

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 951 899**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 20174164 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023 EP 3729958**

54 Título: **Identificación y monitorización de inmunoglobulinas monoclonales por masa molecular**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792944 P

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

25.10.2023

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**BARNIDGE, DAVID R. y
MURRAY, DAVID L.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 951 899 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

Identificación y monitorización de inmunoglobulinas monoclonales por masa molecular

CAMPO TÉCNICO

5 La presente divulgación se refiere a métodos y materiales para identificar y cuantificar una inmunoglobulina monoclonal presente por encima del nivel de fondo policlonal en una muestra, tal como una muestra biológica.

ANTECEDENTES

10 Las inmunoglobulinas humanas contienen dos polipéptidos idénticos de la cadena pesada (cada uno aproximadamente 54 kilodáltones en MW) y dos polipéptidos idénticos de la cadena ligera (cada uno aproximadamente 24 kilodáltones en peso molecular) que se unen juntos por enlaces disulfuro. Cada cadena ligera y cada cadena pesada incluyen una región constante y una región variable. En individuos sanos, cada célula plasmática produce una única inmunoglobulina que tiene su propia secuencia de proteínas única contenida dentro de las regiones variables de la porción del fragmento de unión al antígeno (Fab) de la inmunoglobulina. Cuando se examina en términos de la distribución de pesos moleculares, el espectro de masas de las inmunoglobulinas o fragmentos que contienen la(s) región (regiones) variable(s) forma una distribución normal en un individuo sano. En un paciente que tiene una expansión anormal de una célula plasmática, las células plasmáticas anormalmente expandidas producen todas la misma inmunoglobulina particular, dando como resultado una expresión en exceso de esa inmunoglobulina en el paciente. Un paciente con dicha anomalía está en riesgo de desarrollar enfermedades graves que se conocen conjuntamente como gammapatías monoclonales.

20 La aparición de una inmunoglobulina monoclonal en la sangre a un nivel por encima del fondo de la inmunoglobulina normal puede indicar un trastorno de linfocitos B plasmáticos. La electroforesis en gel de proteínas séricas (SPEP), electroforesis por inmunofijación (IFE), electroforesis en gel de proteínas de la orina (UPEP) e inmunonefelometría son métodos rutinarios realizados en laboratorios clínicos para confirmar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal anormalmente alta frecuentemente denominada un componente M o componente de proteína M. El método de detección fundamental de estos métodos se basa en cualquiera de las diferencias en la carga entre las inmunoglobulinas y la interacción de anticuerpos específicos con las inmunoglobulinas que son propiedades menos específicas que su masa.

30 Existen dos isotipos diferentes de polipéptidos de la cadena ligera denominados o bien kappa o bien lambda; y cinco isotipos diferentes de polipéptidos de la cadena pesada denominados gamma, alfa, mu, épsilon y delta. Cada uno de los dos polipéptidos de la cadena ligera y cada uno de los cinco polipéptidos de la cadena pesada contienen dos regiones: la región variable y la región constante. Las regiones constantes de los dos tipos de cadenas ligeras y cinco tipos de cadenas pesadas tienen diferentes secuencias de aminoácidos, y se pueden usar para identificar el isotipo de la cadena pesada o ligera. Los actuales métodos usan técnicas basadas en anticuerpos para identificar el isotipo de la cadena pesada o ligera. Estos anticuerpos son específicos para cada isotipo solo y, por tanto, no detectan directamente la clonalidad.

35 En ciertas enfermedades, tales como gammapatía monoclonal, existe un aumento en la cantidad de inmunoglobulinas en la circulación sanguínea y en la orina con respecto a un individuo sano. Si se detectan altos niveles de inmunoglobulina, se pueden realizar pruebas adicionales para determinar el isotipo de la cadena ligera o pesada.

40 Bamidge DR et al. describen en Journal of Proteome Research, vol. 13, N.º 3, 7 de marzo de 2014, en las páginas 1419-1427, un uso de espectrometría de masas para monitorizar inmunoglobulinas monoclonales en pacientes con una gammapatía monoclonal.

Bergen HR III et al. describen en Biomedical Chromatography, vol. 18, N.º 3, 1 de abril de 2004, en las páginas 191-201 una caracterización de cadenas ligeras de inmunoglobulinas amiloidogénicas directamente a partir de suero por aislamiento por inmutafinidad en línea.

45 Lavatelli F et al. describen en Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1814, N.º 3, 28 de diciembre de 2010, en las páginas 409-419, un novedoso enfoque para la purificación y el análisis proteómico de cadenas ligeras libres de inmunoglobulina patógena del suero.

Kaplan B et al. describen en British Journal of Haematology, vol. 144, N.º 5, 1 de marzo de 2009, en las páginas 705-715, cadenas ligeras libres en plasma de pacientes con amiloidosis de cadenas ligeras y enfermedad por depósito de cadenas no amiloides.

50 Zhang Z et al. describen en Analytical Chemistry, vol. 79, N.º 15, 1 de agosto de 2017, en las páginas 5723-5729, la caracterización de regiones variables de anticuerpos monoclonales por espectrometría de masas de arriba hacia abajo.

SUMARIO

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención.

5 La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevos métodos basados en espectrometría de masas para determinar si una inmunoglobulina monoclonal está presente o no por encima del nivel de fondo policlonal, y en algunas realizaciones para identificar y cuantificar la misma en una muestra, y métodos de determinación de si la inmunoglobulina monoclonal contiene una cadena ligera kappa o lambda; o una cadena pesada gamma, alfa, mu, épsilon o delta. El uso de la relación entre la masa y la carga (m/z), opcionalmente con el uso de técnicas de interacción de anticuerpos, tales como SPEP, IFE e inmunoensayos, proporciona una evaluación más
10 directa de la clonalidad debido a que mide una propiedad fundamental de la inmunoglobulina monoclonal, su masa. Estos métodos son útiles para cribar muestras biológicas para la presencia o ausencia de una inmunoglobulina monoclonal endógena por encima del nivel de fondo policlonal o una inmunoglobulina monoclonal terapéutica exógena, para monitorizar la concentración de la inmunoglobulina monoclonal en un sujeto y para diagnosticar y monitorizar una gammapatía monoclonal.

15 En un aspecto, la presente divulgación caracteriza un método *in vitro* de determinación de si una inmunoglobulina de cadena ligera está presente o no como uno o más picos que tienen un intensidad iónica superior al nivel de fondo en una muestra, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal expresada en exceso, incluyendo el método: (a) aislar inmunoglobulinas totales de la muestra; (b) tratar las inmunoglobulinas totales con proteasas para generar Fab de inmunoglobulinas; y (c) someter los Fab de inmunoglobulina a una técnica de espectrometría de masas para
20 determinar la presencia o ausencia de un pico de proteína M. En algunas realizaciones, este método puede incluir además determinar la presencia o ausencia de gammapatía monoclonal en la muestra basándose en la presencia o ausencia de un pico de proteína M en el espectro de masas.

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza un método *in vitro* de diagnóstico de gammapatía monoclonal en un sujeto, incluyendo el método: (a) aislar inmunoglobulinas totales de una muestra del sujeto; (b) tratar
25 inmunoglobulinas totales con proteasas para generar Fab de inmunoglobulinas; (c) someter los Fab de inmunoglobulinas a una técnica de espectrometría de masas para determinar la presencia o ausencia de un pico de proteína M; y (d) determinar si el sujeto tiene o no gammapatía monoclonal basándose en la presencia o ausencia de un pico de proteína M.

En otro aspecto más, la presente divulgación caracteriza un método *in vitro* de monitorización de un tratamiento de gammapatía monoclonal en un sujeto, incluyendo el método: (a) aislar inmunoglobulinas totales de una primera
30 muestra del sujeto antes del tratamiento y una segunda muestra del sujeto durante o después del tratamiento; (b) tratar inmunoglobulinas totales con proteasas para generar una primera y segunda muestras de Fab; (c) someter la primera y segunda muestras de Fab a una técnica de espectrometría de masas para determinar un primer nivel de una inmunoglobulina en la primera muestra de Fab y un segundo nivel de la inmunoglobulina en la segunda muestra de Fab; y (d) comparar el primer nivel y el segundo nivel.

En algunas realizaciones, los Fab se desacoplan antes de someter a la técnica de espectrometría de masas.

En algunas realizaciones, se cuantifica el pico de proteína M o inmunoglobulina identificada por la técnica de espectrometría de masas.

35 En algunas realizaciones, la técnica de espectrometría de masas usada en estos métodos puede incluir una cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM).

En algunas realizaciones, la técnica de espectrometría de masas usada en estos métodos puede incluir una desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas (EM MALDI).

En algunas realizaciones, la muestra puede ser una muestra de sangre completa, suero, plasma u orina, o un reactivo artificial.

45 En algunas realizaciones, el aislamiento de inmunoglobulinas totales de la muestra puede incluir purificación por fraccionamiento basado en un producto químico o por purificación por afinidad.

En algunas realizaciones, estos métodos pueden incluir además el cribado de la muestra por electroforesis.

50 Como se usa en el presente documento, una "muestra" puede ser cualquier muestra biológica, tal como una muestra de tejido (por ejemplo, tejido adiposo, de hígado, riñón, corazón, músculo, hueso o piel) o de líquido biológico (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, líquido lagrimal o saliva), o un reactivo artificial.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un animal tal como un mamífero, por ejemplo, un humano, perro, gato, primate, roedor, cerdo, oveja, vaca o caballo.

Como se usa en el presente documento, "inmunoglobulinas que contienen la región variable" pueden ser inmunoglobulinas intactas o porciones de inmunoglobulinas que contienen las regiones variables, por ejemplo,

cadenas ligeras de la inmunoglobulina, cadenas pesadas de la inmunoglobulina, fragmentos de unión al antígeno (Fab) de inmunoglobulinas, y sus mezclas.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y otras referencias mencionadas en ella, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos solo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIG. 1A-1D muestran resultados del análisis de una muestra de suero de un paciente con mieloma múltiple de IgG kappa. La FIG. 1A es un espectro de masas que muestra un conjunto de iones de carga múltiple que se convierten en una masa molecular de 23.452,64 Da (FIG. 1B), que está dentro del intervalo de masas esperado para una cadena ligera de IgG. La FIG. 1C muestra otro conjunto de iones de carga múltiple que se convierten en una masa molecular de 51.596,07 y 51.758,27 Da (FIG. 1D), que está dentro del intervalo de masas esperado para una cadena pesada de IgG. La diferencia entre la masa molecular de la serie 2 y la serie 3 es 162,20 Da, que se corresponde estrechamente con la masa de una subunidad de hexosa.

Las FIG. 2A-2D son un conjunto de espectros de masas de suero (FIG. 2A y 2B) y muestras de orina (FIG. 2C y 2D) de dos pacientes, uno con una gammapatía monoclonal IgA kappa (FIG. 2A y 2C) y uno con una gammapatía monoclonal IgA lambda (FIG. 2B y 2D), medidas por CL-EM.

La FIG. 3 es un espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de suero de un paciente con una gammapatía monoclonal IgM, medida por CL-EM.

La FIG. 4 es un espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de suero de un individuo sano sin gammapatía monoclonal, medida por CL-EM.

La FIG. 5 es un espectro de masas de la inmunoglobulina monoclonal terapéutica adalimumab (HUMIRA®), medida por análisis de espectrometría de masas de ionización-desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF) y CL-EM.

La FIG. 6 es un espectro de masas de una muestra de suero de un individuo sano sin gammapatía monoclonal, medida por análisis de EM MALDI-TOF.

La FIG. 7 es un espectro de masas de una muestra de suero de un individuo sano enriquecida con la inmunoglobulina monoclonal terapéutica diluida adalimumab, medido por análisis de EM MALDI-TOF.

La FIG. 8 es un espectro de masas de una muestra de suero de un paciente con un mieloma múltiple de la cadena ligera lambda, medido por análisis de EM MALDI-TOF.

La FIG. 9 es un espectro de masas de una muestra de orina de un paciente con una cadena ligera libre kappa, medida por análisis de EM MALDI-TOF.

La FIG. 10 es un espectro de masas de una muestra de suero de un paciente con gammapatía monoclonal IgG kappa, medida por CL-EM, con hitos del pico a 1229,9 de Masa/Carga que se selecciona como el ion precursor para CL-EM/EM.

La FIG. 11 muestra el espectro de masas de iones de fragmentos para el ión precursor marcado en la FIG. 10.

La FIG. 12 muestra espectros de masas de la cadena ligera de diferentes pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras kappa conocidas.

La FIG. 13 muestra el espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de orina de un paciente con mieloma múltiple con cadenas ligeras lambda conocidas, junto con iones de fragmentos de CL-EM/EM específicos de la cadena ligera lambda.

La FIG. 14 muestra el espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de orina de un paciente con cadenas ligeras libres kappa conocidas, junto con iones de fragmentos de CL-EM/EM específicos de la cadena ligera kappa.

Las FIG. 15A-15B son un conjunto de espectros de masas de una muestra de suero normal (1A) y suero normal enriquecido con 0,5 g/dl del mAb recombinante IgG kappa adalimumab (1B). El espectro de masas del suero

normal muestra un amplio intervalo de picos sin resolver, mientras que el suero normal enriquecido con 0,5 g/dl de adalimumab muestra iones de proteína de carga múltiple claramente definidos. La FIG. 15C es un espectro convertido para la muestra de suero normal que presenta un amplio intervalo de picos sin resolver. La FIG. 15D es un espectro de masas convertido para el suero normal enriquecido con 0,5 g/dl de adalimumab que muestra un único pico a una masa molecular promedio de 23.412,19 Da. Esta masa está en excelente concordancia con la masa molecular promedio calculada de 23.412,13 Da para la cadena ligera kappa de adalimumab.

Las FIG. 16A-16C muestran los resultados del análisis de una muestra de suero del mismo paciente mostrado en la FIG. 1 después del tratamiento para mieloma múltiple. La muestra era negativa por electroforesis en gel de proteínas (PEL), electroforesis por inmunofijación (IFE) y el ensayo de cadena ligera libre (FLC). La FIG. 16A es un espectro de masas que muestra una serie de iones de carga múltiple. La FIG. 16B muestra la masa molecular calculada para los iones en la FIG. A, que es solo 0,47 Da diferente de la masa molecular observada en la FIG. 1 para la cadena ligera. La FIG. 16A muestra que la masa molecular para los iones propuestos de la cadena pesada ya no se puede calcular debido a que los iones están por debajo del nivel de detección.

La FIG. 17 muestra los resultados de la EM de arriba hacia abajo de adalimumab enriquecido en suero normal. El ión a $m/z = 1233$ en el espectro superior se corresponde con el ión de estado de carga +19 de la cadena ligera kappa de adalimumab y se seleccionó para EM de arriba hacia abajo. La flecha indica hacia el espectro de masas de iones de fragmentos. Los iones de fragmentos marcados se corresponden con las masas esperadas para iones de fragmentos de la porción del extremo C de la cadena ligera kappa que contiene la región constante. Se muestran en la tabla las masas iónicas y calculadas para la secuencia de aminoácidos específica de la región constante de la cadena ligera kappa.

La FIG. 18 muestra los resultados de la EM de arriba hacia abajo de un patrón de la cadena ligera lambda de la inmunoglobulina. Se seleccionó el ión de la cadena ligera en $m/z = 1193$ en el espectro superior para EM/EM, y el espectro de masas de iones de fragmentos se muestra debajo. Los iones de fragmentos que se corresponden con una porción de la región constante de la cadena ligera lambda se marcan con sus masas monoisotópicas respectivas. Se muestran en la tabla las masas monoisotópicas del ión b calculadas para la secuencia específica de la región constante lambda.

Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevos métodos basados en espectrometría de masas para determinar si una inmunoglobulina está presente o no en una muestra biológica, y métodos de determinación de si la inmunoglobulina contiene o no una cadena ligera kappa o lambda. El uso de masa con respecto a carga (m/z), opcionalmente con una o más técnicas de interacción de anticuerpos, tales como SPEP, IFE e inmunoensayos, proporciona una evaluación más directa de la clonalidad debido a que mide una propiedad fundamental de la inmunoglobulina. Estos métodos son útiles para cribar muestras biológicas para la presencia o ausencia de gammapatía monoclonal, para diagnosticar y monitorizar gammapatía monoclonal en un sujeto, y para cuantificar un anticuerpo terapéutico monoclonal en un paciente.

En el presente documento se describen métodos basados en espectroscopía de masas para identificar si una inmunoglobulina monoclonal está presente o no en una muestra biológica. La velocidad, sensibilidad, resolución y robustez de la espectroscopía de masas hacen que los presentes métodos sean superiores a SPEP o UPEP para cribar muestras para gammapatías monoclonales. Un método descrito en el presente documento puede incluir el uso de una cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). En algunas realizaciones, se pueden usar técnicas de espectrometría de masas en tándem (EM/EM), por ejemplo, una técnica de espectrometría de masas en tándem con cromatografía de líquidos (CL-EM/EM). En algunas realizaciones, se puede usar la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz- espectrometría de masas de tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF).

Muestras y preparación de muestras

Una muestra para análisis puede ser cualquier muestra biológica, tal como una muestra de tejido (por ejemplo, tejido adiposo, de hígado, riñón, corazón, músculo, hueso o piel) o de líquido biológico (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, líquido lacrimal o saliva), o un reactivo artificial. La muestra biológica puede ser de un sujeto que tiene inmunoglobulinas, que incluye, pero no se limita a, un mamífero, por ejemplo, un humano, perro, gato, primate, roedor, cerdo, oveja, vaca, caballo, ave, reptil o pez.

Se puede tratar una muestra para retirar componentes que podrían interferir con la técnica de espectrometría de masas. Se puede usar una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica basándose en el tipo de muestra. Se pueden moler y extraer muestras sólidas y/o de tejido para liberar los analitos de interés de los componentes interferentes. En dichos casos, una muestra se puede centrifugar, filtrar y/o someter a técnicas cromatográficas para retirar los componentes interferentes (por ejemplo, células o fragmentos de tejido). En aún otros casos, se pueden añadir reactivos conocidos para precipitar o unir los componentes interferentes. Por ejemplo, se pueden tratar muestras de sangre completa usando técnicas convencionales de coagulación para retirar glóbulos rojos y blancos y plaquetas. Se puede desproteinizar una muestra. Por ejemplo, una muestra de plasma puede tener

proteínas séricas precipitadas usando reactivos convencionales tales como acetonitrilo, KOH, NaOH, u otros conocidos por los expertos habituales en la materia, opcionalmente seguido por centrifugación de la muestra.

5 Las inmunoglobulinas se pueden aislar de las muestras usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden purificar por fraccionamiento basado en un producto químico, por ejemplo, cromatografía en Melon Gel (Thermo Scientific), donde las resinas Melon Gel se unen a proteínas distintas de
 10 inmunoglobulina en una muestra y permiten que las inmunoglobulinas se recojan en la fracción no retenida; o por purificación por afinidad, por ejemplo, por purificación de proteína A, proteína G, o proteína L, donde las inmunoglobulinas se unen por las proteínas a pH fisiológico y luego se liberan de las proteínas reduciendo el pH. Cuando se usan muestras de suero, plasma o sangre completa, una muestra, tal como una muestra de 10 - 250 μ l, por ejemplo, 50 μ l, se puede someter directamente a purificación en Melon Gel, Proteína A, Proteína G o Proteína L. Cuando se usan muestras de orina, se puede tamponar una muestra de orina, por ejemplo, se puede diluir primero una muestra de orina de 50 μ l con 50 μ l de bicarbonato de amonio 50 mM.

15 Se pueden procesar además inmunoglobulinas intactas para reducir su masa global, mientras que se retenga la región variable única de la inmunoglobulina. En algunas realizaciones, las cadenas ligeras en una muestra de inmunoglobulina total se pueden desacoplar de las inmunoglobulinas de la cadena pesada. El desacoplamiento se puede lograr tratando las inmunoglobulinas totales con un agente reductor, tal como ditioneol, tris(2-carboxietil)fosfina o 2-mercaptoetanol. En algunas realizaciones, la etapa de reducción se realiza a temperatura elevada, por ejemplo, en un intervalo desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 65 °C, tal como aproximadamente 55 °C, para desnaturar las proteínas. En algunas realizaciones, la muestra se trata además, por ejemplo, modificando el pH de
 20 la muestra o tamponando la muestra. En algunas realizaciones, la muestra se puede acidificar.

En algunas realizaciones, los fragmentos de unión al antígeno (Fab) de inmunoglobulinas se pueden escindir de las inmunoglobulinas intactas usando proteasas tales como pepsina. Se puede retirar el exceso de reactivos y sales de las muestras usando métodos conocidos por los expertos habituales en la técnica.

Métodos de espectrometría de masas

25 Después de la preparación de muestras, una muestra de inmunoglobulina, tal como una cadena ligera desacoplada intacta o muestra de inmunoglobulina Fab, se puede someter a una técnica de espectrometría de masas (EM), ya sea directamente o después de la separación en una columna de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En algunas realizaciones, se puede usar cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) para analizar el espectro de masas de los iones, por ejemplo, los iones +1, resultantes de la muestra de inmunoglobulina intacta, de
 30 cadena ligera o Fab. CL-EM es una técnica analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía de líquidos con las capacidades del análisis de masas de la espectrometría de masas, y es adecuada para la detección y la posible identificación de productos químicos en una mezcla compleja. Se puede usar cualquier máquina de CL-EM, por ejemplo, el espectrómetro de masas ABSciex 5600. Se puede analizar el espectro de masas de iones para uno o más picos que tienen una intensidad superior a la intensidad de los niveles de iones de fondo, por
 35 ejemplo, los iones resultantes de las inmunoglobulinas en exceso no expresados. Por ejemplo, se pueden examinar uno o más picos de iones, por ejemplo, un pico de ión de la intensidad más alta, para determinar si el uno o más picos de iones tienen una intensidad de iones superior a la intensidad de fondo. En algunas realizaciones, la intensidad de iones del uno o más picos es al menos dos desviaciones estándar superior a la intensidad de fondo; en algunos casos, al menos 50 % mayor, al menos 75 % mayor, o al menos 100 % mayor, o al menos 3 veces mayor, 5 veces mayor, 6
 40 veces mayor, 7 veces mayor, 8 veces mayor, 9 veces mayor, 10 veces mayor, 25 veces mayor, 50 veces mayor, 75 veces mayor, 100 veces mayor, o más. La presencia de uno o más picos que tienen una intensidad de iones superior al nivel de fondo se considera un pico de proteína M o componente M, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal.

45 En algunas realizaciones, se puede usar desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF) para analizar el espectro de masas de una muestra de inmunoglobulina, por ejemplo, el espectro de masas del estado de carga +1 de las moléculas en la muestra, es decir, la muestra de inmunoglobulina intacta, de cadena ligera o Fab. La desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas (EM MALDI) usa una técnica de ionización suave para obtener iones grandes en la fase gaseosa, y es adecuada para analizar biomoléculas frágiles (tales como ADN, proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas
 50 grandes, que tienden a fragmentarse cuando son ionizadas por métodos de ionización convencionales. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) usa un campo eléctrico para acelerar los iones a través del mismo potencial, y entonces mide el tiempo que necesitan para llegar al detector. Si todas las partículas tienen la misma carga, las energías cinéticas son idénticas, y sus velocidades dependen únicamente de sus masas. Iones más ligeros llegan al detector primero. Las muestras se pueden preparar usando el método de la gota seca para EM MALDI-TOF. Las ventajas de uso de EM MALDI-TOF incluyen: 1) menor coste de los instrumentos, 2) mayor rendimiento, 3) fácil preparación de
 55 muestras, 4) instrumentación fácil de usar y 5) menores estados de carga. Se puede usar cualquier espectrómetro de masas MALDI-TOF, por ejemplo, el espectrómetro de masas de MALDI-TOF Biflex III (Bruker Daltonics). Se puede analizar el espectro de masas, por ejemplo, el espectro de masas de iones de polipéptidos de la cadena ligera intacta +1, para identificar uno o más picos que tienen una intensidad iónica superior a la intensidad iónica del nivel fondo y a una masa/carga apropiada esperada para un fragmento de inmunoglobulina de cadena ligera o Fab, por ejemplo, aproximadamente 21.000 a aproximadamente 26.000 m/z, o aproximadamente 22.000 a aproximadamente 24.500
 60

m/z, o aproximadamente 23.000 a aproximadamente 24.000 m/z para cadenas ligeras; o aproximadamente 40.000 a aproximadamente 65.000 m/z, o aproximadamente 45.000 a aproximadamente 62.000 m/z; o aproximadamente 50.000 a aproximadamente 60.000 m/z para fragmentos de inmunoglobulinas Fab. En algunas realizaciones, el uno o más picos tiene una intensidad iónica de al menos dos desviaciones estándar superior a la intensidad iónica del nivel de fondo; o en algunas realizaciones, al menos 50 % mayor, al menos 75 % mayor, o al menos 100 % mayor, o al menos 3 veces mayor, 5 veces mayor, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces mayor, 25 veces mayor, 50 veces mayor, 75 veces mayor, 100 veces mayor, o más, que la intensidad iónica de fondo. La presencia de uno o más picos que tienen una intensidad iónica superior a la intensidad iónica del nivel de fondo y a una m/z apropiada para una cadena ligera o fragmento de inmunoglobulina se considera un pico de proteína M o espícula M, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal por encima del nivel de fondo policlonal.

En algunas realizaciones, se puede usar espectrometría de masas en tándem (EM/EM) para determinar si una inmunoglobulina contiene una cadena ligera kappa. Por ejemplo, se pueden realizar dos rondas de EM. Durante la primera ronda, la muestra, por ejemplo, una cadena ligera desacoplada de la muestra de inmunoglobulina, se somete a CL-EM, y se genera un espectro de masas del fragmento de ión de la cadena ligera, por ejemplo, una distribución de fragmentos de la inmunoglobulina de la cadena ligera que tiene +1 m/z, como se ha descrito anteriormente. Se identifica el pico de ión más intenso y se selecciona como el ión precursor para la segunda ronda de espectrometría de masas, CL-EM/EM. Una vez se determina m/z del ión precursor de mayor intensidad, el método de CL-EM/EM permite que se seleccione la porción de cuadrupolo del espectrómetro de masas para ese ión específico. Durante la segunda ronda de CL-EM/EM, este ión precursor se fragmenta usando disociación inducida por colisión (CID), que implica la colisión de un ión con un átomo neutro o molécula en la fase gaseosa y la posterior disociación del ión. Los iones de fragmentos producidos durante CID se pueden entonces detectar usando la porción de tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas. Se pueden comparar una o más de las m/z (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más) de la distribución resultante de picos de iones de fragmentos con una lista de una o más m/z esperadas para los iones de fragmentos de proteína, por ejemplo, iones +1 del fragmento de proteína, que se esperaría que resultaran de una región constante del extremo C de la cadena ligera. La secuencia amino del ensayo de la región constante de la cadena ligera está disponible en bases de datos públicas. Dichos iones se denominan iones y para la región constante del extremo C de la cadena ligera kappa. Cuando se correlacionan una o más de las m/z de los iones de fragmentos, por ejemplo, coinciden, con una o más de las m/z de los iones de fragmentos de proteína esperados, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más, se determina que la cadena ligera de la inmunoglobulina es una cadena ligera kappa.

Similarmente, se puede usar espectrometría de masas en tándem para determinar si una inmunoglobulina contiene una cadena ligera lambda. Por ejemplo, se pueden realizar dos rondas de EM, y durante la primera ronda, la muestra, por ejemplo, una cadena ligera desacoplada de la muestra de inmunoglobulina, se somete a CL-EM, y se genera un espectro de masas del fragmento de ión de la cadena ligera, por ejemplo, una distribución de fragmentos de la inmunoglobulina de la cadena ligera que tiene +1 m/z, como se ha descrito anteriormente. Se selecciona un ión precursor para la segunda ronda de CL-EM/EM. Preferentemente, pero no necesariamente, el ión precursor se selecciona del ión más abundante dentro del intervalo de masa para la selección de iones precursores. Una vez se determina m/z del ión precursor, el método de CL-EM/EM permite que la porción de cuadrupolo del espectrómetro de masas seleccione ese ión específico. Durante la segunda ronda de CL-EM/EM, este ión precursor se fragmenta usando disociación inducida por colisión (CID), que implica la colisión de un ión con un átomo neutro o molécula en la fase gaseosa y la posterior disociación del ión. Los iones de fragmentos producidos durante CID se pueden entonces detectar usando la porción de tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas. Se pueden comparar una o más de m/z (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más) de la distribución resultante de los picos de iones de fragmentos con una lista de una o más m/z esperadas para los iones de fragmentos de proteína, por ejemplo, iones +1 del fragmento de proteína, que se esperaría que produjeran una porción del extremo N de la cadena ligera de la región constante. Dichos iones se denominan iones b para la porción del extremo N de la región constante lambda. La secuencia amino del ensayo de la región constante de la cadena ligera está disponible en bases de datos públicas. La comparación se puede realizar usando software comercialmente disponible, por ejemplo, ProSight PTM 2.0. Cuando se correlacionan una o más de las m/z de los iones de fragmentos, por ejemplo, coinciden, con una o más de las m/z de los iones de fragmentos de proteína esperados, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más, se determina que la cadena ligera de la inmunoglobulina es una cadena ligera lambda.

Métodos de cribado de muestras biológicas, y de diagnóstico y monitorización de gammapatía monoclonal

Los métodos basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento se pueden usar para determinar si una inmunoglobulina particular está presente o no en una muestra biológica. Las inmunoglobulinas se pueden aislar de la muestra biológica y someterse a una técnica de espectrometría de masas para determinar si una inmunoglobulina está presente o no por encima del nivel de fondo policlonal. En algunas realizaciones, inmunoglobulinas intactas se pueden someter a ensayos de espectrometría de masas. En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas se pueden procesar para reducir su masa a la vez que retienen las regiones variables únicas de las inmunoglobulinas antes someterlas a la técnica de espectrometría de masas. En esos casos, porciones de inmunoglobulinas que contienen las regiones variables se someten a espectrometría de masas. Por ejemplo, las cadenas ligeras de la inmunoglobulina se pueden desacoplar de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina, y se someten a los métodos basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento. Los fragmentos

de unión al antígeno (Fab) de las inmunoglobulinas también se pueden escindir de la inmunoglobulina total usando enzimas, tales como pepsina, y se someten a los métodos basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento.

5 Los métodos basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento, cuando se acoplan con un método de aislamiento de inmunoglobulinas rápido y eficaz (por ejemplo, cromatografía en Melon Gel), se pueden usar para cribar muestras del paciente, por ejemplo, muestras de suero, plasma, sangre completa u orina, para gammapatías monoclonales en un ámbito de laboratorio clínico. Los métodos de cribado basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento muestran velocidad, sensibilidad, resolución y robustez superior a las pruebas de laboratorio convencionales en el cribado de la elevada expresión de inmunoglobulinas monoclonales en muestras biológicas.

10 Los métodos basados en espectrometría de masas desvelados en el presente documento se pueden usar para diagnosticar y monitorizar gammapatía monoclonal en un sujeto. Una muestra del sujeto se puede someter a los métodos de cribado basados en espectrometría de masas descritos anteriormente para proporcionar un diagnóstico de la presencia o ausencia de la gammapatía monoclonal. Cuando el sujeto se diagnostica con gammapatía monoclonal, los métodos desvelados en el presente documento se pueden usar además para monitorizar un tratamiento de la gammapatía monoclonal. Dichos métodos incluyen proporcionar una primera muestra del sujeto antes del tratamiento y una segunda muestra del sujeto durante o después del tratamiento. Las inmunoglobulinas se aíslan de la primera y segunda muestras, y se someten a una técnica de espectrometría de masas. El nivel de una inmunoglobulina se determina antes y después del tratamiento y se compara. Una disminución en su nivel indica que el tratamiento puede ser eficaz para el sujeto; mientras que un aumento o ningún cambio en su nivel indica que el tratamiento puede ser ineficaz para el sujeto.

EJEMPLOS

La invención se describe además en los siguientes ejemplos.

25 **Ejemplo 1. Detección de inmunoglobulinas monoclonales usando métodos basados en CL-EM en muestras de suero de pacientes con gammapatía monoclonal IgG, IgA o IgM documentada.**

Se aislaron inmunoglobulinas totales sometiendo una muestra de suero de 50 µl de un sujeto a purificación en Melon Gel (Thermo Scientific) según el folleto del fabricante. Se desacoplaron las inmunoglobulinas de la cadena ligera de las inmunoglobulinas de la cadena pesada reduciendo y desnaturalizando las inmunoglobulinas totales con ditiotreitolo (DTT) 50 mM durante 1 hora a 55 °C. La muestra de inmunoglobulina desacoplada se diluyó en agua y se retiraron los reactivos en exceso usando un tubo de filtro de 3 kDa. La muestra de inmunoglobulina desacoplada se acidificó con 0,1 % de ácido fórmico, y entonces se examinó por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) usando el espectrómetro de masas ABSciex 5600 equipado con una columna de fase inversa C8.

35 Las FIG. 1A-1D muestran los resultados del análisis de una muestra de suero de un paciente con mieloma múltiple de IgG kappa usando los métodos descritos en el presente documento. La FIG. 1A es un espectro de masas que muestra un conjunto de iones de carga múltiple que se convierten en una masa molecular de 23.452,64 Da (FIG. 1B), que está dentro del intervalo de masas esperado para una cadena ligera de IgG. La FIG. 1C muestra otro conjunto de iones de carga múltiple que se convierten en una masa molecular de 51.596,07 y 51.758,27 Da (FIG. 1D), que está dentro del intervalo de masas esperado para una cadena pesada de IgG. La diferencia entre la masa molecular de la serie 2 y la serie 3 es 162,20 Da, que coincide estrechamente con la masa de una subunidad de hexosa.

40 Las FIG. 2A-2D muestran espectros de masas del suero (FIG. 2A y 2B) y muestras de orina (FIG. 2C y 2D) de dos pacientes, uno con una gammapatía monoclonal IgA kappa (FIG. 2A y 2C) y uno con una gammapatía monoclonal IgA lambda (FIG. 2B y 2D), medidos por CL-EM.

La FIG. 3 muestra un espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de suero de un paciente con una gammapatía monoclonal IgM, medido por CL-EM.

45 La FIG. 4 muestra un espectro de masas de la cadena ligera de una muestra de suero de un individuo sano sin gammapatía monoclonal, medido por CL-EM.

Ejemplo 2. Detección de cadenas ligeras de la inmunoglobulina en muestras de suero o de orina por EM MALDI-TOF.

50 También se usó espectrometría de masas de ionización-desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF) para monitorizar anticuerpos monoclonales en suero y orina. Se usaron adalimumab purificado en Melon Gel (HUMIRA®) y controles de suero normal para conseguir resultados iniciales usando EM MALDI-TOF (FIG. 5-7). El pico más abundante que representa la cadena ligera de la inmunoglobulina en la FIG. 5 es aproximadamente 3000 recuentos para adalimumab, mientras que el nivel de fondo de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina en la muestra de control normal en la FIG. 6 es aproximadamente 50 recuentos. A continuación, se diluyó diez veces adalimumab y se enriqueció en una muestra de suero de control normal para simular la presencia de una inmunoglobulina monoclonal

en una muestra de suero de paciente y se analizó por EM MALDI-TOF. Como se muestra en la FIG. 7, se detectó adalimumab en la muestra de suero normal por EM MALDI-TOF.

Entonces se usó EM MALDI-TOF para identificar anticuerpos monoclonales en muestras de suero de un paciente con mieloma múltiple. La muestra de suero se preparó como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 y se analizó por EM MALDI-TOF. El anticuerpo de la cadena ligera monoclonal asociado al clon maligno se observó claramente a Masa/Carga 22.783 (FIG. 8).

También se evaluó la capacidad de EM MALDI-TOF para identificar la presencia de cadenas ligeras libres monoclonales (> 3 mg/ml) en muestra de orina de pacientes con mieloma múltiple. Se diluyó primero una muestra de orina de 50 µl del paciente con 50 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y luego se redujo con DTT 100 mM durante 30 minutos a 55 °C. La muestra reducida se acidificó con ácido fórmico, luego se examinó por EM MALDI-TOF. Los resultados del análisis de EM MALDI-TOF de una muestra de orina de un paciente con cadenas ligeras libres lambda conocidas se muestran en la FIG. 9, y un pico a 23.327 de Masa/Carga indica la presencia de la cadena ligera libre lambda en la muestra de orina. Estos hallazgos indican que se puede usar EM MALDI-TOF para cribar muestras de paciente para gammapatías monoclonales.

15 **Ejemplo 3. Determinación de si una cadena ligera de la inmunoglobulina es cadena ligera lambda o kappa por espectrometría de masas en tándem.**

La FIG. 10 es un espectro de masas de una muestra de suero de un paciente con gammapatía monoclonal IgG kappa, medido por CL-EM, con hitos del pico a 1229,9 de Masa/Carga que se selecciona como el ión precursor para CL-EM/EM. Una vez se determinó la masa del ión precursor, se seleccionó un método de CL-EM/EM que permitía que la porción de cuadrupolo del espectrómetro de masas seleccionara ese ión específico. Este ión precursor se fragmentó entonces usando disociación inducida por colisión (CID) en la porción de la celda de colisión del espectrómetro de masas. Los iones de fragmentos producidos se analizaron entonces usando la porción del tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas.

La FIG. 11 mostró el espectro del ión del fragmento para el ión precursor marcado en la FIG. 10. En el lado derecho de la FIG. 11 estaba una lista de fragmentos del ión y del extremo C y sus masas de la región constante para la cadena ligera kappa. La FIG. 11 también mostró una flecha indicando desde la lista en el resto P (prolina) 11 con una masa de 1237,5994, hasta un pico en el espectro de ión del fragmento en la masa 1237,6263. Comparando otros picos de iones de fragmentos con la lista de iones y para la región constante del extremo C para la cadena ligera kappa, fue posible identificar el componente M como una cadena ligera kappa.

Se preparó la muestra de suero de varios pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras kappa del componente M conocido como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. La FIG. 12 mostró los espectros de masas de la cadena ligera del componente M de las muestras de suero de diferentes pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras kappa de componente M conocido. Cada espectro mostró un conjunto diferente de iones de carga múltiple de cada cadena ligera kappa única del paciente. Estos resultados mostraron claramente que CL-EM/EM de la cadena ligera intacta se puede usar para determinar si es una cadena ligera kappa.

Se realizaron experimentos equivalentes en pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras lambda de componente M conocido encontradas en la orina. Se prepararon muestras de orina como se describe en el Ejemplo 1. Los datos obtenidos para muestras de orina de pacientes demostraron la sensibilidad analítica y especificidad superiores del método con respecto a los métodos actualmente usados en laboratorios clínicos, por ejemplo, electroforesis en gel de proteína sérica (SPEP), o electroforesis en gel de proteína de orina (UPEP). La FIG. 13 mostró el espectro de masas de la cadena ligera de componente M de una muestra de orina de paciente con cadenas ligeras lambda de componente M conocido. El espectro en la parte superior de la FIG. 13 mostró los iones de carga múltiple de las cadenas ligeras libres lambda (FLC), que se encontró que estaban presentes en la orina del paciente usando un inmunoensayo estándar. El espectro en la parte inferior de la FIG. 13 mostró los espectros del ión del fragmento por CL-EM/EM del ión intacto de la cadena ligera lambda del paciente a 1140,4582 de Masa/Carga. Usando un paquete de software comercialmente disponible llamado ProSight, se puede determinar la identidad de los iones de fragmentos observados. El software identifica los iones como iones b producidos a partir de la porción del extremo N de la región constante lambda. Los iones que coinciden con los iones b esperados se marcan con un círculo en el espectro inferior en la FIG. 13. Estos resultados mostraron claramente que se puede usar CL-EM/EM de una cadena ligera intacta para determinar si es cadena ligera lambda.

Se probaron muestras de orina de paciente con cadenas ligeras libres kappa conocidas usando el mismo método. Los resultados de estos experimentos se mostraron en la FIG. 14. La parte superior de la FIG. 14 mostró el espectro para la cadena ligera libre kappa intacta en la muestra de orina. El espectro fue similar al observado para suero. La parte inferior de la FIG. 14 mostró el espectro del ión del fragmento para el ión de carga múltiple intacto a 1060,6605 de Masa/Carga. Se resaltaron los iones de fragmentos que coincidieron con los iones esperados de la región constante del extremo C. Los iones de fragmentos observados fueron los mismos que los observados en muestras de suero de pacientes con una cadena ligera kappa (véase FIG. 11). Esta observación confirmó que las cadenas ligeras kappa se pueden identificar en muestras de orina y suero.

Se produjeron claras diferencias en los iones de fragmentos entre cadenas ligeras kappa y lambda y se pueden detectar por espectrometría de masas en tándem. Los iones kappa intactos expuestos a la disociación inducida por colisión (CID) durante la porción de EM/EM del experimento en el espectrómetro de masas 5600 Q-TOF habían producido fragmentos de iones y desde la porción del extremo C de la molécula. Iones lambda intactos expuestos a las mismas condiciones de CID, EM/EM, habían producido iones b de la porción del extremo N de la molécula. Se puede usar un método similar para identificar los diferentes subtipos lambda que dan un aspecto de diagnóstico adicional a esta metodología. La única serie de iones y producida por la secuencia de aminoácidos del extremo C de kappa se puede usar como marca de EM/EM similar a las marcas de proteína que se añaden a proteínas recombinantes para fines de purificación.

10 **Ejemplo 4. Adalimumab en suero normal como sistema de modelo**

Adalimumab es una inmunoglobulina monoclonal terapéutica anti-TNF que es ampliamente recetada para regular por disminución la respuesta inflamatoria en pacientes con trastornos autoinmunitarios. Las inmunoglobulinas monoclonales terapéuticas, tales como adalimumab, son patrones sustitutos ideales para simular una inmunoglobulina monoclonal en suero debido a que están fácilmente disponibles en alta pureza y normalmente tienen un gran conjunto de bibliografía sobre sus propiedades estructurales. La FIG. 15 muestra los espectros de masas para suero normal y suero enriquecido con 0,5 g/dl (30 μ M) de adalimumab. Cada espectro de masas representa los espectros sumados juntos con respecto al tiempo de elución de la cadena ligera de adalimumab. El espectro de masas del suero normal en la sección A muestra un pico ancho sin resolver con una abundancia relativa máxima de 300 recuentos por segundo (cps). Alternativamente, el espectro de masas del suero enriquecido con adalimumab en la sección B muestra una serie distinta de picos de iones de proteínas multicargadas con una abundancia relativa máxima de 6000 cps. La masa molecular convertida para el suero normal en el panel C muestra un conjunto de distribución de masas ancha con ninguna masa individual mayor en abundancia que los fondos. Esto contrasta fuertemente con la masa molecular convertida para el suero normal enriquecido con 0,5 g/dl de adalimumab en el panel D, que muestra un único pico con la masa molecular observada de 23.412,19 Da. Esta masa molecular está de acuerdo con la masa molecular promedio calculada a partir de la secuencia de aminoácidos conocida para la cadena ligera kappa de adalimumab (23.412,13 Da). Para evaluar la EM de microCL-ESI-Q-TOF para la cuantificación, se enriqueció adalimumab en tampón bicarbonato de amonio 50 mM, suero normal y orina normal. Se usaron diez concentraciones estándar diferentes que variaron desde 0,005 hasta 5,0 g/dl. Las curvas patrón preparadas en suero usaron Melon Gel para enriquecer en inmunoglobulinas, mientras que las curvas preparadas en orina y tampón se redujeron y analizaron sin purificación en Melon Gel. Los intervalos de linealidad y del intervalo dinámico lineal en la tabla se dividen según las dos técnicas de cuantificación. El primer enfoque marcado "área de pico de deconvolución" usa el área de pico encontrada después de la deconvolución de los iones de carga múltiple con respecto a la masa molecular, mientras que el segundo enfoque marcado "área de pico de ión extraído" se refiere a usar las áreas de pico obtenidas de un conjunto seleccionado de iones extraídos. La tabla demuestra que las curvas patrón tienen un intervalo dinámico lineal dentro del intervalo de concentración necesario en la práctica clínica. Se examinó la precisión entre los ensayos de 10 preparaciones duplicadas en Melon Gel de adalimumab enriquecido en suero normal a 0,1 g/dl y se encontró que CV para el área de pico de la cadena ligera era 6,2 %, mientras que CV para la cadena pesada era 11 %. El límite de cuantificación como se define por un CV < 20 % durante 10 duplicados usando las áreas de pico de deconvolución fue 0,005 g/dl para la cadena ligera y 0,025 g/dl para la cadena pesada de adalimumab enriquecido en suero normal.

40 **Ejemplo 5. Monitorización de una inmunoglobulina monoclonal en un paciente con mieloma múltiple**

Se examinó una serie de muestras de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple IgG kappa. El espectro de masas de una muestra de suero se muestra en la FIG. 1. El espectro en la FIG. 1A representa una porción de los espectros de masas sumados a través del pico de CL de la inmunoglobulina y muestra una serie de iones de carga múltiple. La masa molecular convertida se muestra en la FIG. 1B y se calculó que era 23.452,64 Da, que representa la masa molecular propuesta de la porción de la cadena ligera kappa de la proteína M. El espectro en el panel C muestra otra porción del pico sumado de CL de la inmunoglobulina y muestra una serie diferente de iones de carga múltiple. Se encontró que la masa molecular para esta serie mostrada en la FIG. 1D tenía dos componentes, uno a 51.596,07 Da y otro a 51.758,27 Da, ambos de los cuales están de acuerdo con la cadena pesada de IgG. La diferencia de 162,20 Da entre las series 2 y 3 puede ser debida a dos proteoformas de la cadena pesada que se diferencian en el número de unidades de hexosa (MW promedio, 162,14 Da) en la cadena del hidrato de carbono. Estuvieron disponibles para ensayo de este paciente 25 muestras adicionales tomadas durante un periodo de 7 años. La FIG. 16 muestra el resultado usando espectrometría de masas para una muestra tomada después de que el paciente hubiera sido tratado para mieloma múltiple y se encontró que era negativa por PEL, IFE, y el inmunoensayo de FLC cuantitativa. Sin embargo, iones de carga múltiple de la cadena ligera son claramente evidentes en el espectro de masas mostrado en la FIG. 16A. Después de la conversión en masa molecular, se observa un pico distinto a 23.452,17 Da que se diferencia 0,47 Da en comparación con el valor calculado en el espectro de la muestra de diagnóstico inicial tomada durante 6 años antes. La Tabla 1 enumera un resumen de los resultados de monitorizar la proteína M en suero por PEL, IFE y EM de microCL-ESI-Q-TOF y muestra que la cadena ligera se observa en todas las fechas de muestreo, que incluye todas las fechas donde PEL y IFE fueron negativos. Por tanto, la masa molecular de la cadena ligera está de acuerdo con un valor promedio de 23.452,54 Da y una desviación estándar de 0,86 Da para los cálculos de masa molecular durante el periodo de muestra de 7 años. Se observó la cadena pesada en las muestras positivas por PEL e IFE, y en las muestras, los cálculos de la masa molecular fueron coherentes durante el periodo de 7 años. Esto

soporta la suposición de que la masa molecular de la proteína M es un marcador altamente sensible del clon de la célula plasmática. Además, se hizo un análisis de regresión lineal para evaluar la correlación en respuesta entre el valor del componente M y las áreas de pico de la deconvolución. La correlación para la cadena ligera fue $r^2 = 0,9455$, mientras que las dos proteoformas de la cadena pesada tuvieron $r^2 = 0,9205$ y $0,9222$, respectivamente.

5 Se realizaron experimentos adicionales usando muestras de orina y de suero emparejadas tomadas de un paciente con una gammapatía monoclonal conocida para determinar si la masa molecular de la cadena ligera monoclonal seguiría siendo constante después de ser eliminada a través del riñón en la orina. Se examinaron dos pacientes (una IgA kappa y una IgA lambda) que se había identificado previamente que tenían una gammapatía monoclonal. Sin embargo, las muestras analizadas por EM de microCL-ESI-Q-TOF fueron negativas por PEL e IFE para una
10 inmunoglobulina monoclonal en tanto suero como orina. Los hallazgos de los inventores mostraron que la masa molecular de la cadena ligera no cambió entre suero y orina dentro del error de masa esperado del experimento. Estos resultados refuerzan el principio de que la masa molecular sola se puede usar para monitorizar una inmunoglobulina monoclonal independientemente del tipo de muestra y que la EM de microCL-ESI-Q-TOF es un método para identificar una inmunoglobulina monoclonal en orina.

15 **Tabla 1. Comparación de los resultados de PEL e IFE de la proteína M con las áreas de pico y masas moleculares observadas para la proteína M por EM de microCL-ESI-Q-TOF^a**

fecha de muestreo	Componente M (g/dl)	IFE	cadena ligera		cadena pesada	
			área del pico	masa molecular (Da)	masa molecular (Da)	masa molecular (Da)
23/02/2005 ^b	4,35	pos	3.010.899	23.452,64	51.595,07	51.758,27
29/03/2006	0,26	pos	34.839	23.452,10		
24/04/2007	0	neg	9.301	23.451,78		
11/10/2007	0	neg	11.496	23.452,31		
23/04/2008	0,54	pos	152.021	23.452,20	51.595,46	51.757,84
7/05/2009	0,43	pos	322.375	23.452,34	51.596,66	51.758,52
27/07/2010	3,24	pos	3.121.072	23.452,50	51.596,56	51.758,91
22/08/2011 ^c	0	neg	2112	23.452,17		
5/03/2012	0,79	pos	600.281	23.452,50	51.596,44	51.758,74

^a Los resultados son de muestras de suero obtenidas de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple tomadas durante un periodo de 7 años. ^b Se usó la fecha de la muestra 23/02/2005 en la Figura 2. ^c Se usó la fecha de la muestra 22/08/2011 en la Figura 3.

Ejemplo 6. Identificación del isotipo de la cadena ligera por EM de arriba hacia abajo

20 Se hizo EM de arriba hacia abajo en un ión de carga múltiple de la cadena ligera de adalimumab, que tenía un isotipo kappa. Los resultados de un análisis de arriba hacia abajo usando adalimumab enriquecido en suero normal se muestran en la FIG. 17. La FIG. 17A muestra los iones de carga múltiple de la cadena ligera kappa junto con una
25 flecha hacia el espectro de masas del ión del fragmento producido a partir del precursor a $m/z = 1233$ mostrado en la FIG. 17B. Los iones de fragmentos se marcan con sus masas monoisotópicas, que coinciden estrechamente con las masas monoisotópicas para iones y de la región constante de la cadena ligera kappa. Para determinar si esto seguiría siendo cierto para otros pacientes con cadenas ligeras kappa, se analizó un conjunto de 20 pacientes con IgG kappa por EM de arriba hacia abajo en las cadenas ligeras. Se generó el espectro de masas de iones de fragmentos para cada paciente a partir de un ión precursor de carga múltiple diferente debido a una secuencia de aminoácidos de la
30 región variable diferente del individuo. Sin embargo, independientemente del ión precursor específico del paciente, se identificaron los mismos iones y que coincidían con la región constante kappa. 20 de los pacientes probados mostraron los mismos iones específicos del fragmento kappa. También se realizaron experimentos de EM CL-ESI-Q-TOF en una cadena ligera lambda comercialmente disponible. El espectro de masas en la parte superior de la FIG. 18 muestra la cadena ligera lambda de carga múltiple con el espectro del ión del fragmento en la parte inferior de la FIG. 18. La comparación inicial entre las masas monoisotópicas para los iones de fragmentos observados y los posibles iones y
35 de la región constante lambda de 5' no produjeron coincidencias. Se usó el motor de búsqueda de la base de datos de proteínas de EM de arriba hacia abajo ProSight para buscar los iones de fragmentos para encontrar una posible

coincidencia dentro de la región constante. La tabla a la derecha de la FIG. 18 enumera la marca de secuencia de la región constante de la cadena ligera lambda encontrada por ProSight junto con las masas monoisotópicas para iones b de la secuencia. Los iones de fragmentos que coinciden con las masas monoisotópicas en la tabla se marcan en el espectro. Aunque la intensidad de las series de iones b para lambda puede ser menos pronunciada que la observada para kappa, los iones de fragmentos observados son únicos para el isotipo de la cadena ligera lambda. Se analizó un conjunto de 20 pacientes positivos para una cadena ligera lambda de IgG por fragmento de EM de arriba hacia abajo, y se observaron los iones b que coinciden con la porción del extremo N de la región constante lambda en cada paciente. Además, se analizaron muestras de orina positivas por IFE por EM de arriba hacia abajo y se encontró que las muestras positivas para lambda tenían iones específicos de fragmentos lambda y las muestras positivas para kappa tenían iones específicos para fragmentos kappa. Estos hallazgos nos condujeron a llegar a la conclusión de que la EM de arriba hacia abajo se podría usar para isotipificar cadenas ligeras kappa y lambda.

Los resultados mostrados aquí proporcionan la evidencia empírica para confirmar la utilidad de la espectrometría de masas como una herramienta para monitorizar una proteína M en pacientes con una gammapatía monoclonal. La masa molecular de la inmunoglobulina monoclonal, si es la cadena ligera, cadena pesada, o la molécula intacta, representa un marcador sensible y específico de clones de células plasmáticas que secretan inmunoglobulina. La metodología puede identificar fácilmente una inmunoglobulina monoclonal presente por encima del fondo policlonal, proporcionando información excepcionalmente detallada sobre el estado de los clones de células plasmáticas específicas de paciente. En el futuro, la espectrometría de masas podría desempeñar una función importante en la cuantificación y monitorización de inmunoglobulinas en la salud y enfermedad humanas.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de determinación de si una inmunoglobulina de la cadena ligera está presente o no como uno o más picos que tienen una intensidad iónica superior al nivel de fondo en una muestra, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal expresada en exceso, comprendiendo el método:
 - 5 a. aislar inmunoglobulinas totales de la muestra;
 - b. tratar las inmunoglobulinas totales con proteasas para generar Fab de inmunoglobulinas; y
 - c. someter los Fab de inmunoglobulina a una técnica de espectrometría de masas para determinar la presencia o ausencia de un pico de proteína M.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar la presencia o ausencia de gammapatía monoclonal en la muestra basándose en la presencia o ausencia de un pico de proteína M en el espectro de masas.
3. Un método *in vitro* de diagnóstico de gammapatía monoclonal en un sujeto, comprendiendo el método:
 - a. aislar inmunoglobulinas totales de una muestra del sujeto;
 - b. tratar las inmunoglobulinas totales con proteasas para generar Fab de inmunoglobulinas;
 - 15 c. someter los Fab de inmunoglobulinas a una técnica de espectrometría de masas para determinar la presencia o ausencia de un pico de proteína M; y
 - d. determinar si el sujeto tiene o no gammapatía monoclonal basándose en la presencia o ausencia de un pico de proteína M.
4. Un método *in vitro* de monitorización de un tratamiento de gammapatía monoclonal en un sujeto, comprendiendo el método:
 - 20 a. aislar inmunoglobulinas totales de una primera muestra del sujeto antes el tratamiento y una segunda muestra del sujeto durante o después del tratamiento;
 - b. tratar las inmunoglobulinas totales con proteasas para generar una primera y segunda muestras de Fab;
 - c. someter la primera y la segunda muestras de Fab a una técnica de espectrometría de masas para determinar un primer nivel de una inmunoglobulina en la primera muestra de Fab, y un segundo nivel de la inmunoglobulina en la segunda muestra de Fab; y
 - 25 d. comparar el primer nivel y el segundo nivel.
5. El método de las reivindicaciones 1-4, en donde los Fab se desacoplan antes de someterse a la técnica de espectrometría de masas.
6. El método de las reivindicaciones 1-5, en donde se cuantifica el pico de proteína M o inmunoglobulina identificada por la técnica de espectrometría de masas.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la técnica de espectrometría de masas comprende una cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la técnica de espectrometría de masas comprende una desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas (EM MALDI).
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la muestra es una muestra de sangre completa, suero, plasma u orina, o un reactivo artificial.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde aislar inmunoglobulinas totales de la muestra comprende la purificación por fraccionamiento basado en un producto químico o por purificación por afinidad.
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además cribar la muestra por electroforesis.

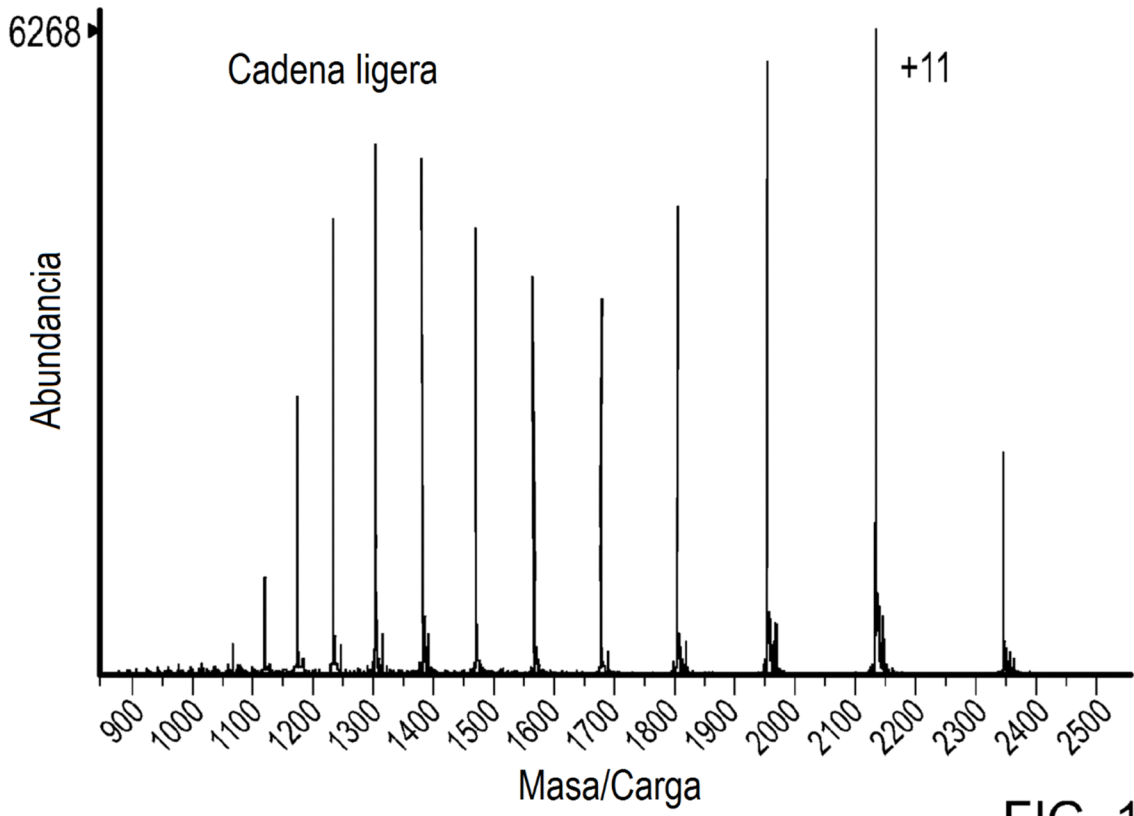


FIG. 1A

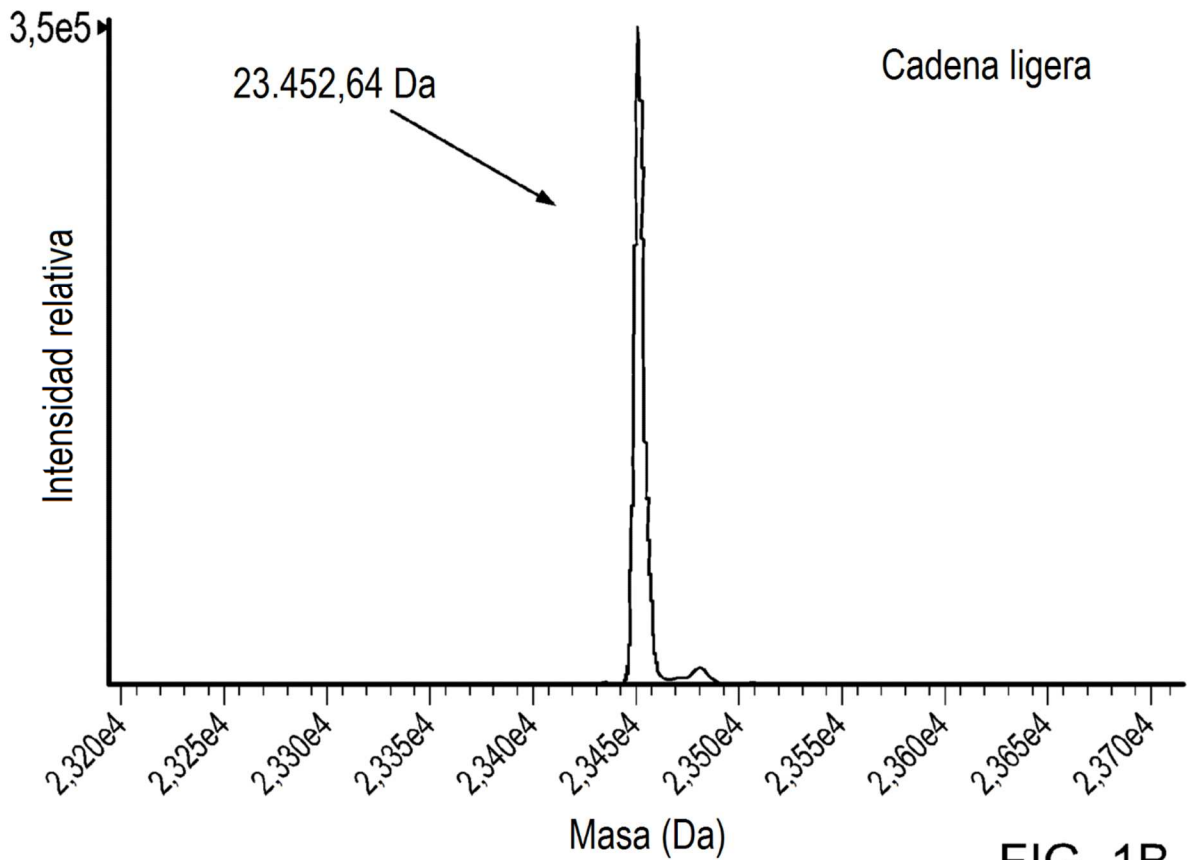


FIG. 1B

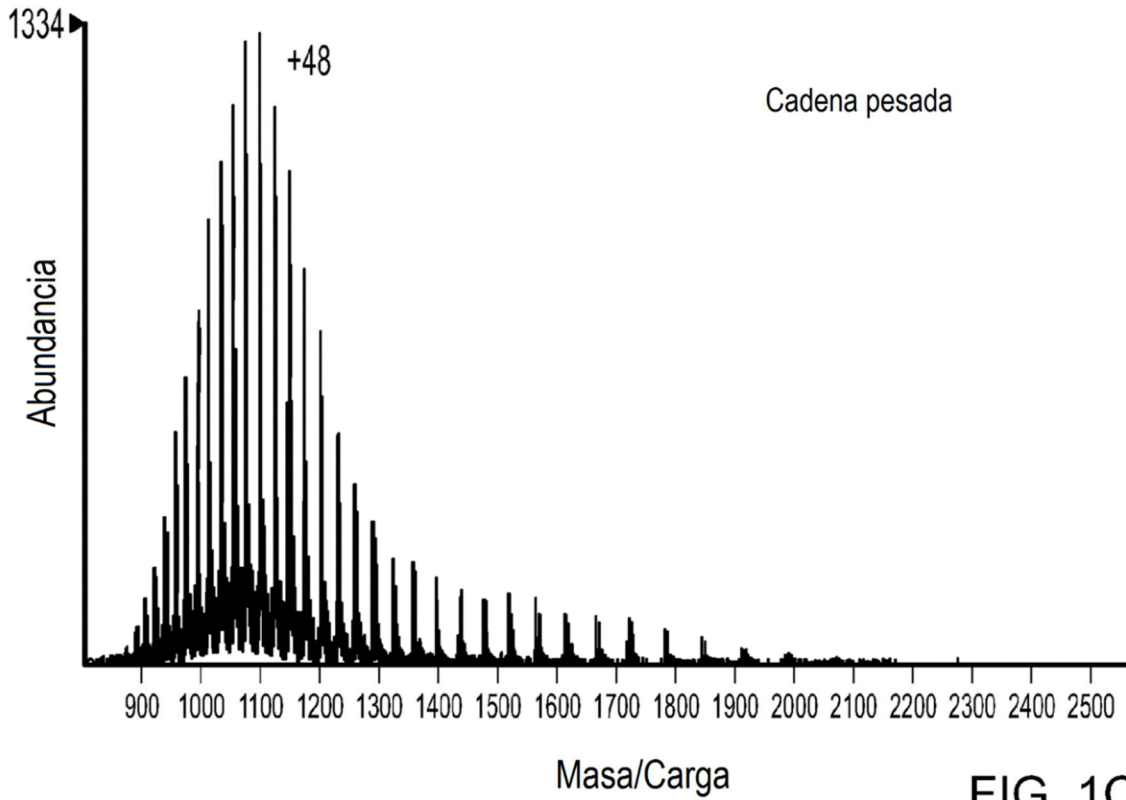


FIG. 1C

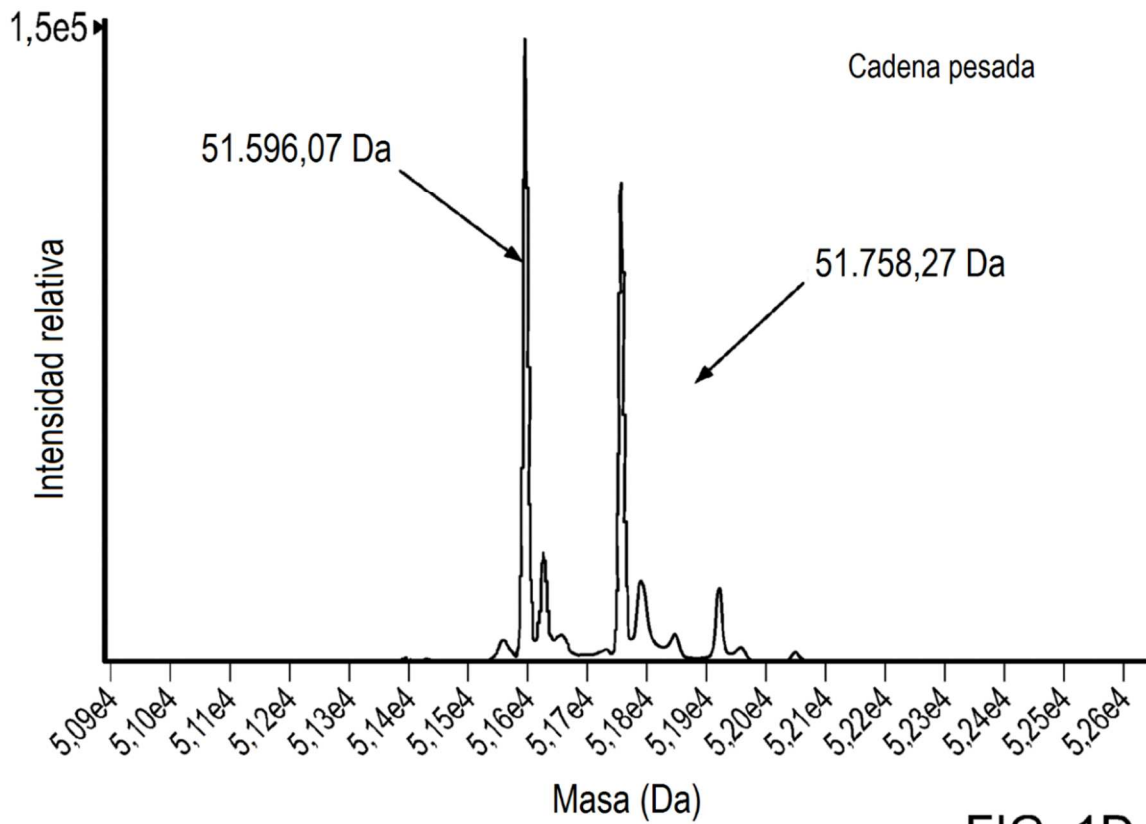
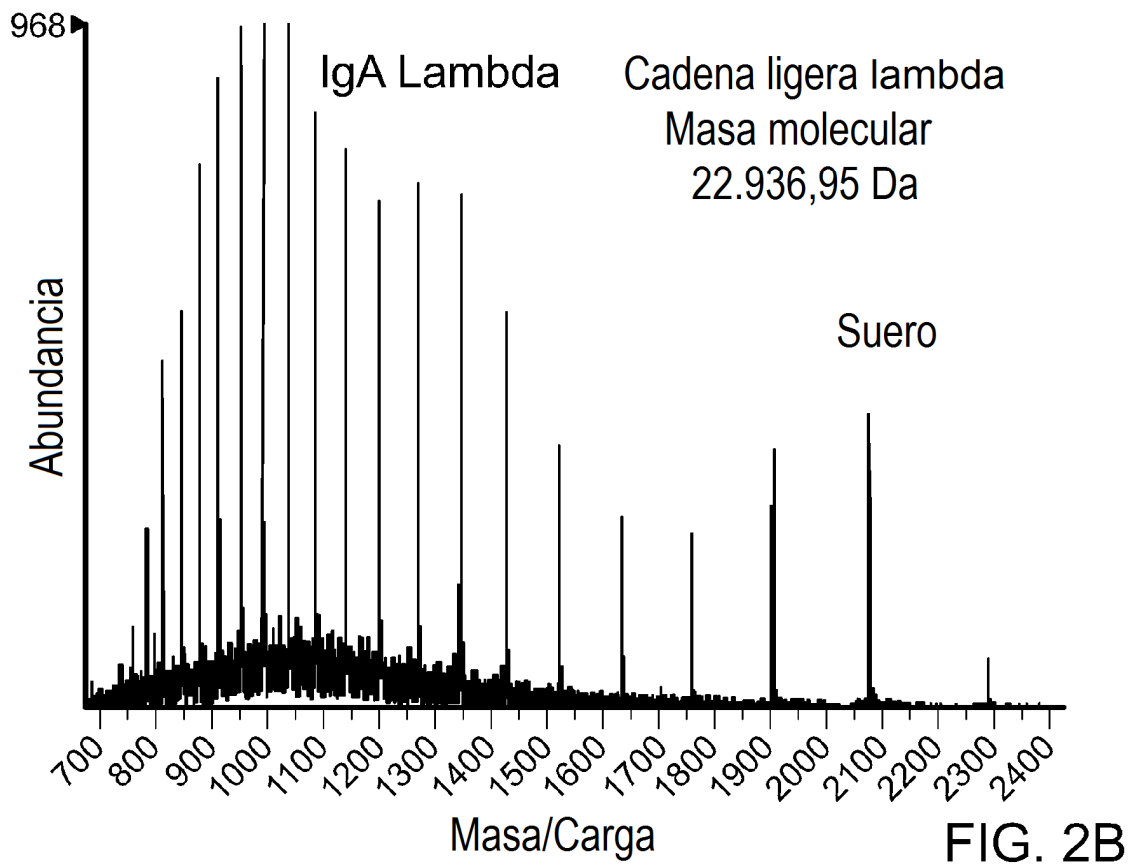
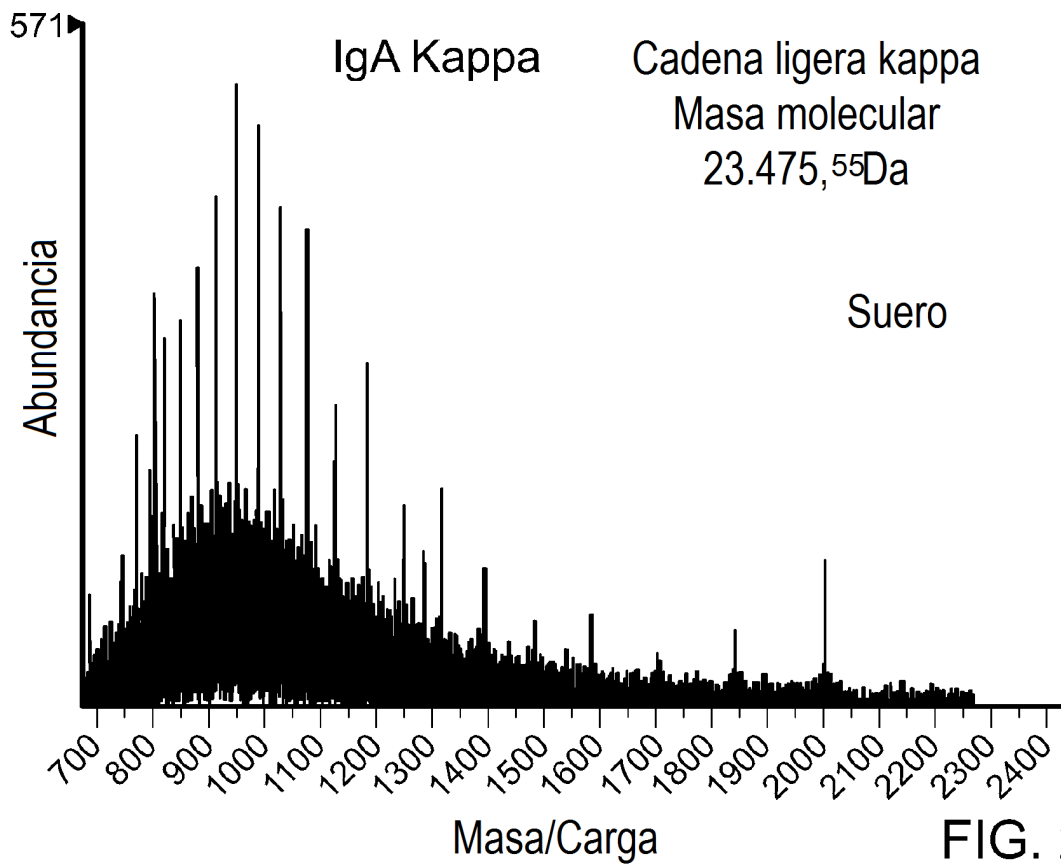
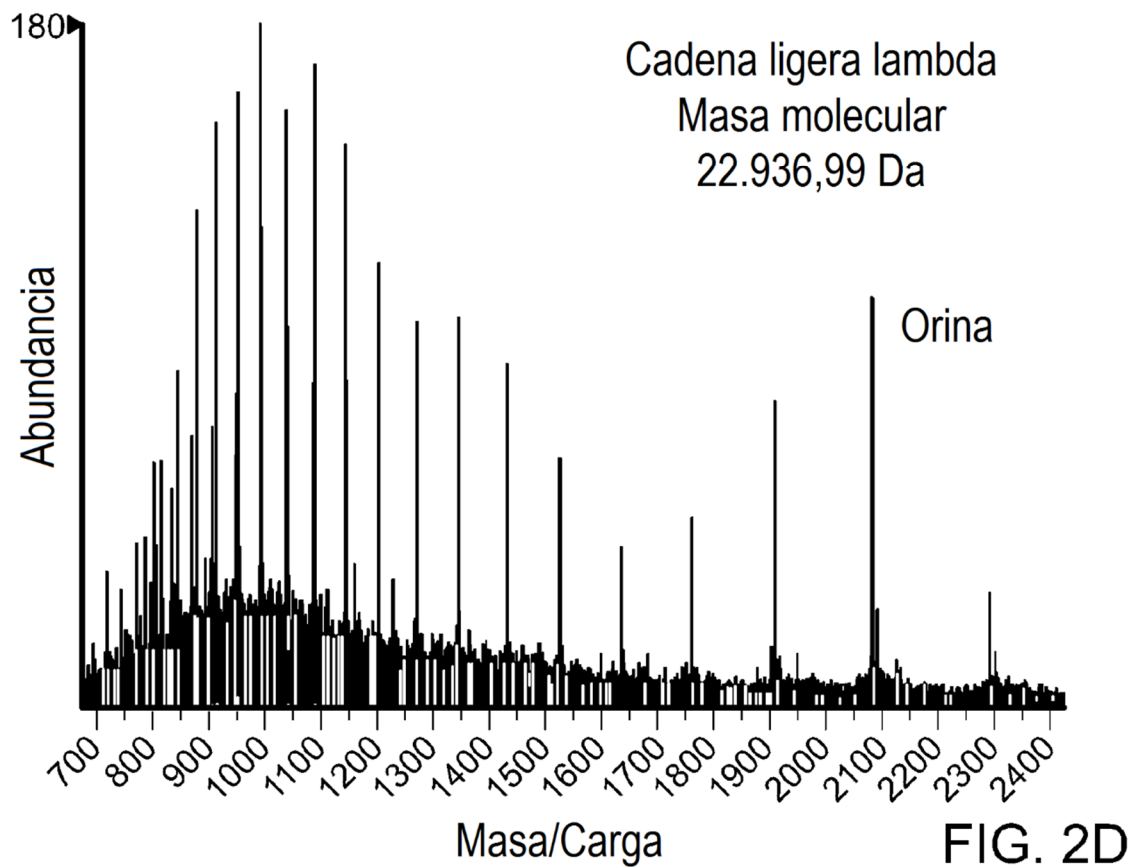
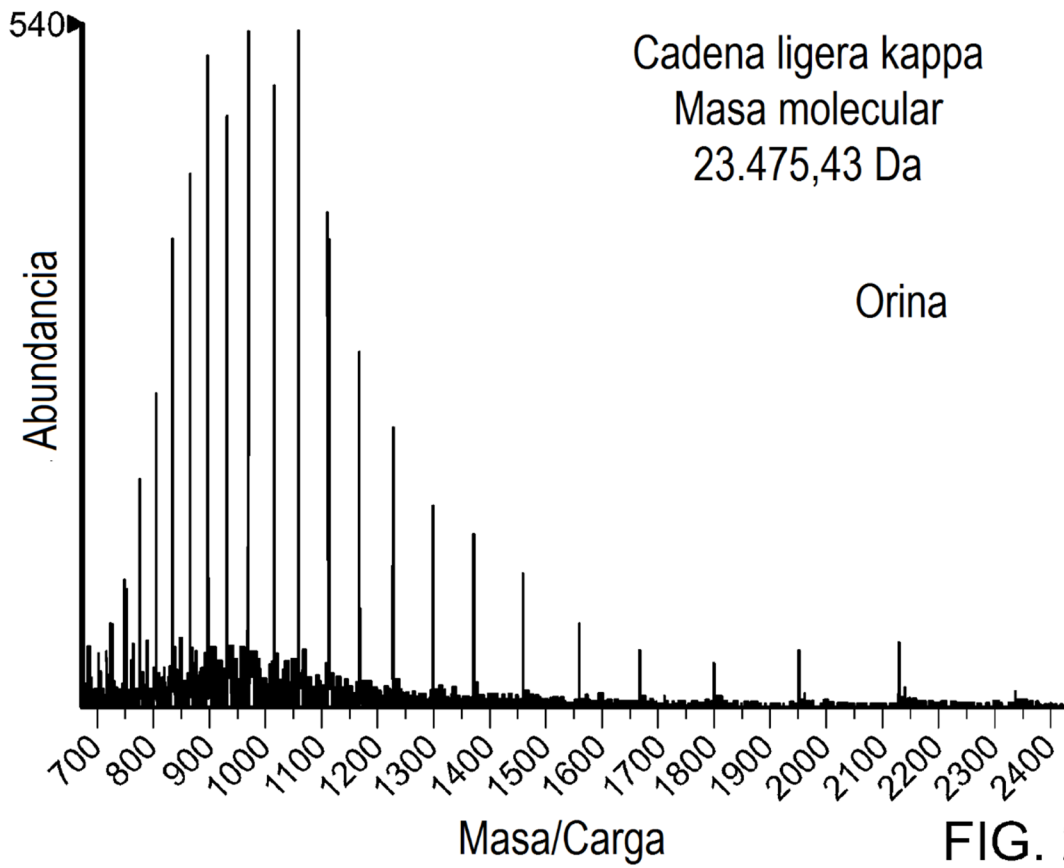


FIG. 1D





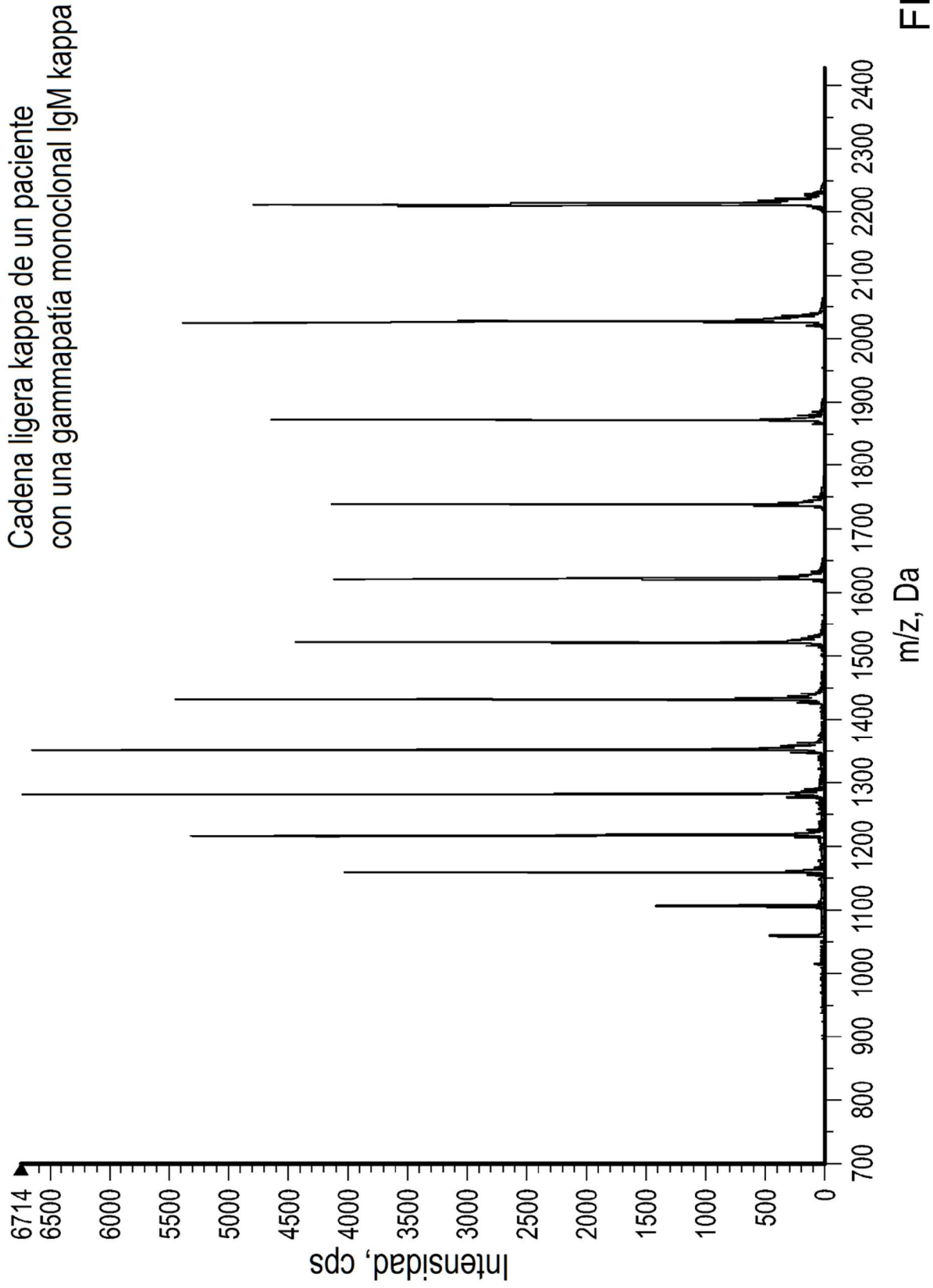


FIG. 3

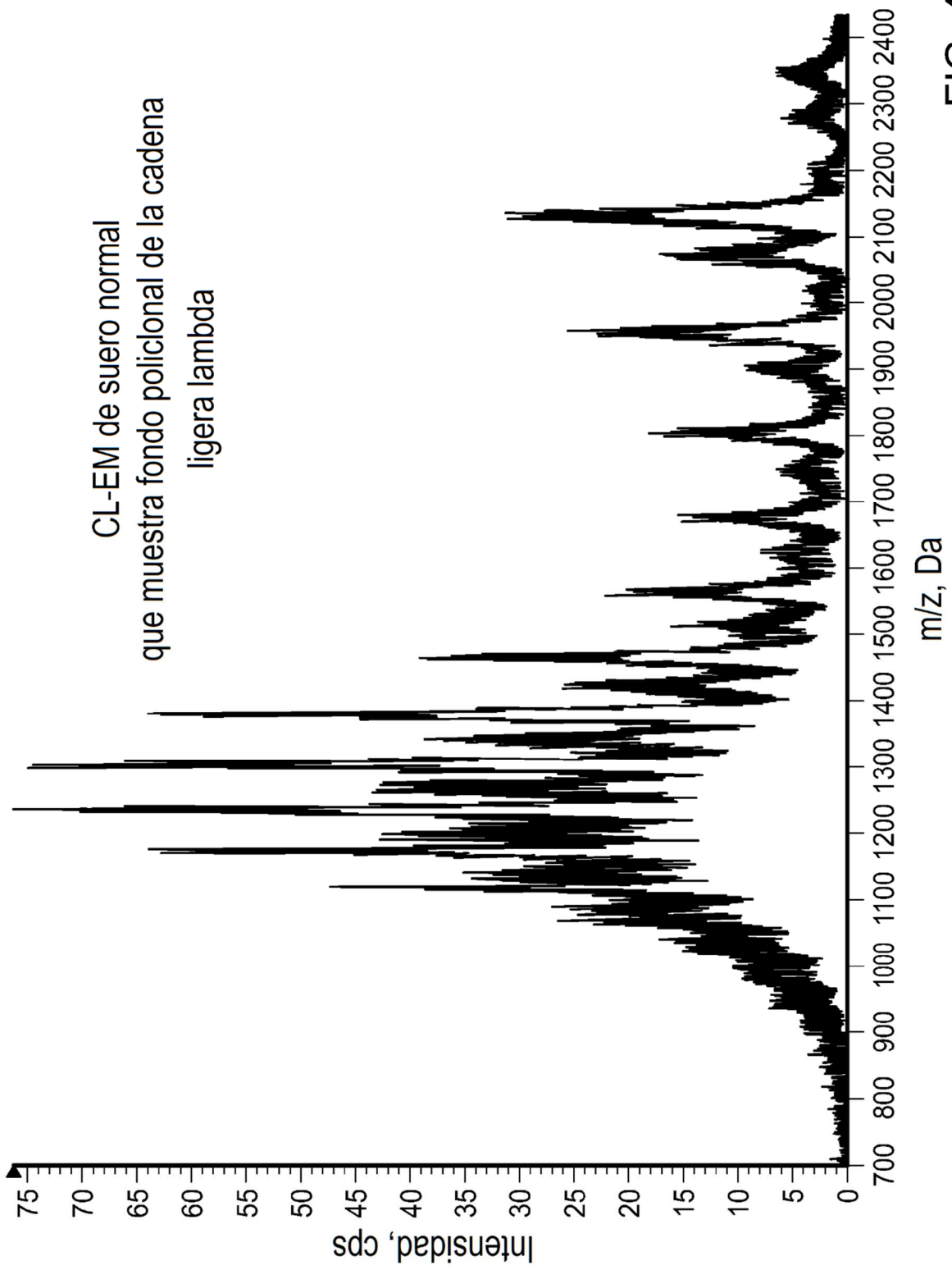


FIG. 4

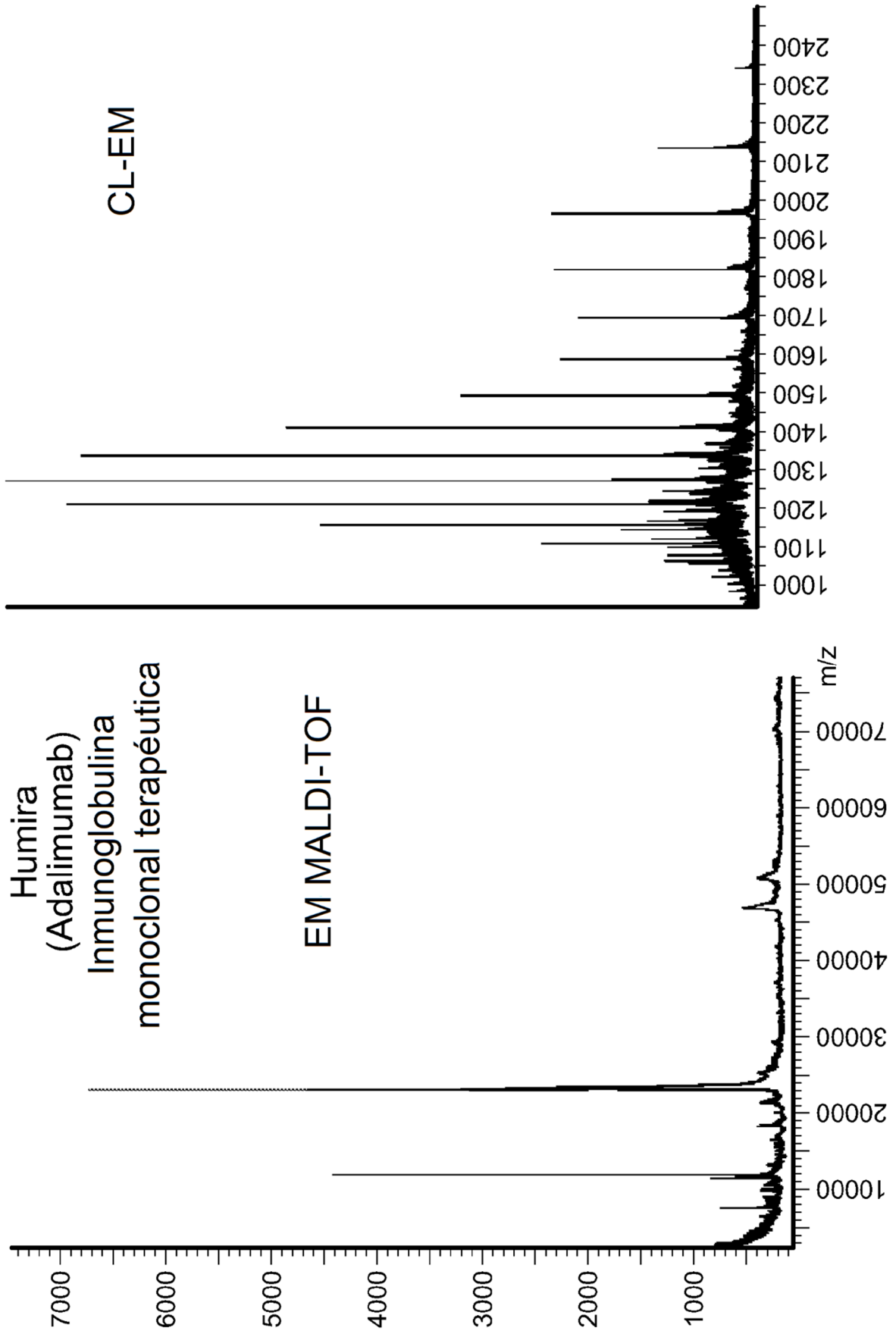


FIG. 5

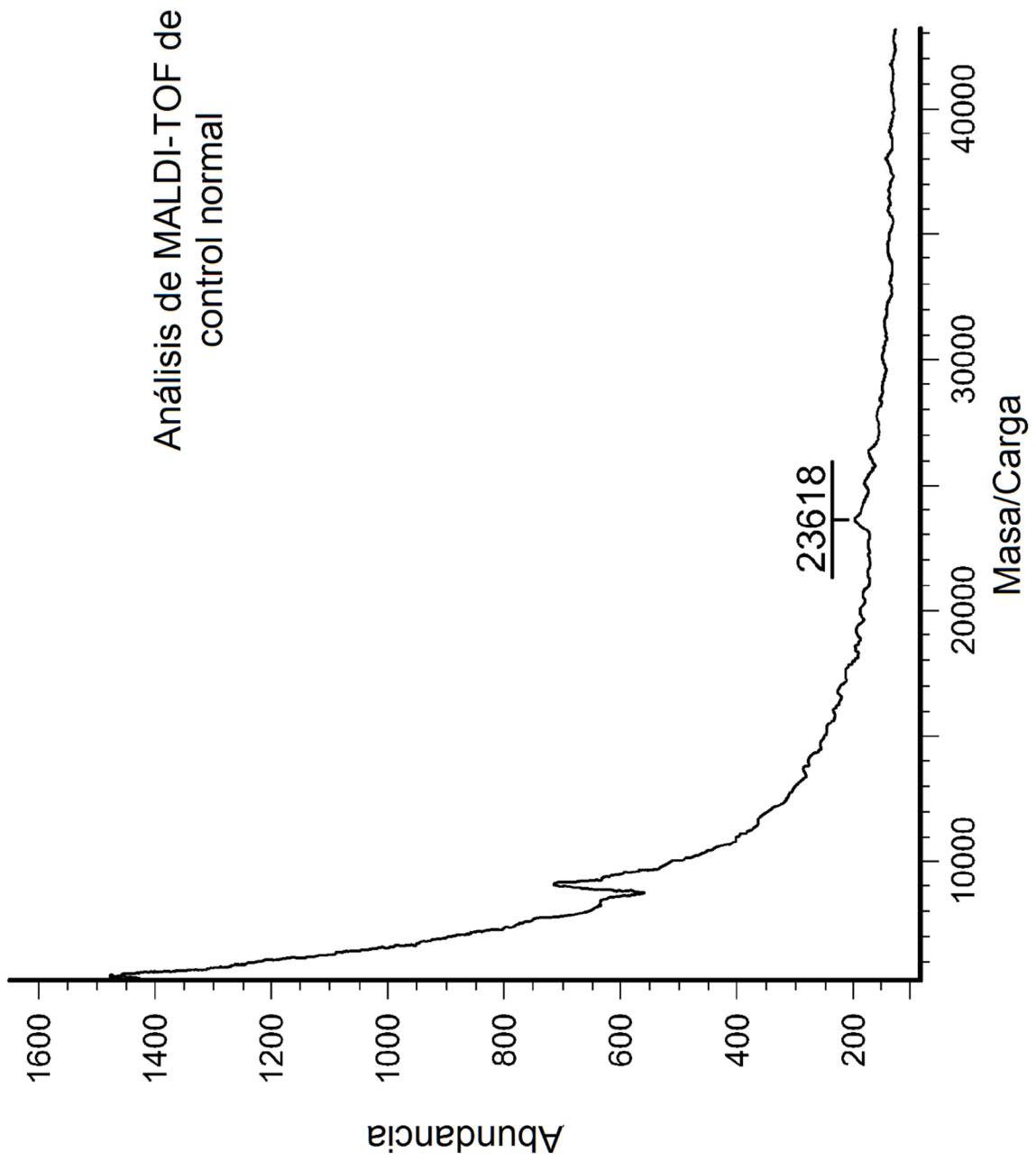


FIG. 6

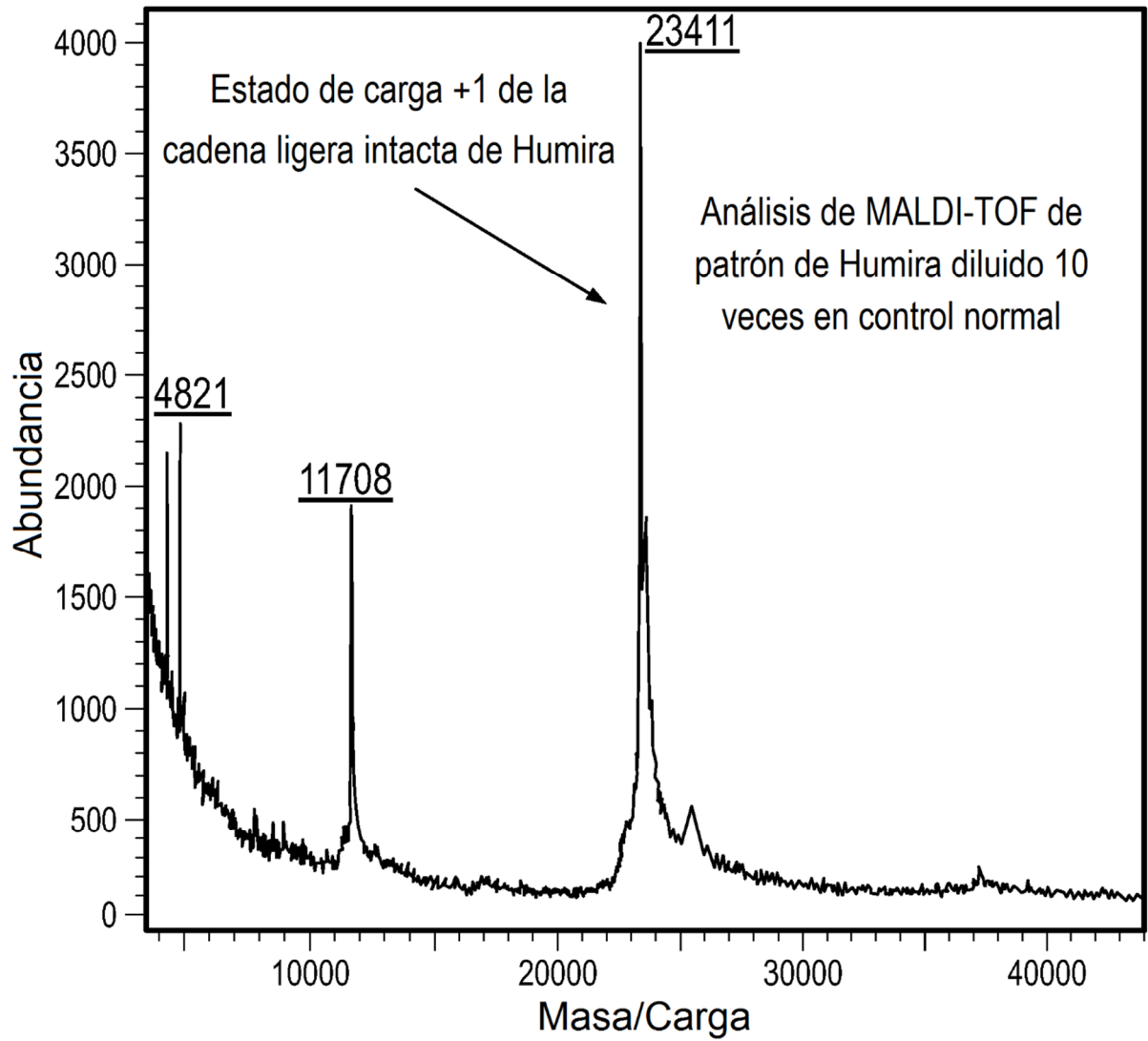


FIG. 7

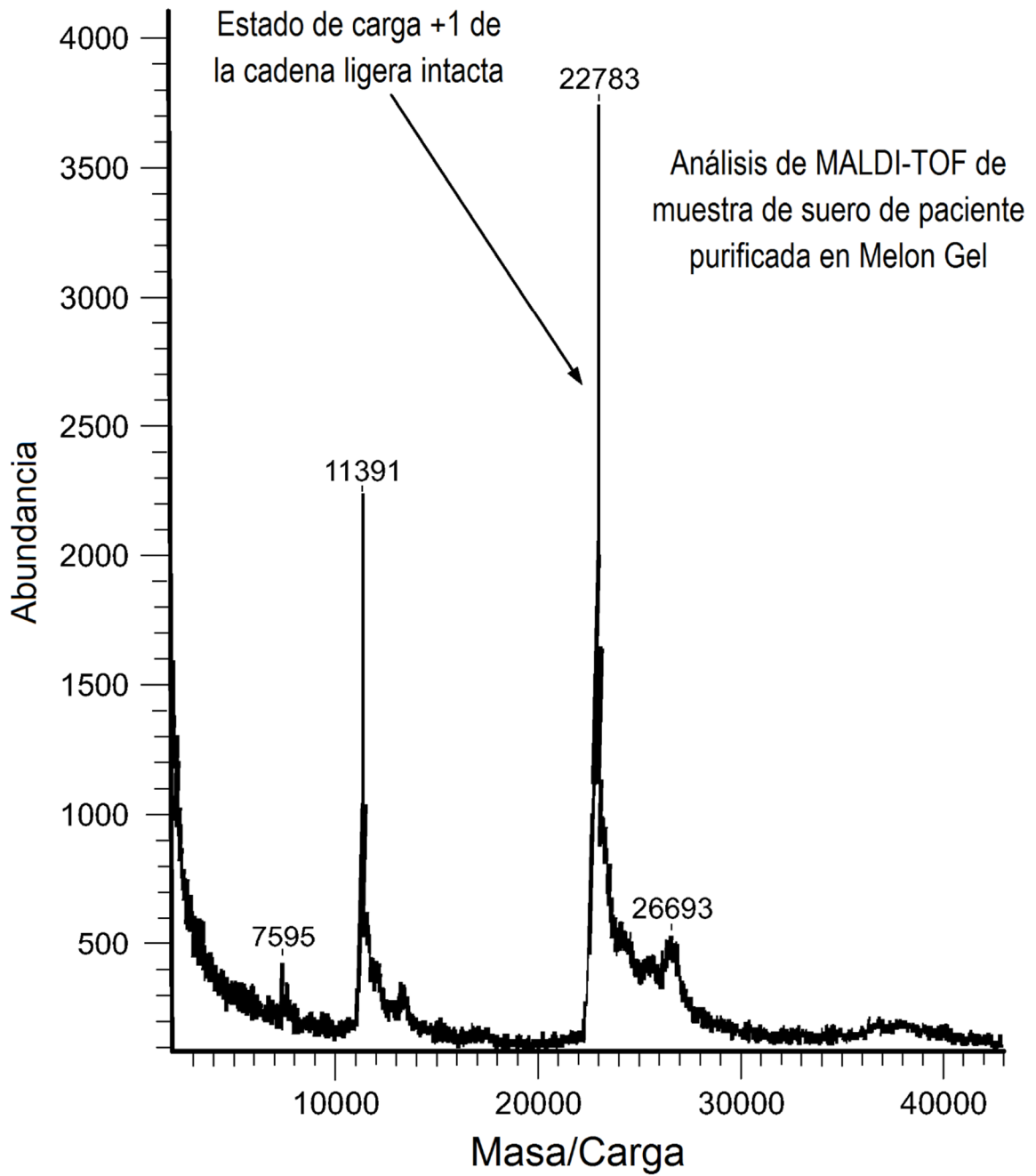


FIG. 8

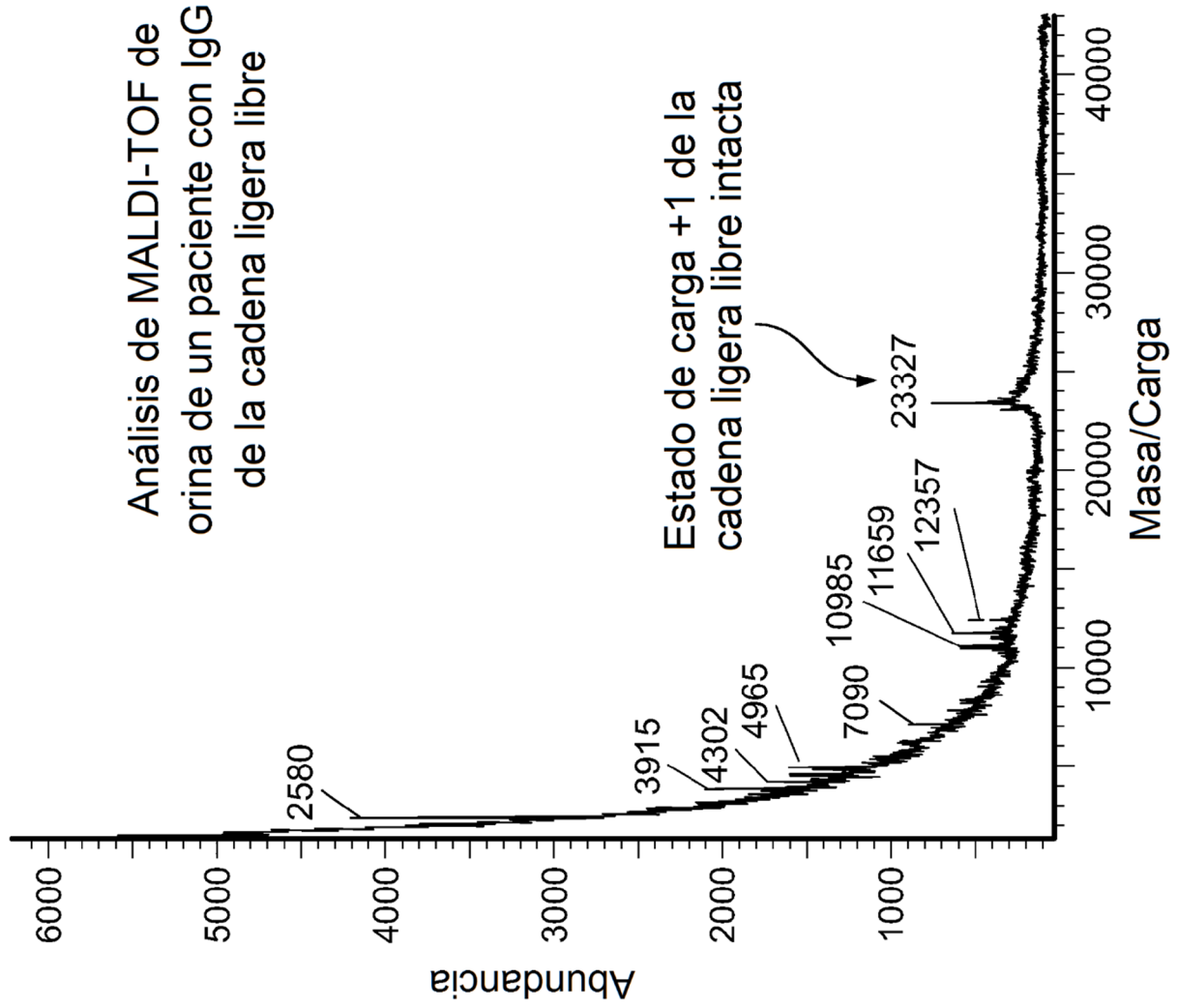


FIG. 9

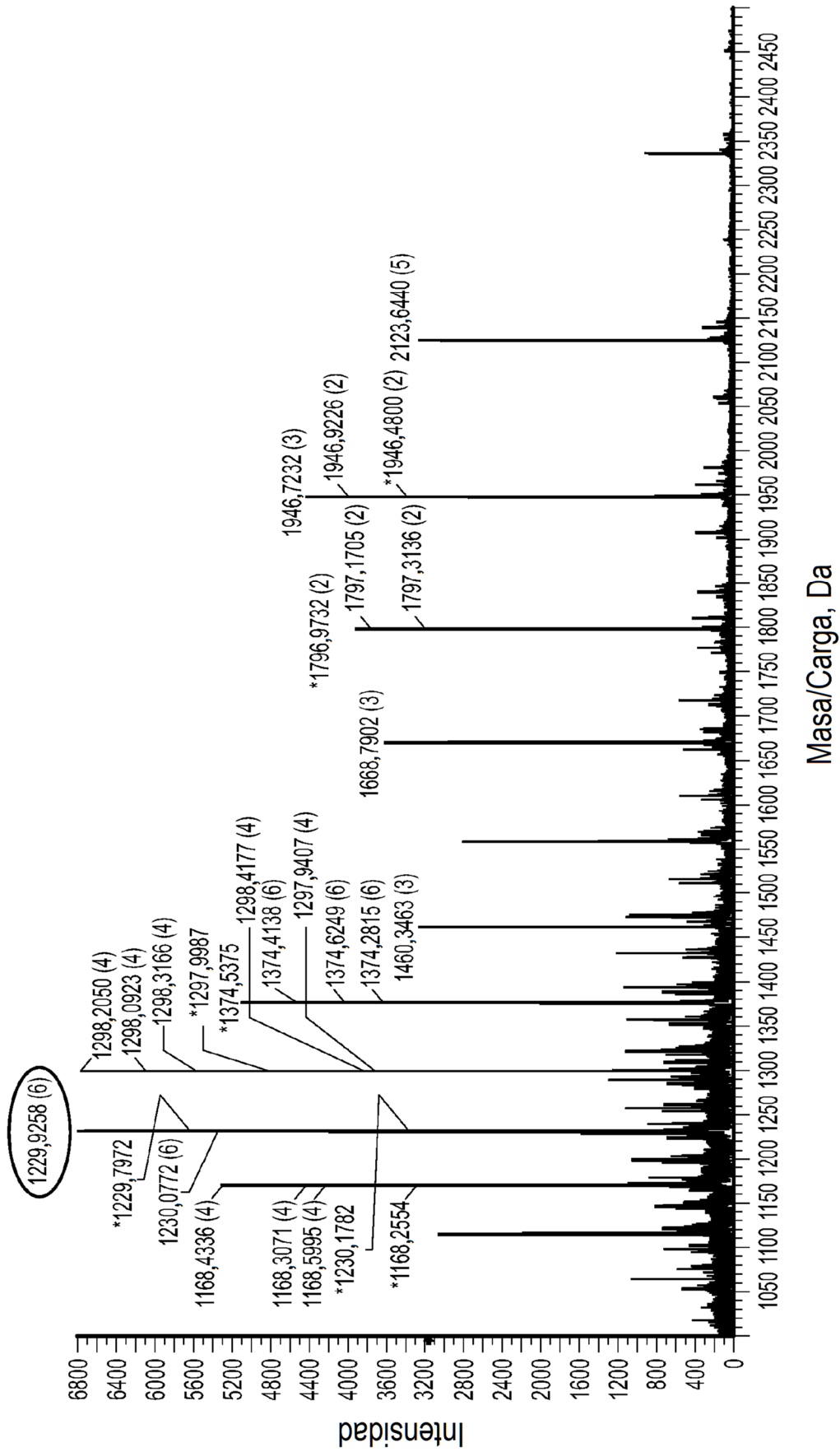
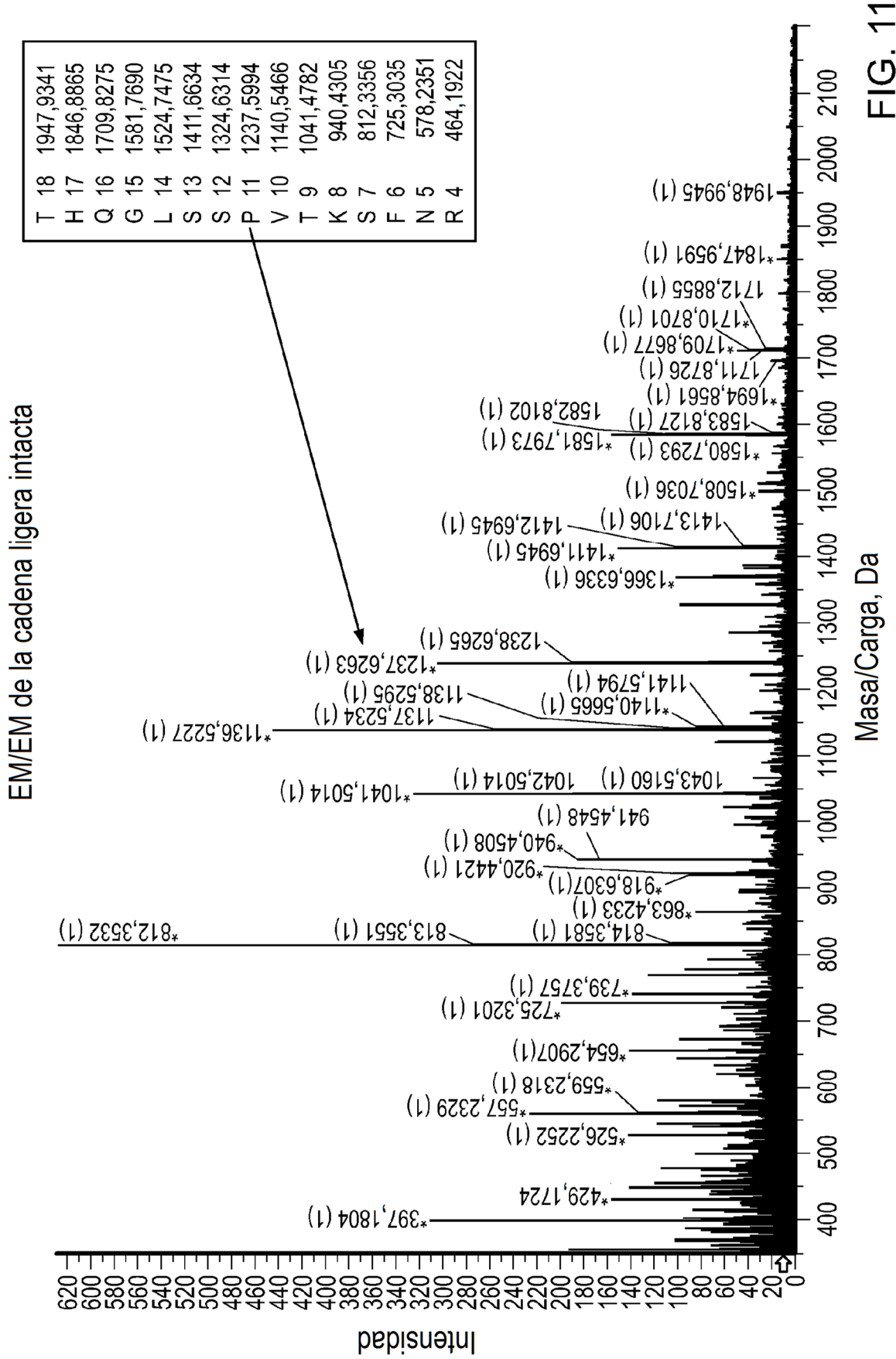
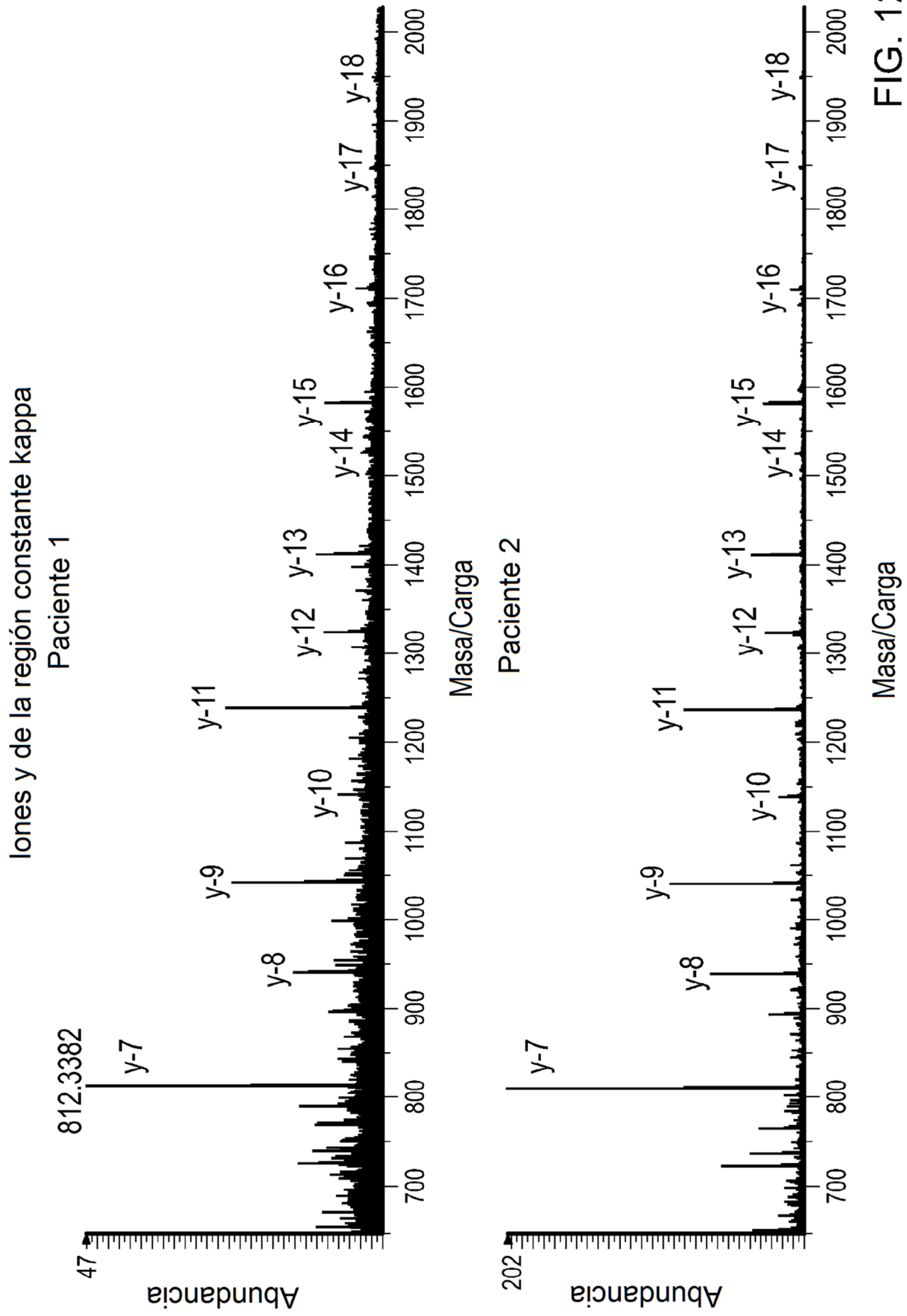


FIG. 10





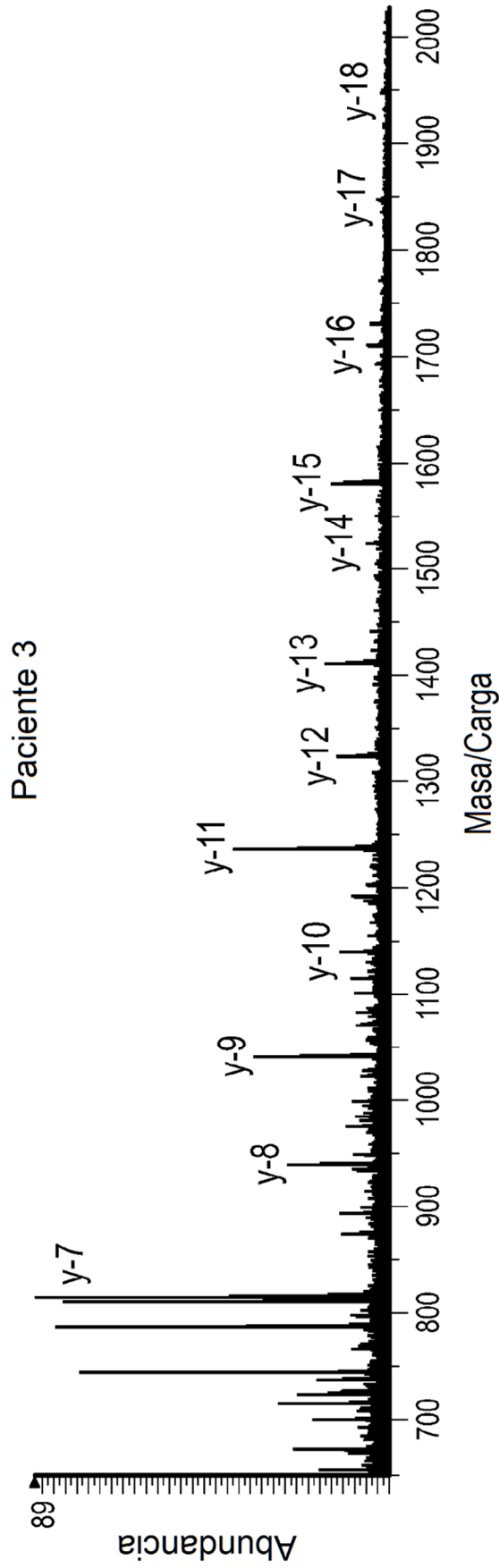
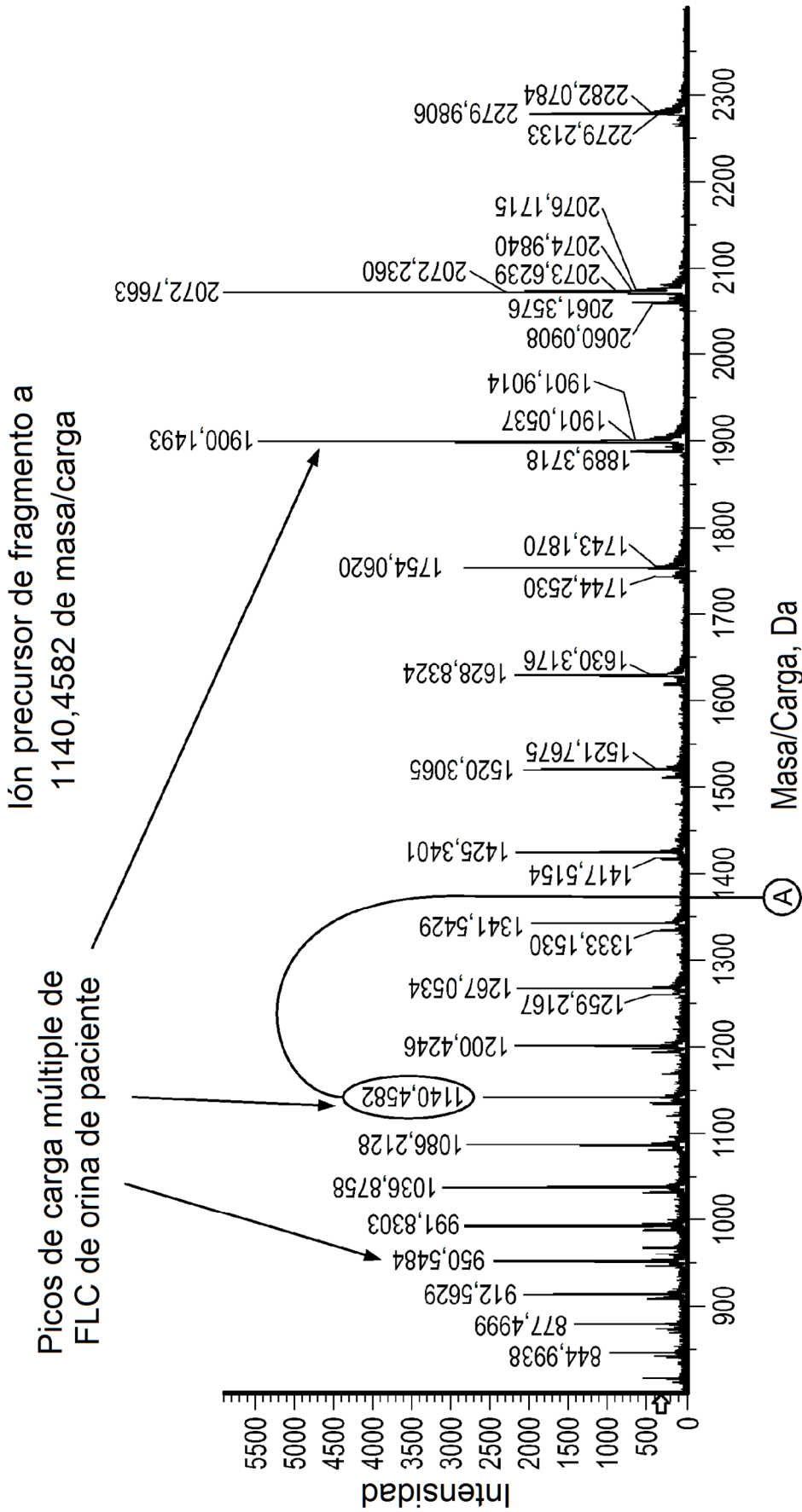


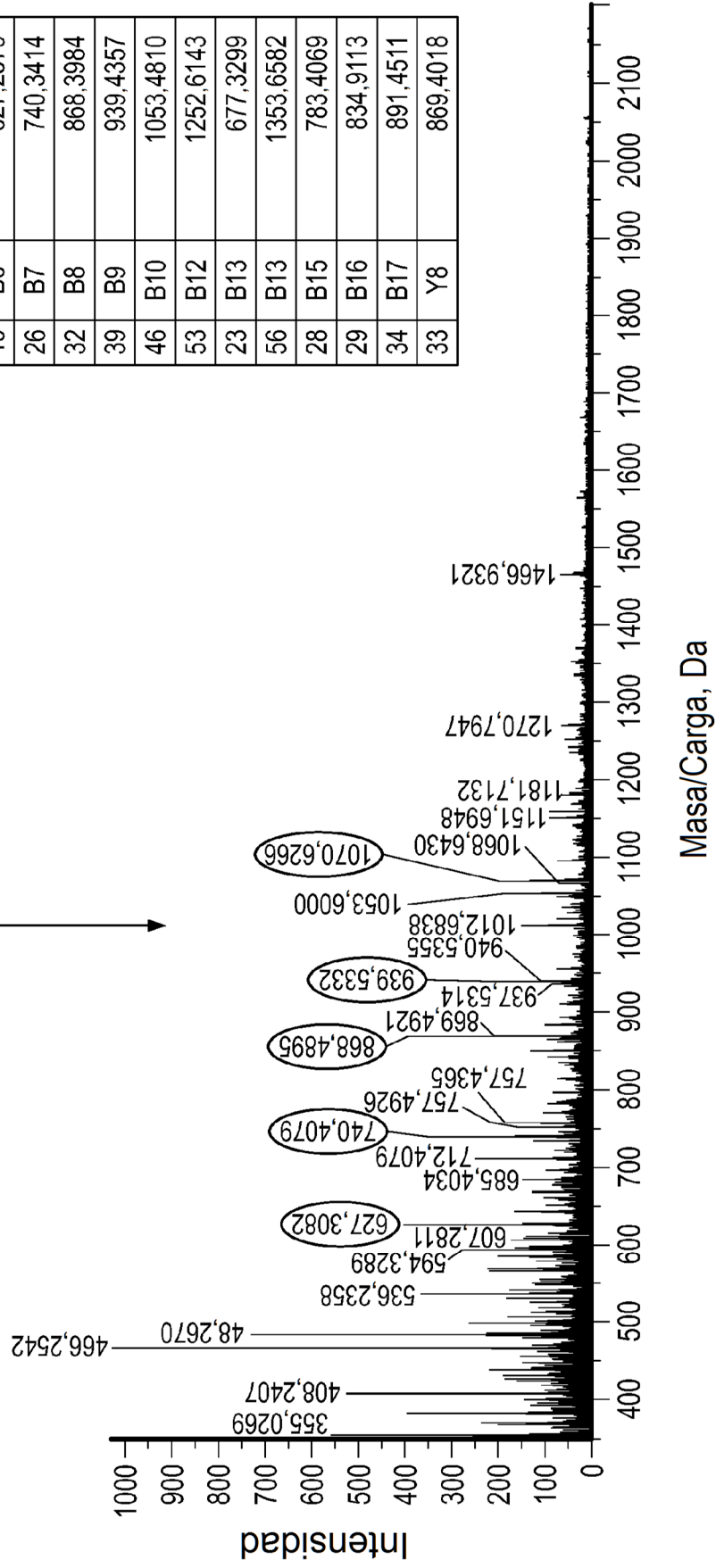
FIG. 12 (Cont.)



(A)

Iones del fragmento coinciden con la parte de la región constante lambda: El paciente tiene FLC lambda

ID	Nombre	m/z Monoisotópica
19	B6	627,2579
26	B7	740,3414
32	B8	868,3984
39	B9	939,4357
46	B10	1053,4810
53	B12	1252,6143
23	B13	677,3299
56	B13	1353,6582
28	B15	783,4069
29	B16	834,9113
34	B17	891,4511
33	Y8	869,4018



Masa/Carga, Da
 FIG. 13(Cont.)

Picos de carga múltiple de
FLC de orina de paciente

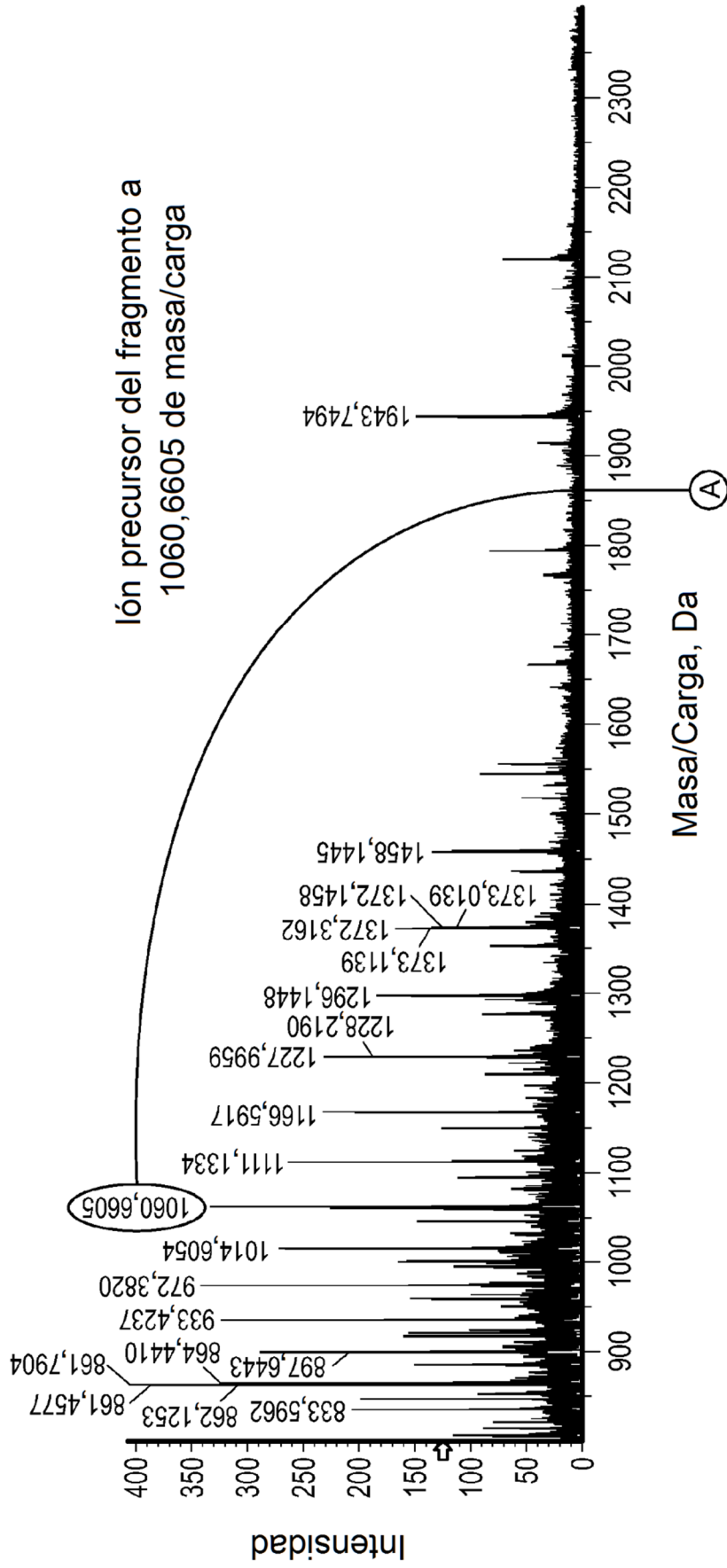


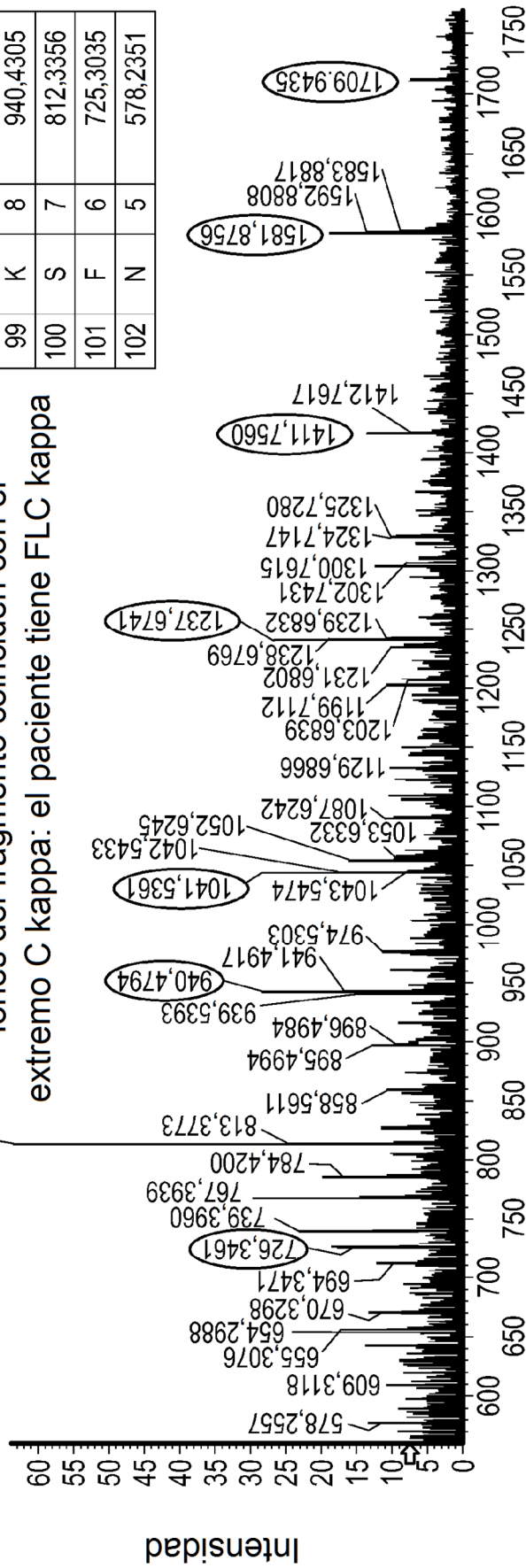
FIG. 14

91	Q	16	1709,8275
92	G	15	1581,7690
93	L	14	1524,7475
94	S	13	1411,6634
95	S	12	1324,6314
96	P	11	1237,5994
97	V	10	1140,5466
98	T	9	1041,4782
99	K	8	940,4305
100	S	7	812,3356
101	F	6	725,3035
102	N	5	578,2351

(A) →

Iones del fragmento coinciden con el extremo C kappa: el paciente tiene FLC kappa

(812,3746)



Masa/Carga, Da

FIG. 14(Cont.)

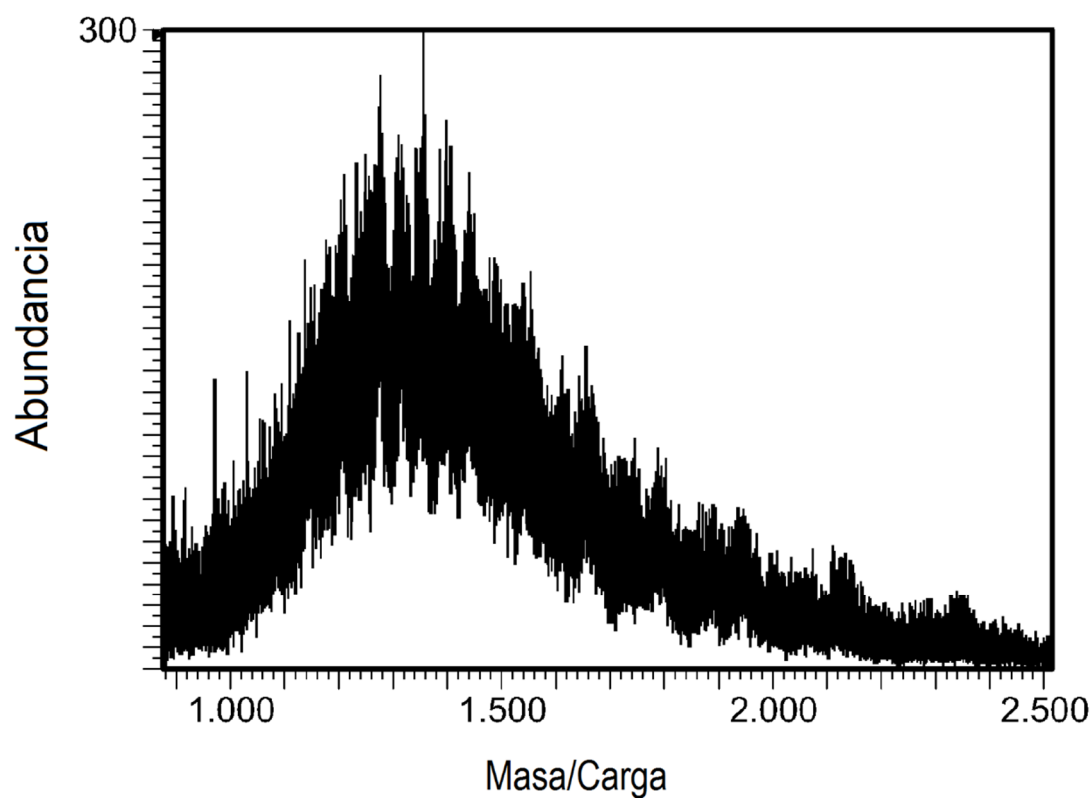


FIG. 15A

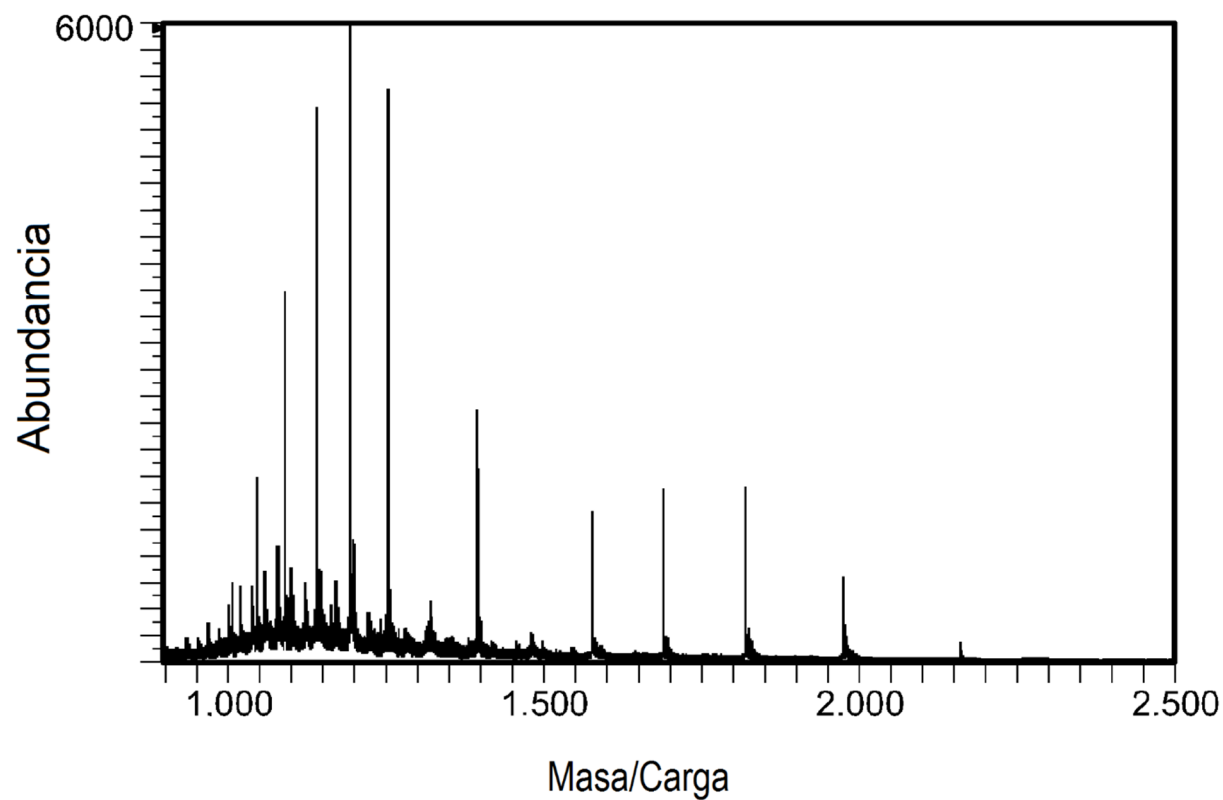


FIG. 15B

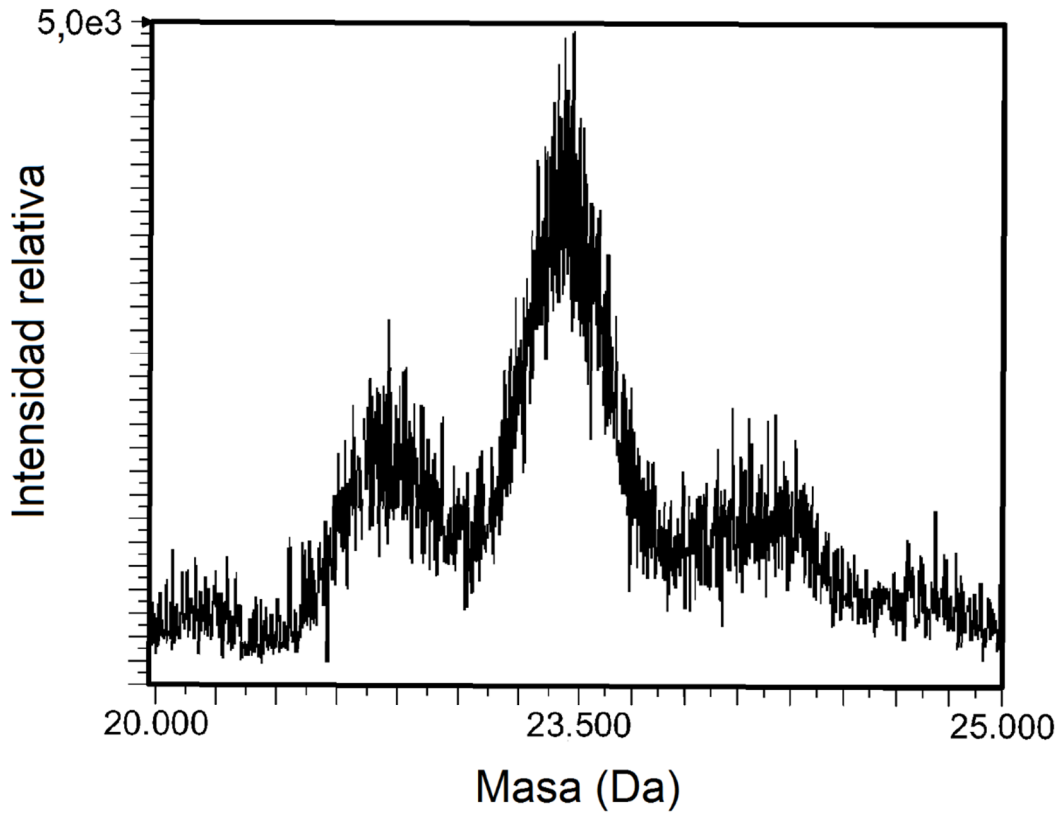


FIG. 15C

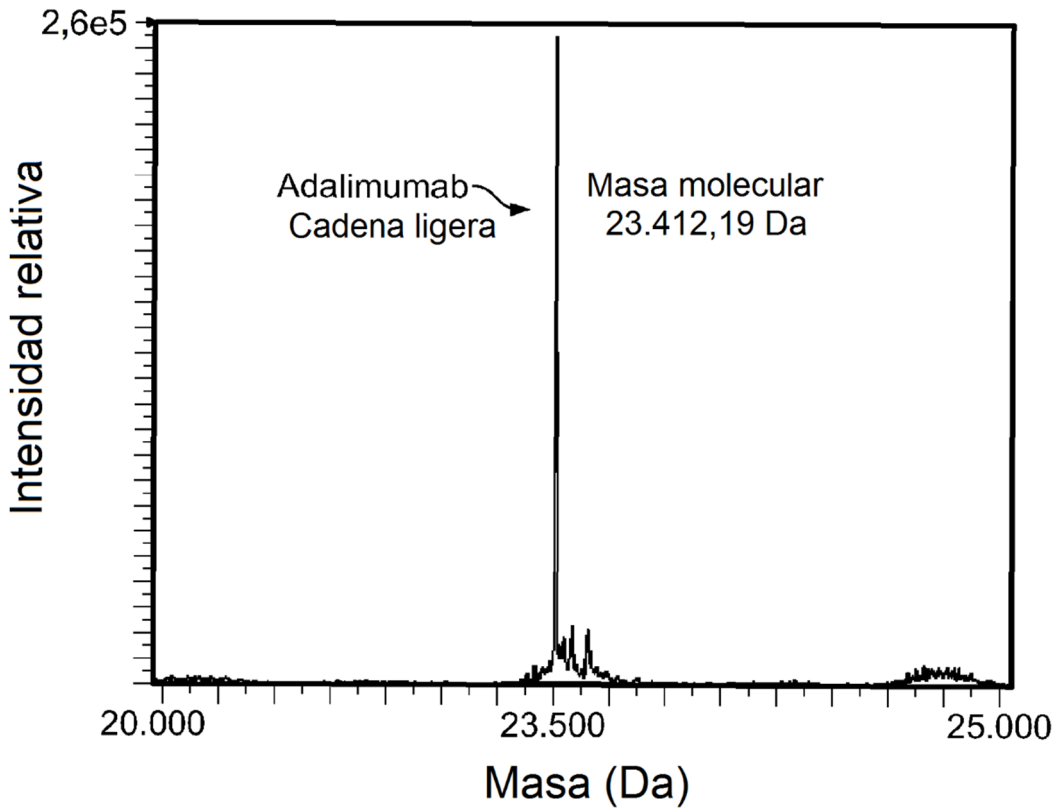


FIG. 15D

Cadena ligera

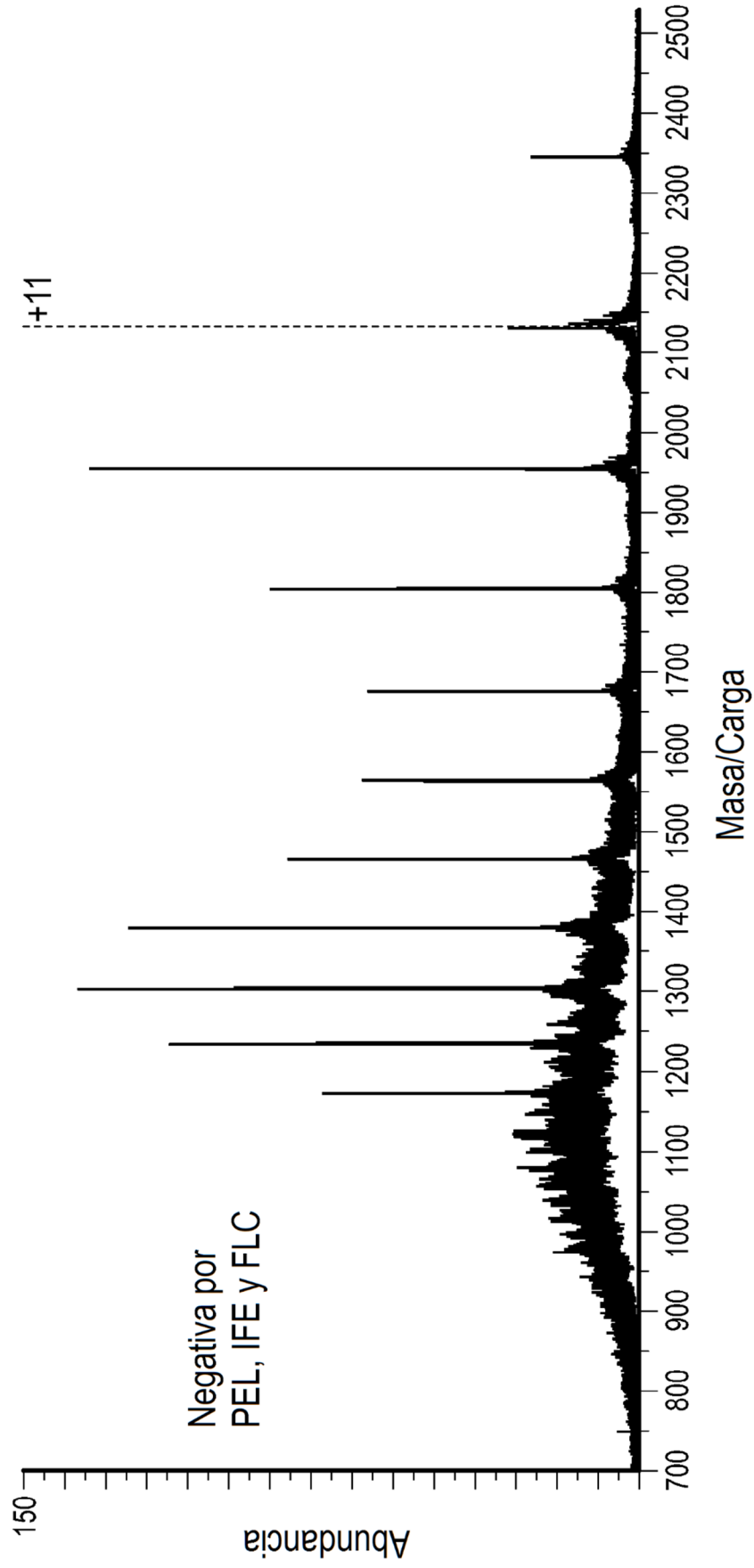


FIG. 16A

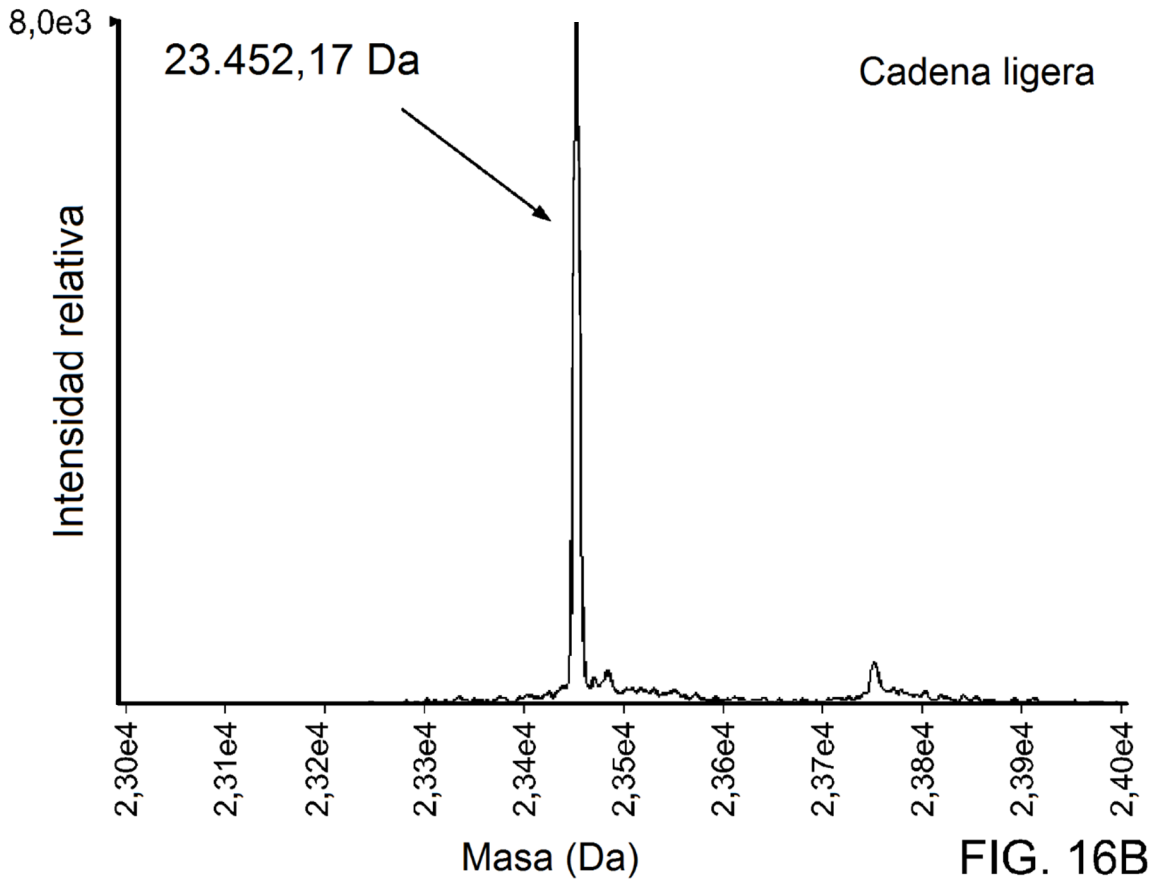


FIG. 16B

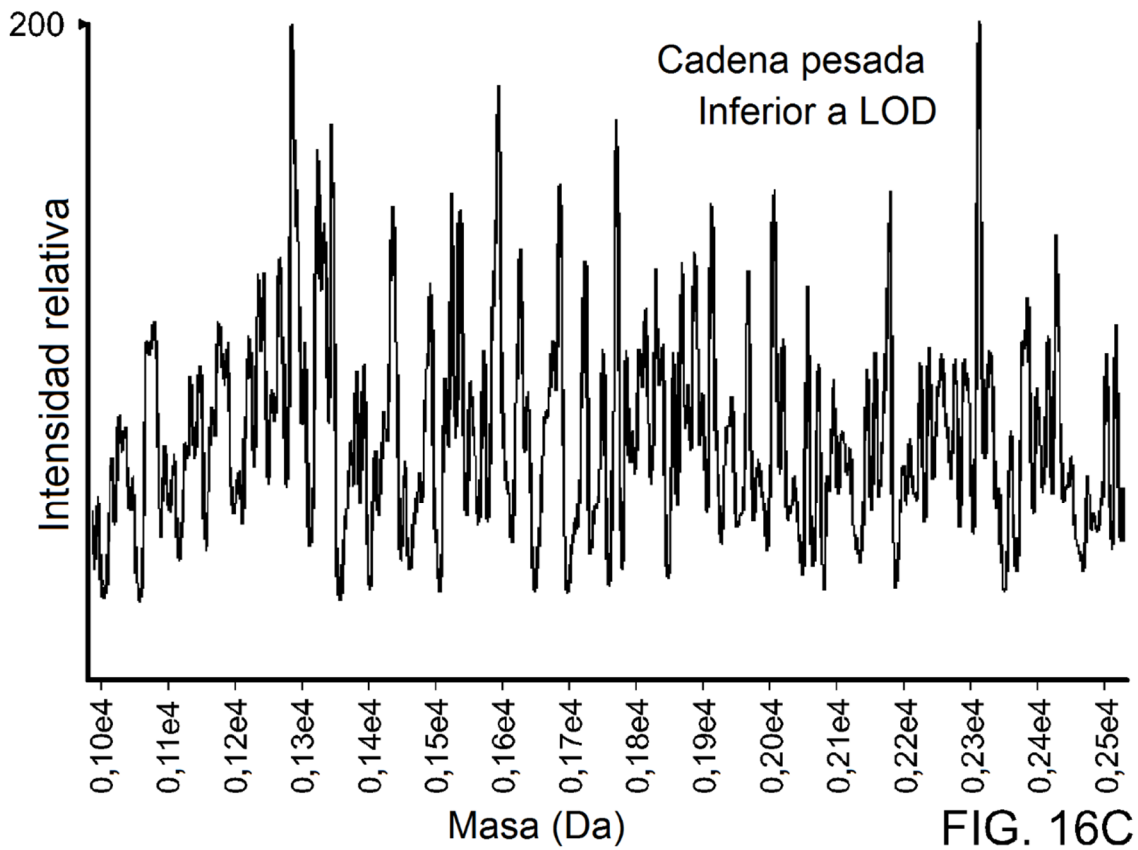


FIG. 16C

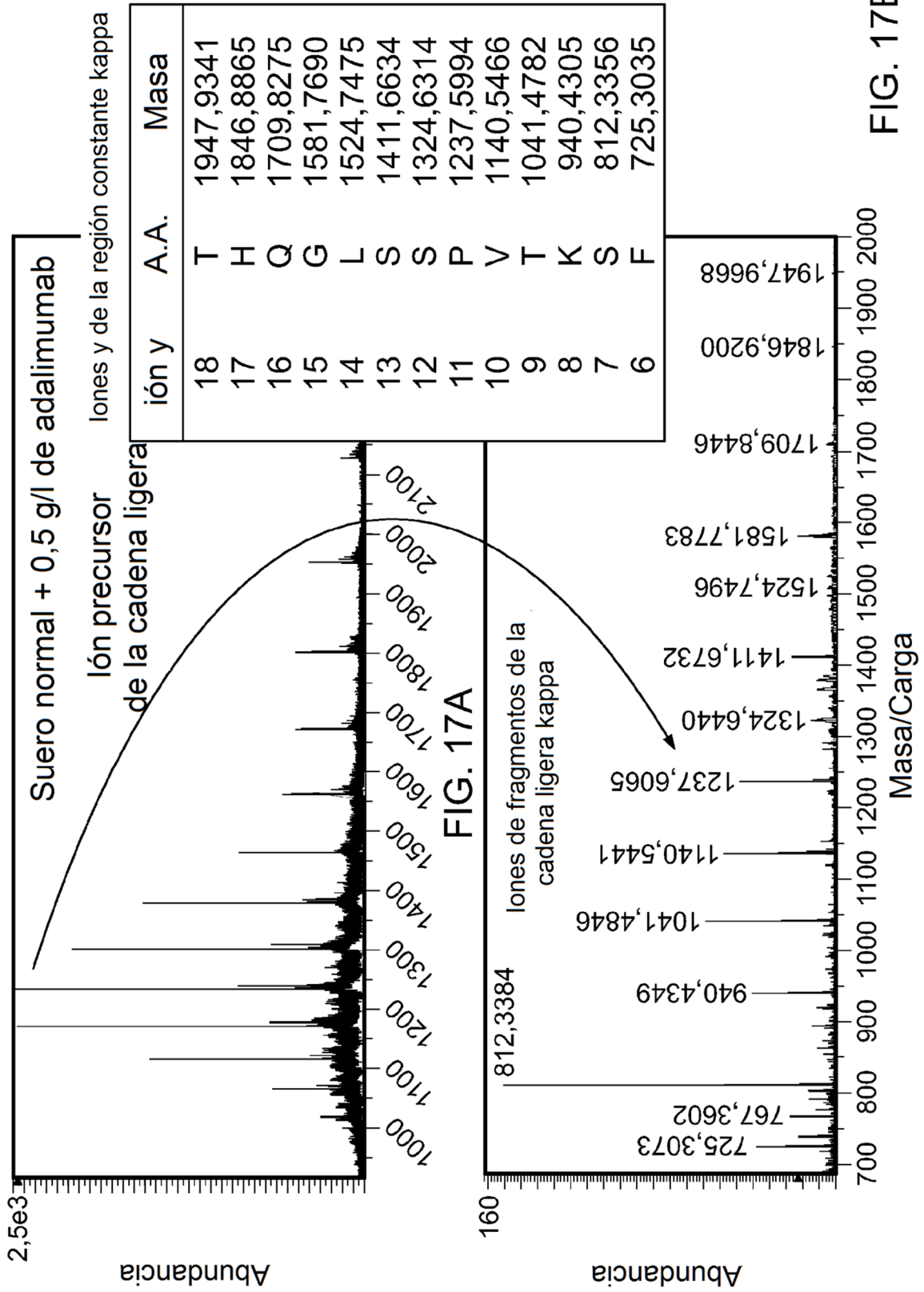


FIG. 17B

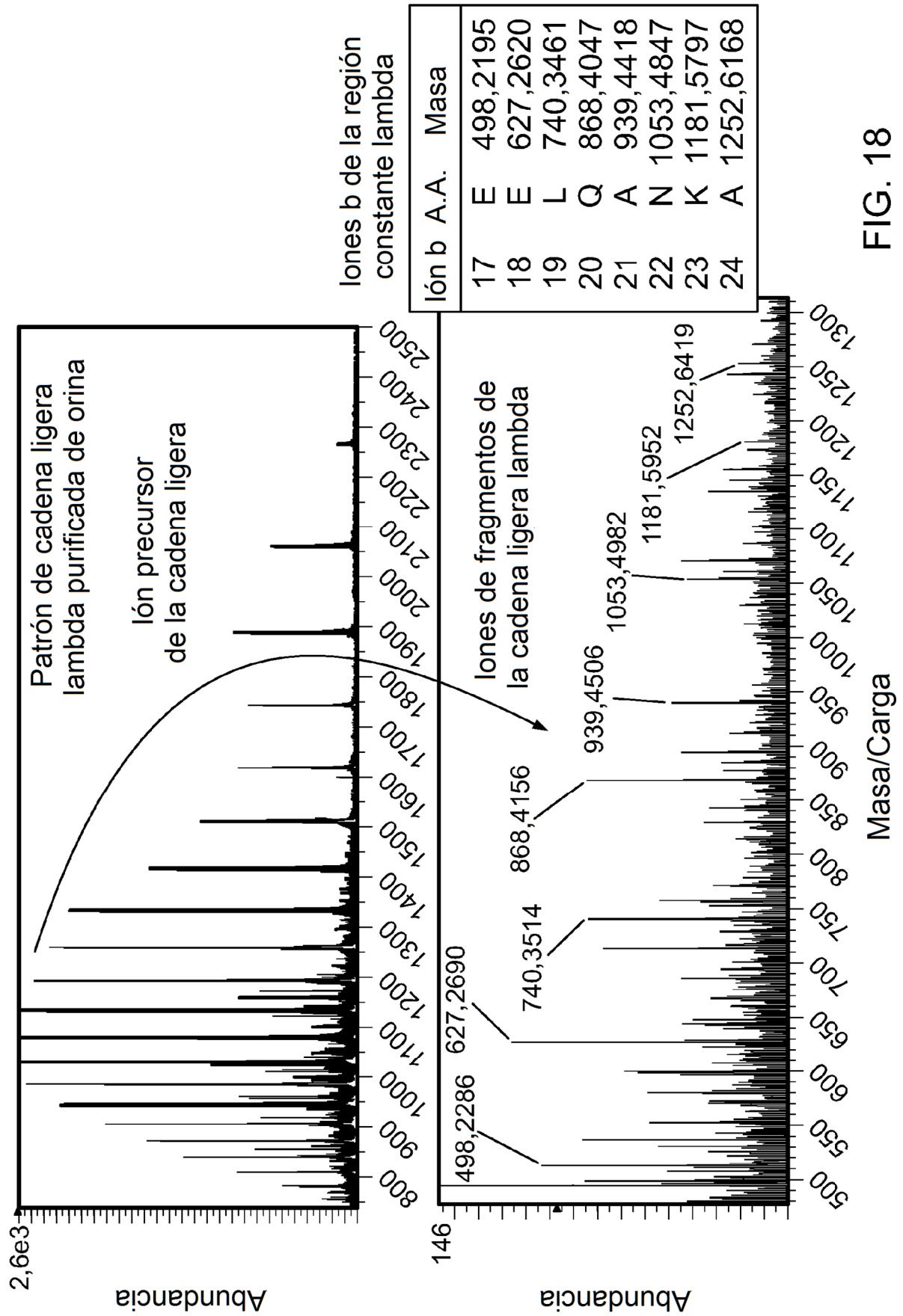


FIG. 18