerpos $F(ab')_2$ totales anti-lambda por bismaleimidoetano (BMOE), medida reduciendo SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie.

La **figura 6** muestra la unión de anticuerpos $F(ab')_2$ totales anti-lambda a IgG lambda antes y después de la reticulación con bismaleimidoetano (BMOE).

La **figura 7** muestra $F(ab')_2$ anti-lambda libre (10 μ M) reticulado con bismaleimidoetano (BMOE) 2 mM y molécula completa anti-kappa libre (10 μ M) reticulada con BMOE 4 mM, medidos reduciendo SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie. La densitometría de barrido de los carriles de SDS-PAGE reducida indicó una eficiencia de reticulación de >70 % para anti-lambda libre y >90 % para anti-kappa libre.

La **figura 8** muestra la unión de moléculas completas anti-kappa libre no tratadas y reticuladas con bismaleimidoetano (BMOE) a cadenas ligeras kappa libres. También se muestra reactividad cruzada con IgG, IgA e IgM.

La **figura 9** muestra la unión de $F(ab')_2$ anti-lambda libre no tratado y reticulado con bismaleimidoetano (BMOE) a cadenas ligeras lambda libres. También se muestra reactividad cruzada con IgG, IgA e IgM.

La **figura 10** muestra los espectros de masas de MALDI de sefarosa conjugada anti-IgG3 (línea negra) y sefarosa conjugada anti-IgG3 reticulada con tioéter (línea gris) eluidas con ácido acético al 5 % que contiene tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 50 mM en ausencia de adición previa de la muestra. Se muestran los intervalos de masa/carga para la cadena ligera lambda (L), la cadena ligera kappa (K), la cadena pesada de IgG (G) y la cadena pesada de IgA (A).

La **figura 11** muestra los espectros de masas de MALDI de eluyentes de sefarosa conjugada anti-IgG3 (línea negra) y sefarosa conjugada anti-IgG3 reticulada con tioéter (línea gris) después de la incubación con suero humano que contiene IgG3 elevada y elución con ácido acético al 5 % que contiene TCEP 50 mM. Se muestran los intervalos de masa/carga para la cadena ligera lambda (L), la cadena ligera kappa (K), la cadena pesada de IgG (G) y la cadena pesada de IgA (A).

La **figura 12** muestra los espectros de masas de MALDI de sefarosa conjugada anti-kappa libre (línea negra) y sefarosa conjugada con anti-kappa libre reticulada con BMOE (línea gris) eluidas con ácido acético al 5 % que contiene TCEP 50 mM en ausencia de adición previa de la muestra.

La **figura 13** muestra los espectros de masas de MALDI de sefarosa conjugada con anti-lambda libre (línea negra) y sefarosa conjugada con anti-lambda libre reticulada con BMOE (línea gris) eluidas con ácido acético al 5 % que contiene TCEP 50 mM en ausencia de adición previa de la muestra.

La **figura 14** muestra un espectro de masas de MALDI de cadena ligera kappa libre recombinante (rKappa) y kappa de IgG endógena copurificadas a partir de suero humano por sefarosa conjugada con anti-kappa de camélido (A). El coeficiente de variación para las áreas de pico calculadas de la cadena ligera kappa (GK), rKappa y la relación GK/rKappa se muestran en (B).

Introducción de enlaces tioéter en fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo mediante tratamiento alcalino.

La conversión de enlaces disulfuro de anticuerpos en enlaces tioéter puede inducirse en entornos alcalinos a temperatura elevada. La formación de dichos enlaces es generalmente conocida en la técnica, tal como en Zhang et

al. IgG1 Thioether Bond formation in vivo. JBC, 288: 16371-16382, 2013. Zhang y Flynn. Cysteine racemization IgG heavy and light chains, JBC, 288: 34325-34335, 2013.

Se investigaron los anticuerpos F(ab')₂ Freelite™ disponibles en el mercado para ver si se podían introducir enlaces tioéter inducidos por condiciones alcalinas en los fragmentos. Estos anticuerpos se unen a cadenas ligeras lambda libres o kappa libres. Los datos mostrados en las figuras 1-4 muestran que es posible introducir reticulaciones de tioéter en fragmentos F(ab')₂ mediante tratamiento con Glicina-NaOH 50 mM, pH 9 a 50 °C. Se observa una eficiencia de reticulación de aproximadamente el 20 % en comparación con F(ab')₂ no tratado después de 7 días (figuras 1-3).

La actividad de unión de los anticuerpos anti-kappa libre y anti-lambda libre se evaluó mediante ELISA después de 0 y 7 días de tratamiento alcalino (figura 4). Los anticuerpos se aplicaron como recubrimiento sobre placas ELISA y se les presentaron cadenas ligeras kappa purificadas, cadenas ligeras lambda purificadas o suero humano normal. La actividad de unión se detectó midiendo la absorbancia a 450 nm utilizando sustrato cromógeno de tetrametilbencidina (TMB) y anticuerpos anti-cadena ligera conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, *horse radish peroxidase*). Aunque hay alguna reducción en la actividad de ELISA, como se muestra en la figura 4, la actividad aún permanece en los anticuerpos tratados.

Reticulación con bismaleimidoetano (BMOE) de fragmentos F(ab')₂ totales anti-lambda

Se investigaron los anticuerpos F(ab')₂ anti-lambda para ver si las cadenas de anticuerpos podían reticularse mediante BMOE. Los fragmentos F(ab')₂ anti-lambda se redujeron con (TCEP) 1 mM. El TCEP se eliminó utilizando columnas de desalinización Hi-Trap y el F(ab')₂ total anti-lambda reducido se reticuló con un exceso molar de 100-500x veces de BMOE y, a continuación, se analizó mediante SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie ejecutada en condiciones reductoras. La figura 5 muestra que BMOE puede reticular fragmentos F(ab')₂ con una eficiencia superior al 50 %. Además, las reticulaciones de la cadena de anticuerpo resultantes son resistentes a las condiciones reductoras.

Se recubrió una placa de ELISA con lambda de IgG policlonal y se unió a la placa F(ab')₂ anti-lambda total tratado con BMOE o no tratado. La actividad de unión por anti-lambda total se midió mediante absorbancia de luz a 450 nm utilizando anti-HRP de oveja y sustrato TMB. En condiciones que producen >50 % de reticulación con BMOE (figura 5), el anticuerpo anti-lambda total conserva más del 70 % de la actividad de unión de lambda de IgG (figura 6).

Antisueros anti-lambda libre y anti-kappa libre reticulados con BMOE

Se investigaron los anticuerpos Freelite™ disponibles en el mercado para ver si las cadenas de anticuerpo podían reticularse mediante el tratamiento con BMOE. La molécula completa anti-kappa libre y F(ab')₂ anti-lambda libre se redujeron con TCEP 1,5 mM y 1,0 mM, respectivamente. El TCEP se eliminó utilizando columnas de desalinización Hi-Trap y los anticuerpos anti-kappa libre y anti-lambda libre se reticularon con un exceso molar de 400 y 200 veces de BMOE, respectivamente. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE teñida con azul de Coomassie en condiciones reductoras. Como se muestra en la figura 7, la eficiencia de reticulación con BMOE es superior al 50 % para anticuerpos en formatos F(ab')₂ o de molécula completa.

Se realizaron análisis ELISA de actividad mediante los cuales se recubrieron placas de ELISA con anticuerpos tratados con BMOE y sin tratar y se les presentaron inmunoglobulinas purificadas (IgG, IgA, IgM, kappa libre, lambda libre). La actividad de unión se detectó midiendo la absorbancia a 450 nm utilizando anti-cadena ligera-HRP y sustrato TMB. Los resultados de las figuras 8-9 muestran que los antisueros reticulados aún mantienen una actividad específica de unión al antígeno.

La reticulación con tioéter estabiliza los anticuerpos anti-IgG3 conjugados con sefarosa.

Los anticuerpos anti-IgG3 no tratados y reticulados con tioéter (mediante tratamiento alcalino) se conjugaron covalentemente con resina de sefarosa y, en ausencia de adición previa de la muestra, se trataron con ácido acético al 5 % que contenía TCEP 50 mM. El análisis del sobrenadante eluido mediante MALDI-TOF MS (figura 10) mostró que el anticuerpo reticulado con tioéter liberó menos material que el anticuerpo no tratado, demostrando así una mayor estabilidad del anticuerpo. La actividad de unión de anti-IgG3 se muestra en la figura 11, donde cada resina de sefarosa se incubó con suero humano que contenía un nivel elevado de IgG3 y se eluyó con ácido acético al 5 % que contenía TCEP 50 mM. En relación con el anticuerpo no tratado, el análisis mediante MALDI-TOF MS indicó una actividad de unión similar o mayor por parte del anticuerpo anti-IgG3 reticulado con tioéter, medida por el área del pico correspondiente a la cadena lambda de IgG humana.

El reticulación con BMOE estabiliza los anticuerpos anti-kappa libre y anti-lambda libre

Los anticuerpos anti-kappa y anti-lambda Freelite™ no se trataron o se reticularon con BMOE después de la reducción con TCEP y la desalinización en columnas de desalinización Hi-Trap. Los anticuerpos se conjugaron con resina de sefarosa, se trataron con ácido acético al 5 % que contenía TCEP 50 mM en ausencia de adición previa de

la muestra y los sobrenadantes se analizaron mediante MALDI-TOF MS. Como se muestra en las figuras 12-13, se liberaron significativamente menos fragmentos de anticuerpo a partir de los anticuerpos reticulados con BMOE, lo que indica un aumento sustancial en la estabilidad del anticuerpo.

- 5 La mayor estabilidad de los anticuerpos reduce la contaminación cruzada de material desde de los anticuerpos purificadores. Esto mejora la precisión de las etapas de caracterización adicionales cuando se utiliza para purificar y aislar muestras de inmunoglobulinas de, por ejemplo, pacientes.

El analito de control se puede distinguir del analito del individuo mediante espectrometría de masas

- 10 Se complementó suero humano con una cadena ligera kappa recombinante de cantidad y masa conocidas (cadena kappa de control). Las cadenas kappa endógenas y de control se copurificaron a partir del suero utilizando sefarosa disponible en el mercado conjugada con anticuerpo anti-kappa de camélido y los sobrenadantes eluidos se analizaron mediante MALDI-TOF MS (figura 14). Como se muestra en la figura 14A, la cadena kappa de control es
15 distinguible de la cadena kappa endógena debido a la diferencia en su masa molecular relativa.

El analito de control se puede utilizar para proporcionar información cuantitativa sobre el analito del individuo

- 20 Las cadenas kappa endógenas y las cadenas kappa de control se copurificaron a partir de suero humano, se colocaron sobre dos placas de 96 objetivos y se analizaron mediante MALDI-TOF MS (figura 14B). Se determinaron las áreas de los picos correspondientes a cada cadena kappa y se utilizaron para calcular el coeficiente de variación (% de CV) en cada placa y para 192 repeticiones que abarcaban ambas placas. La figura 14B muestra que cuando el área del pico correspondiente a kappa endógena se expresa en relación con el área del pico de kappa de control en 192 repeticiones, el % de CV calculado es inferior al 10 %. Esto indica un potencial de diagnóstico sustancial de
25 la presente invención. La figura ilustra que se puede utilizar un analito de control interno para determinar la abundancia de un analito del individuo en relación con el analito de control y, por tanto, puede proporcionar información tanto cuantitativa como cualitativa sobre el analito del individuo. Esta observación también demuestra que se puede utilizar un analito de control para verificar el éxito de un procedimiento de purificación y sirve para
30 minimizar los errores en la recopilación de datos causados, por ejemplo, por la ionización diferencial de los puntos objetivo de MALDI.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de caracterización de una inmunoglobulina, que comprende poner en contacto una muestra que contiene la inmunoglobulina con una mezcla de anticuerpos específicos anti-inmunoglobulina policlonales o fragmentos específicos anti-inmunoglobulina de los mismos, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento;
 - 5 permitir que la inmunoglobulina se una al anticuerpo o fragmento;
 - 10 lavar el material no unido de la inmunoglobulina unida al anticuerpo o fragmento;
 - eliminar la inmunoglobulina unida del anticuerpo o fragmento para producir una inmunoglobulina o fragmento purificado; y
 - caracterizar la inmunoglobulina o fragmento purificado mediante espectroscopia de masas.
- 15 2. Utilización de un kit de purificación y determinación de inmunoglobulina que comprende una mezcla de anticuerpos (o fragmentos) específicos anti-inmunoglobulina policlonales y uno o más patrones de espectrometría de masas, comprendiendo los anticuerpos o fragmentos una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento, en el procedimiento según la reivindicación 1.
 - 20 3. Procedimiento de cuantificación de una cantidad de una inmunoglobulina o fragmento de la misma, en una muestra del individuo, que comprende:
 - (i) añadir a la muestra una cantidad predeterminada de uno o más analitos de inmunoglobulina de control o fragmentos de los mismos, que son distinguibles del analito o fragmento equivalente del individuo;
 - 25 (ii) caracterizar la inmunoglobulina o fragmento de la misma mediante un procedimiento según la reivindicación 1.
 - (iii) medir la cantidad relativa del analito o fragmento del individuo y la cantidad del analito o fragmento de control en la muestra; y
 - 30 (iv) comparar la cantidad relativa del analito o fragmento del individuo con la cantidad relativa del analito o fragmento de control, para cuantificar la cantidad de analito o fragmento en la muestra original del individuo.
 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que la inmunoglobulina o fragmento del individuo es una inmunoglobulina intacta, una cadena pesada, una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda, un fragmento Fc o un fragmento Fab.
 - 35 5. Procedimiento, según las reivindicaciones 3 o 4, en el que la inmunoglobulina de control comprende una pluralidad de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de una o más de una cadena pesada, una cadena ligera kappa o una cadena ligera lambda en comparación con la inmunoglobulina del individuo o fragmento de la misma, o la proteína de control es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.
 - 40 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que las cadenas ligeras kappa y/o lambda son cadenas ligeras kappa libre o lambda libre.
 - 45 7. Procedimiento, según las reivindicaciones 5 o 6, en el que la pluralidad de aminoácidos están en el extremo C-terminal en comparación con la inmunoglobulina del individuo o fragmento de la misma.
 8. Procedimiento, según las reivindicaciones 5 a 7, en el que la inmunoglobulina de control comprende dos o más de inmunoglobulina intacta, cadena ligera kappa libre o cadenas ligeras lambda libres.
 - 50 9. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 3-8, o utilización de un kit, según la reivindicación 2, en el que la muestra procede de un individuo que tiene una enfermedad asociada a linfocitos B.
 - 55 10. Procedimiento de preparación de una muestra para análisis por espectrometría de masas que comprende:
 - (i) utilizar una muestra de un individuo, comprendiendo la muestra inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas;
 - (ii) añadir a la muestra una cantidad predeterminada de una inmunoglobulina o fragmento de control que tiene un peso molecular predeterminado;
 - 60 (iii) copurificar la inmunoglobulina o el fragmento de control con la inmunoglobulina o el fragmento mediante inmunopurificación utilizando una mezcla de anticuerpo o fragmento anti-inmunoglobulina policlonal, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento; y opcionalmente
 - 65 (iv) colocar la muestra copurificada sobre un objetivo de espectrometría de masas.

11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la inmunoglobulina o el fragmento de control tiene un peso molecular mayor o menor que la inmunoglobulina o el fragmento de interés a medir mediante la espectrometría de masas.
- 5 12. Procedimiento, según las reivindicaciones 10 u 11, que comprende adicionalmente la etapa de someter el objetivo que comprende la muestra copurificada a espectrometría de masas para analizar la muestra.
- 10 13. Utilización de un kit de determinación que comprende una mezcla de anticuerpos o fragmentos específicos anti-inmunoglobulina policlonales, comprendiendo cada anticuerpo o fragmento una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o un fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o un fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento, y comprendiendo adicionalmente un patrón de espectrometría de masas de inmunoglobulina o fragmento de la misma, en el procedimiento, según la reivindicación 1.
- 15 14. Utilización de un kit de determinación, según la reivindicación 13, que comprende un objetivo de espectrometría de masas.
- 20 15. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 3 a 12, o utilización de un kit, según las reivindicaciones 2 o 13 o 14, en el que los anticuerpos o fragmentos de los mismos son específicos de clase anti-cadena ligera libre, específicos de clase anti-cadena pesada, específicos de subclase anti-cadena pesada, específicos de tipo de cadena ligera-de clase anti-cadena pesada, o específicos de tipo anti-cadena ligera.
- 25 16. Utilización de una mezcla de anticuerpos específicos anti-inmunoglobulina policlonales (o fragmentos de los mismos), **caracterizada por que** cada anticuerpo o fragmento del mismo comprende una o más reticulaciones no disulfuro entre, como mínimo, una cadena pesada o fragmento de la misma y, como mínimo, una cadena ligera o fragmento de la misma del anticuerpo o fragmento del mismo, en el procedimiento, según la reivindicación 1.
- 30 17. Utilización de una mezcla, según la reivindicación 16, en la que los anticuerpos (o fragmentos) son específicos anti-cadena ligera libre, específicos de clase anti-cadena pesada, específicos de subclase anti-cadena pesada, específicos de tipo de cadena ligera-de clase anti-cadena pesada o específicos del tipo anti-cadena ligera.
- 35 18. Utilización de una mezcla, según las reivindicaciones 16 o 17, en la que la reticulación comprende un enlace bismaleimida o tioéter.
19. Utilización de una mezcla, según las reivindicaciones 16 a 18, en la que los anticuerpos o fragmentos se unen a un soporte.
20. Utilización de una mezcla de anticuerpos o fragmentos, según las reivindicaciones 16 a 19, en la que los anticuerpos son fragmentos de un anticuerpo y son fragmentos F(ab')₂.
- 40 21. Utilización de la mezcla de anticuerpos o fragmentos, según las reivindicaciones 16 a 20, para su utilización en la purificación de una o más inmunoglobulinas.
- 45 22. Procedimiento de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad relacionada con los linfocitos B u otra enfermedad relacionada con la inmunidad, que comprende purificar o caracterizar una inmunoglobulina utilizando una mezcla de anticuerpos específicos anti-inmunoglobulina policlonales o fragmentos de los mismos, según las reivindicaciones 16-21, o utilización de un kit de determinación, según las reivindicaciones 2 o 13-14, en el que la enfermedad relacionada con los linfocitos B u otra enfermedad relacionada con la inmunidad se selecciona de mieloma múltiple (MM) de inmunoglobulina intacta, MM de cadena ligera, MM no secretor, amiloidosis AL, enfermedad por depósito de cadenas ligeras, MM latente, plasmocitomas y GMSI (gammapatías monoclonales de significado incierto), otras discrasias de linfocitos B, cáncer, diabetes, cardiopatía, nefropatía, artritis reumatoide, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, síndrome de Sjogren y lupus eritematoso sistémico.
- 50

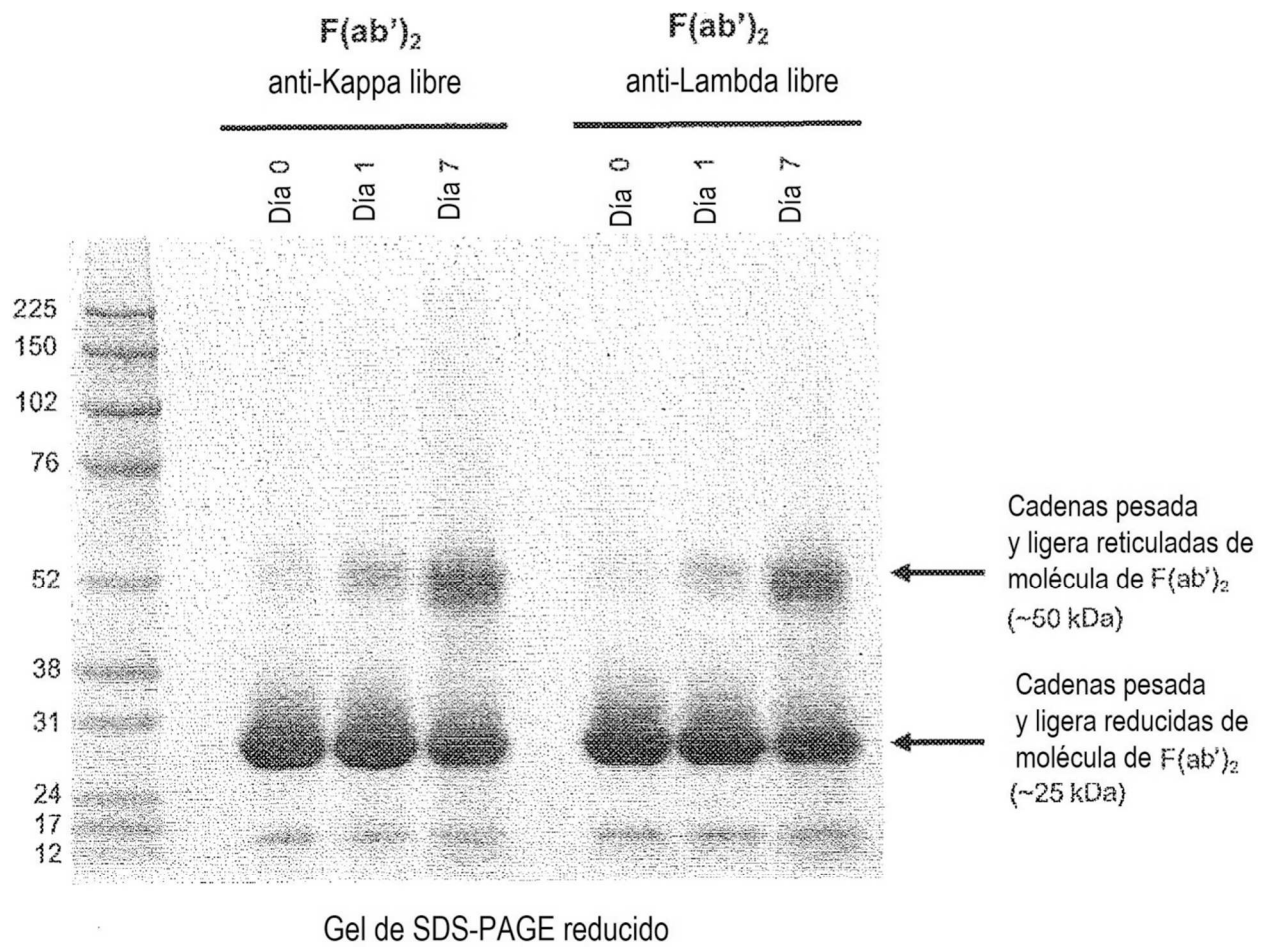


Figura 1

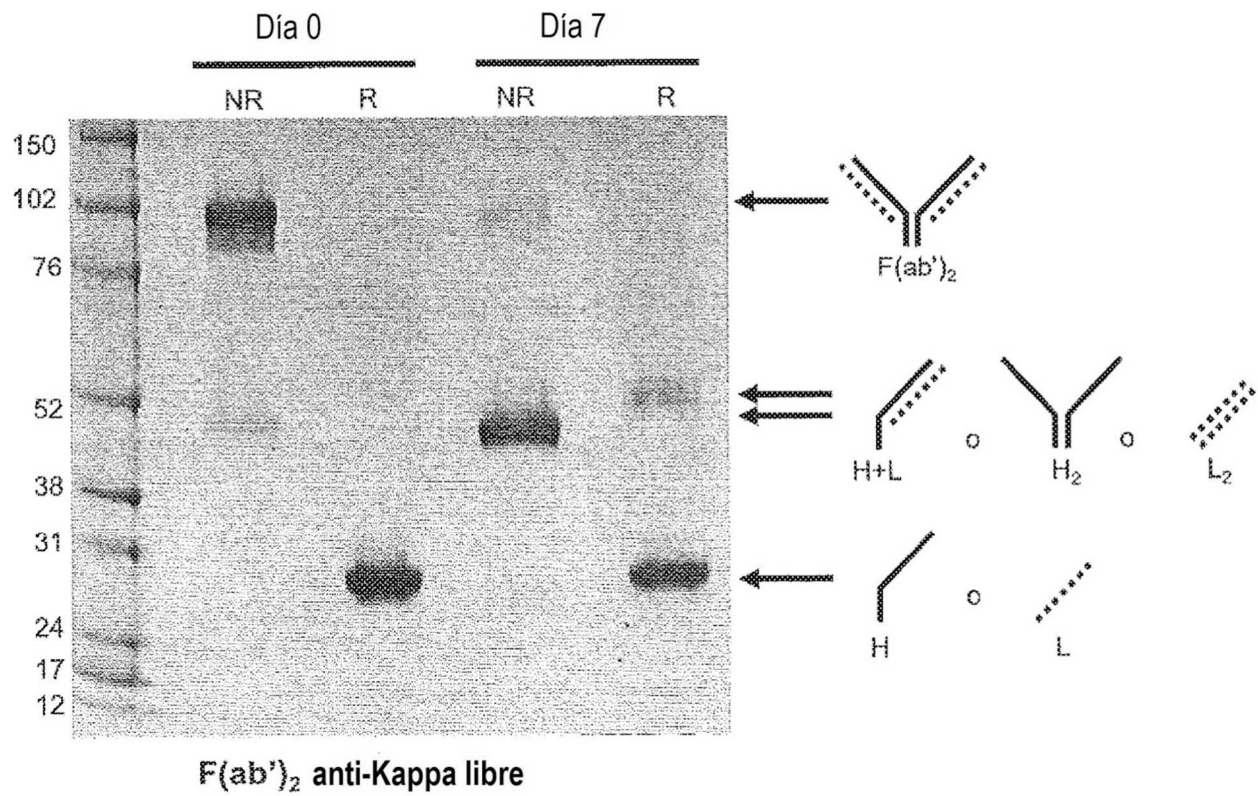


Figura 2

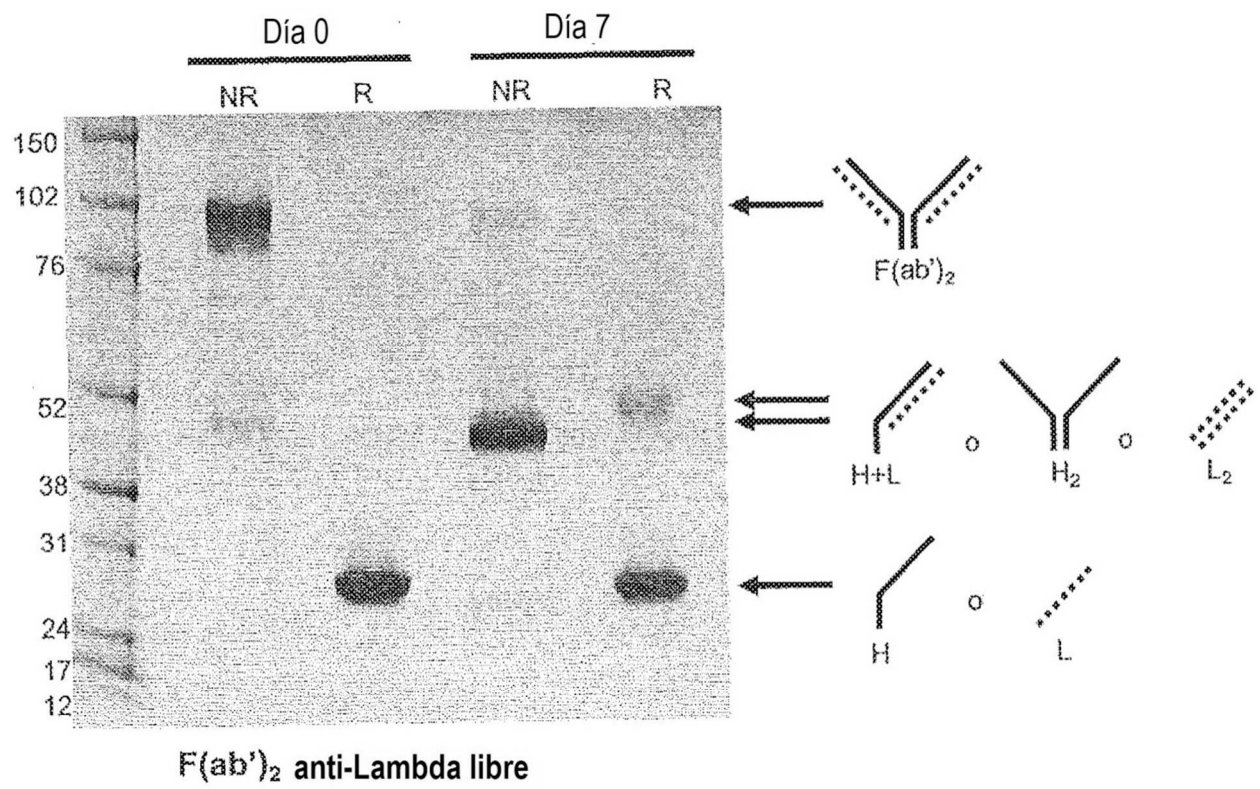


Figura 3

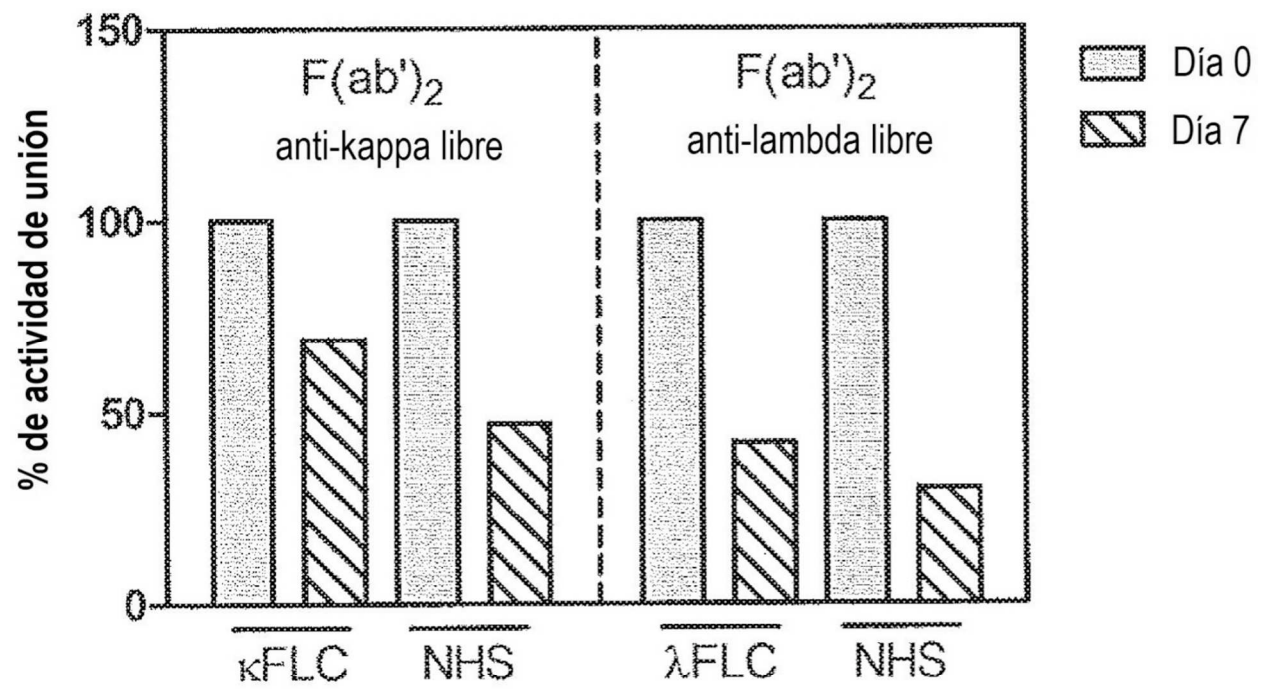
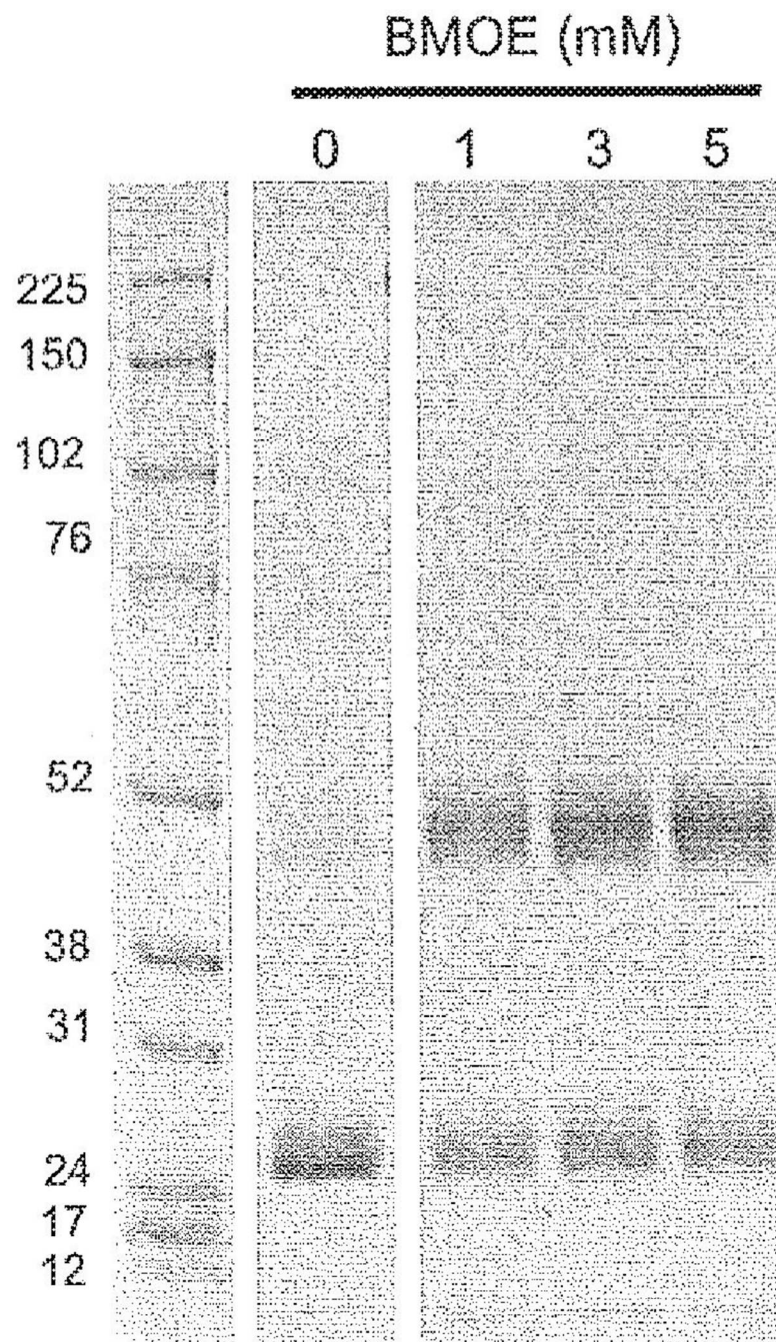


Figura 4



Gel de SDS-PAGE reducido

Figura 5

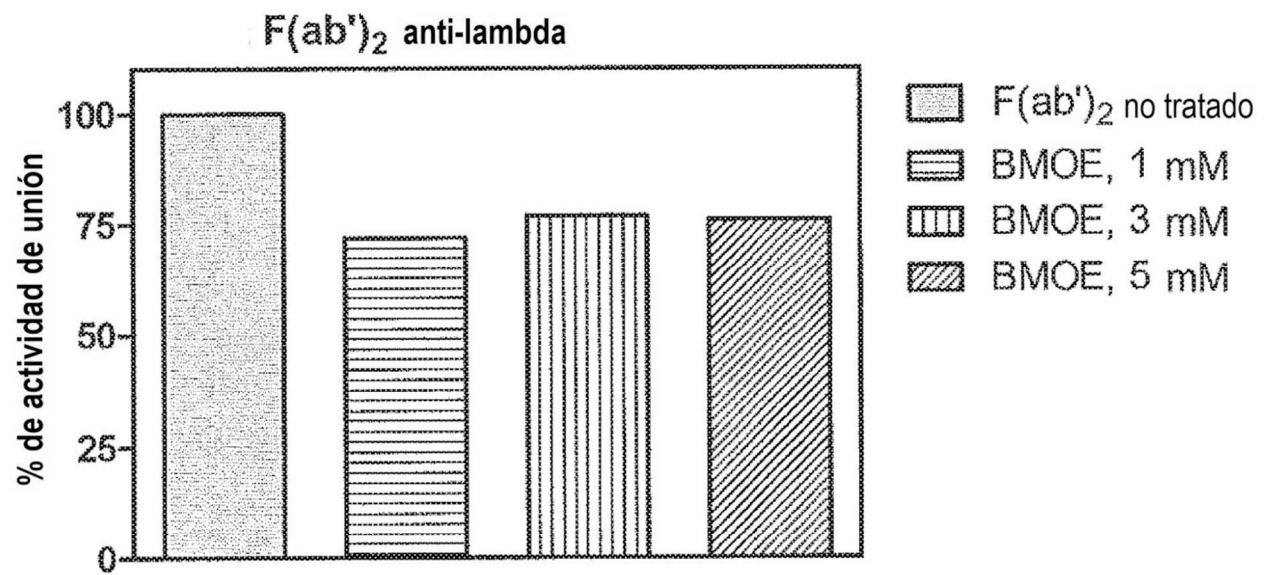


Figura 6

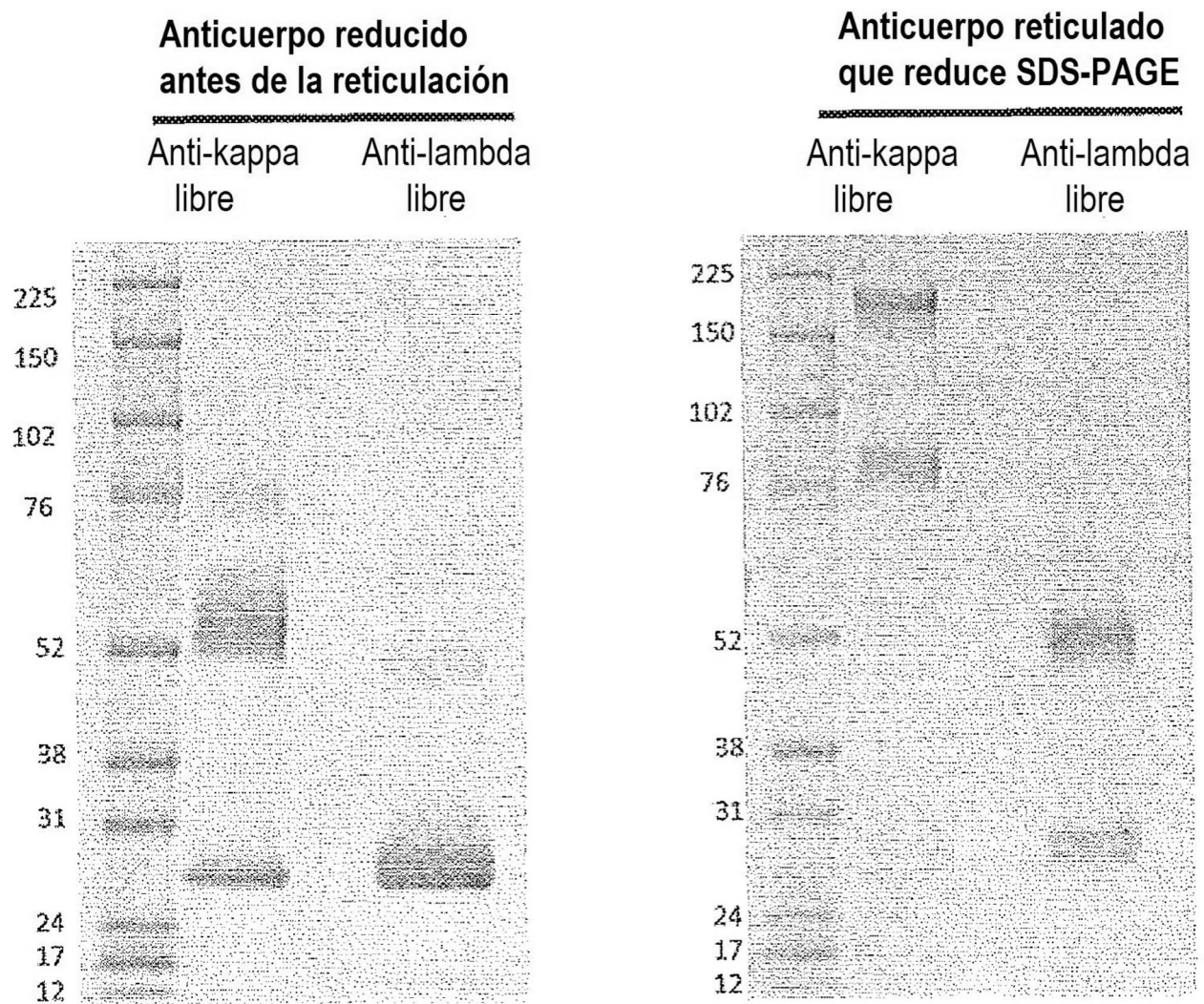
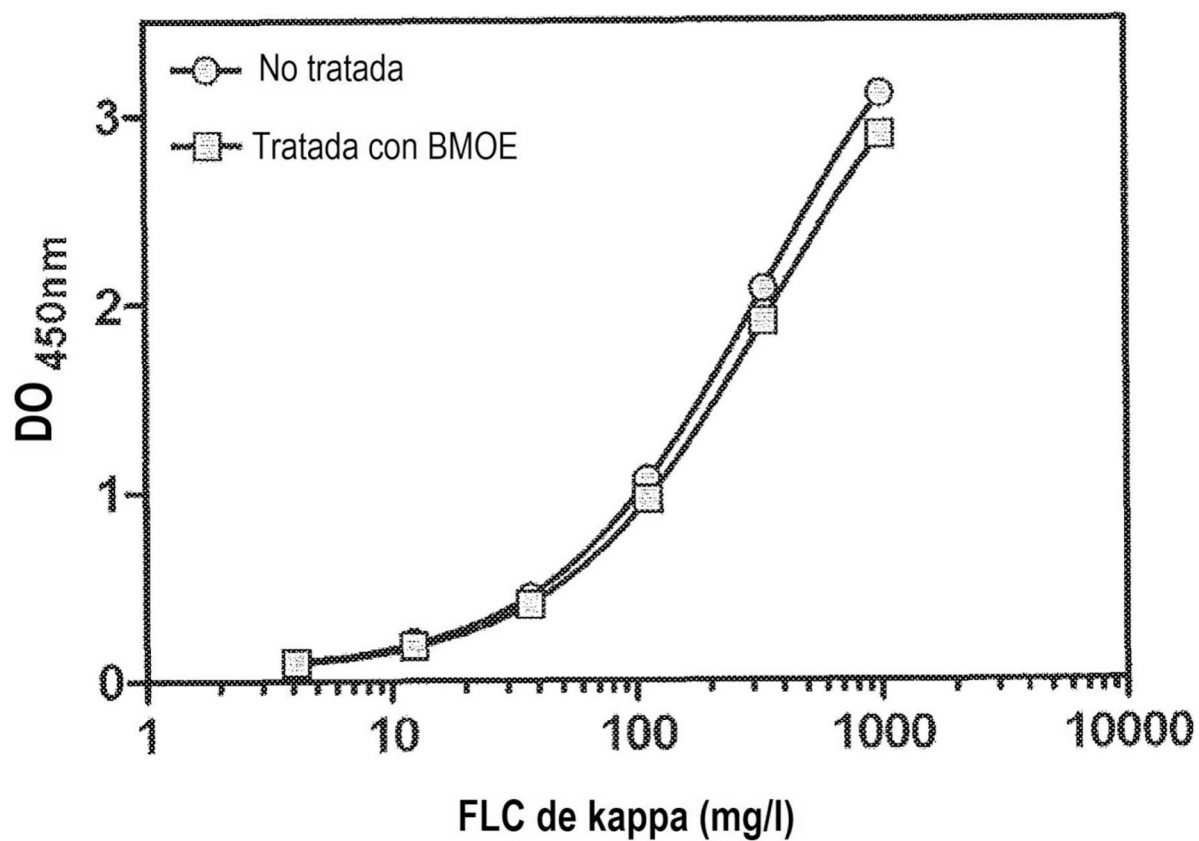
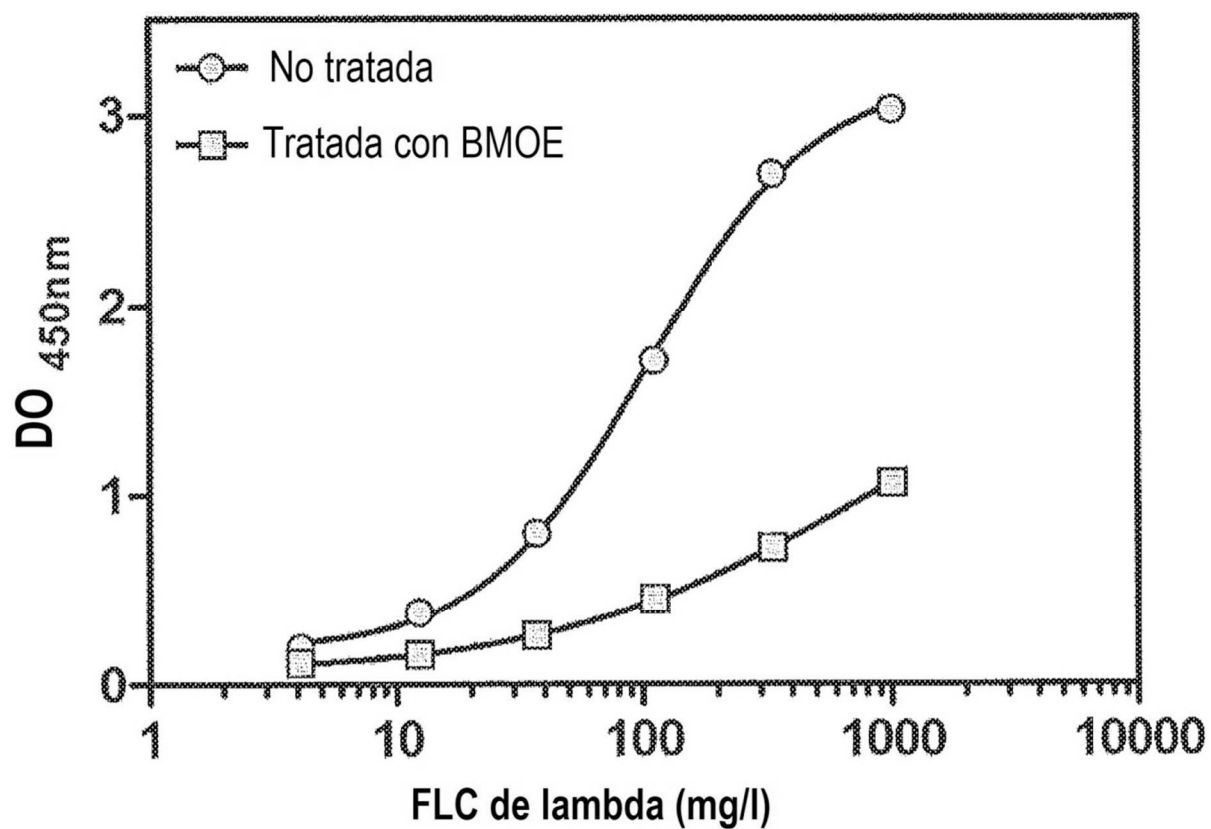


Figura 7



	No tratada	Reticulada con BMOE
DO superior	3,11	2,89
DO inferior	0,10	0,09
% de reactividad cruzada con IgG	0,057	0,058
% de reactividad cruzada con IgA	0,083	0,086
% de reactividad cruzada con IgM	0,31	0,32

Figura 8



	No tratada	Reticulada con BMOE
DO superior	3,02	1,06
DO inferior	0,20	0,11
% de reactividad cruzada con IgG	0,16	0,11
% de reactividad cruzada con IgA	0,21	0,14
% de reactividad cruzada con IgM	0,69	0,32

Figura 9

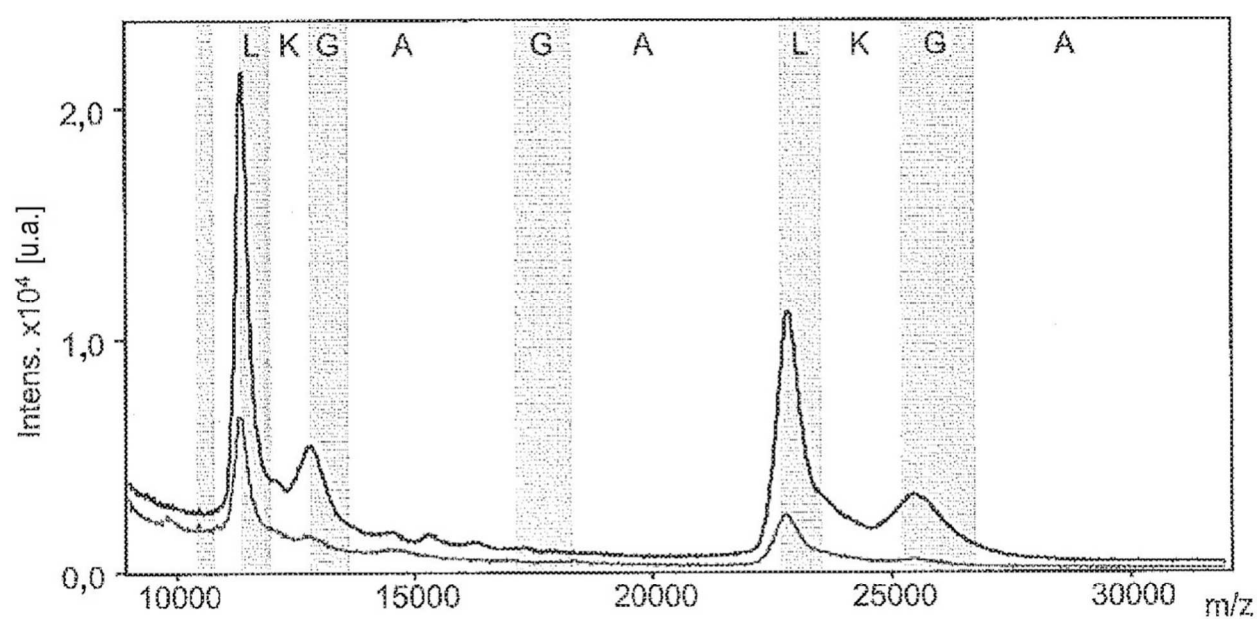


Figura 10

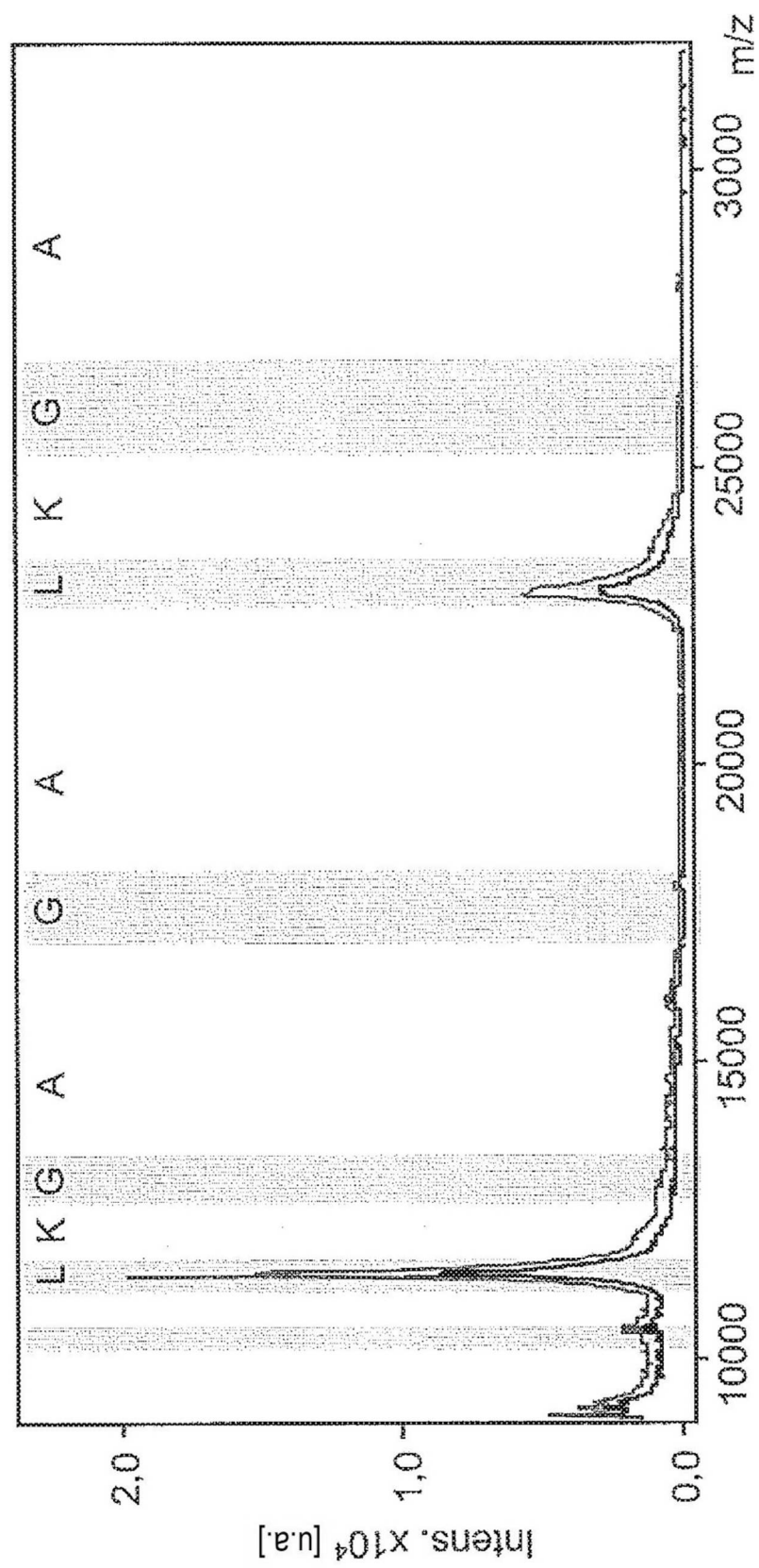


Figura 11

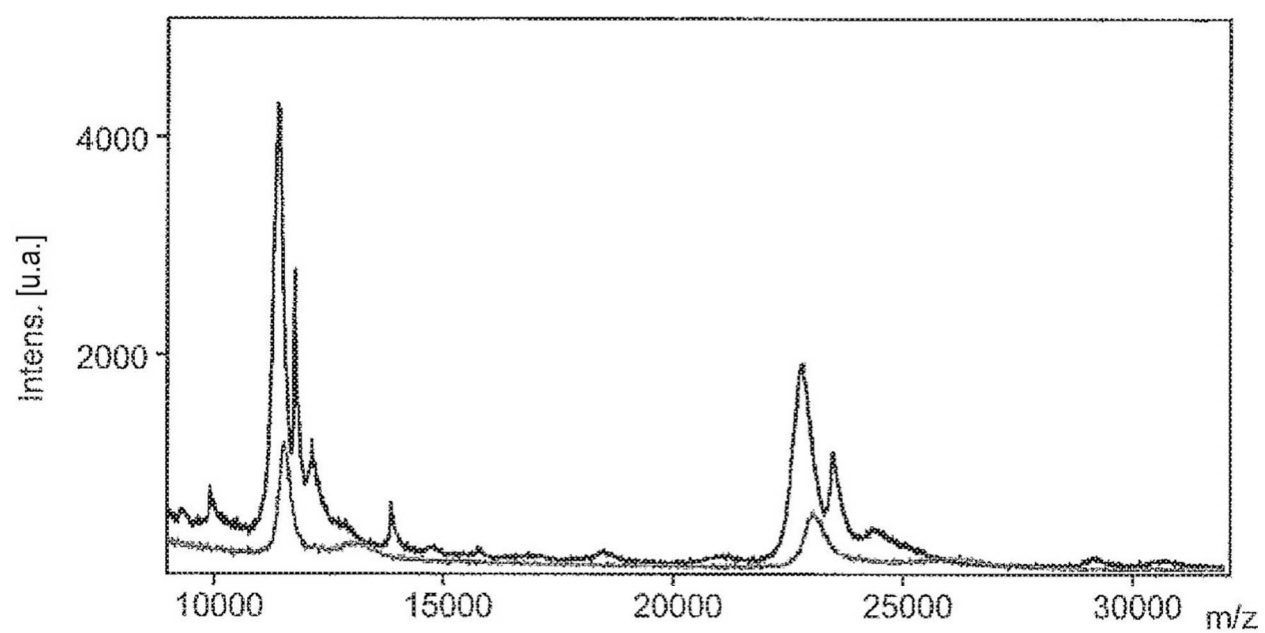


Figura 12

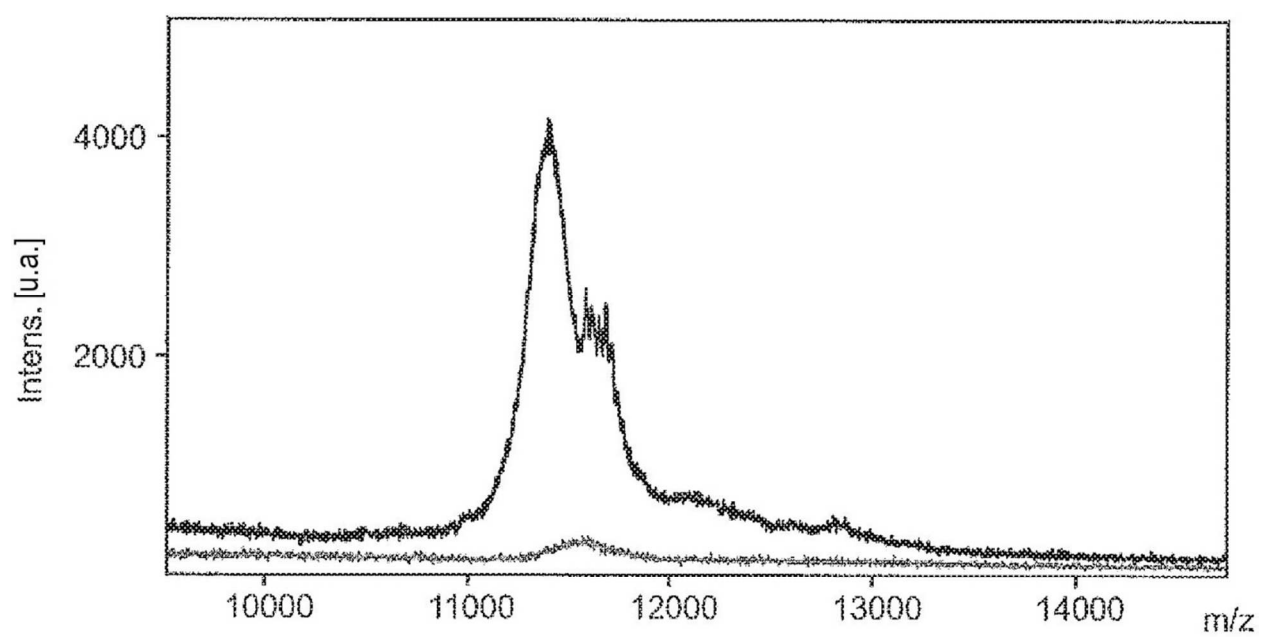
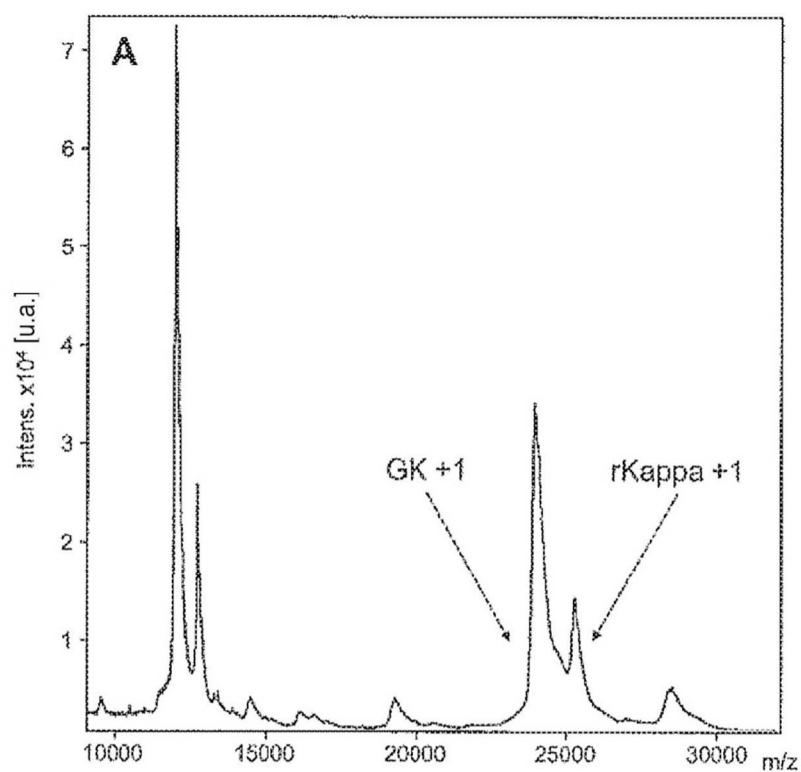


Figura 13



B

	Coeficiente de variación (%; $n=96$ por placa)		
	Área del pico de GK +1	Área del pico de rKappa +1	Relación de área del pico (GK/rKappa)
Placa n.º 1	35	33	4,3
Placa n.º 2	41	39	7,2
Placa n.º 1 + Placa n.º 2	38	36	6,4

Figura 14

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 9717372 A
- WO 2015154052 A
- WO 2015131169 A
- WO 2006099481 A
- WO 0044788 A
- WO 9103493 A
- WO 2013088126 A
- WO 2011095818 A
- WO 2013050731 A
- EP 1870710 A
- WO 2011107965 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **ZHANG Q et al.** *JBC manuscript*, 2013, vol. M113, 468367
- **GOLDBERG et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1991, vol. 2, 275
- **ZHANG et al.** *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288 (23), 16371-8
- **ZHANG ; FLYNN.** *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288 (43), 34325-35
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 1608-26-0
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 2283-11-6
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 121-45-9
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 998-40-3
- **BERNARDES et al.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, vol. 47, 2244-2247
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 5132-30-9
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 28537-70-4
- **AUCLAIR et al.** Strategies for stabilizing superoxide dismutase (SOD1), the protein destabilized in the most common form of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, vol. 107 (50), 21394-9
- **GEULA.** Structure-based analysis of VDAC1 protein: defining oligomer contact sites. *J Biol Chem*, 2012, vol. 287 (3), 475-85
- **KIDA et al.** Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispanning protein topogenesis. *J Cell Biol*, 2007, vol. 171 (7), 1441-1452
- *CHEMICAL ABSTRACTS*, 626-15-3
- **JO et al.** Development of α -Helical Calpain Probes by Mimicking a Natural Protein-Protein Interaction. *J Am Chem Soc.*, 2012, vol. 134 (42), 17704-13
- **WONG, S.** *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, ISBN 0-8493-5886-8
- **FRENZEL A. et al.** *Frontiers in Immunology*, 2013, vol. 4
- **STECH M. ; KUBICK S.** *Antibodies*, 2015, vol. 4, 12-33
- **ZHANG et al.** IgG1 Thioether Bond formation in vivo. *JBC*, 2013, vol. 288, 16371-16382
- **ZHANG ; FLYNN.** Cysteine racemization IgG heavy and light chains. *JBC*, 2013, vol. 288, 34325-34335