

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 805**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 18174068 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3387898**

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

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361792944 P**

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

**21.01.2021**

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 2 802 805 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 seguimiento de inmunoglobulinas monoclonales por la masa molecular

## 5 Campo técnico

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

## 10 Antecedentes

Las inmunoglobulinas humanas contienen dos polipéptidos de la cadena pesada idénticos (cada uno de aproximadamente 54 kilodaltons de PM) y dos polipéptidos de la cadena ligera idénticos (cada uno de aproximadamente 24 kilodaltons de peso molecular) que están unidos entre sí 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 a antígeno (Fab) de la inmunoglobulina. Cuando se examina en términos de distribución de pesos moleculares, el espectro de masas de inmunoglobulinas o fragmentos que contienen la o las regiones variables forma una distribución normal en un individuo sano. En un paciente que experimenta una expansión anormal de una célula plasmática, todas las células plasmáticas anormalmente expandidas producen la misma inmunoglobulina particular, lo que da como resultado una sobreexpresión de esa inmunoglobulina en el paciente. Un paciente con dicha anomalía se encuentra en riesgo de desarrollar enfermedades graves que se conocen colectivamente como gammapatías monoclonales.

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

Existen dos isotipos diferentes de polipéptidos de la cadena ligera denominados o kappa o 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 contiene dos regiones: la región variable y la región constante. Las regiones constantes de los dos tipos de cadenas ligeras y de los cinco tipos de cadenas pesadas tienen diferentes secuencias de aminoácidos, y pueden utilizarse para identificar el isotipo de la cadena pesada o ligera. Los procedimientos actuales utilizan técnicas basadas en anticuerpos para identificar el isotipo de la cadena pesada o ligera. Estos anticuerpos son específicos para cada isotipo solo y, por lo tanto, no detectan directamente la clonalidad.

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

Bergen HR III et al., en *Biomedical Chromatography*, vol. 18, Nº 3, 1 de abril de 2004, en las páginas 191-201, describen una caracterización de las cadenas ligeras de inmunoglobulina amiloidogénica directamente a partir de suero mediante aislamiento por inmunoadfinidad en línea.

Lavatelli et al., en *Biochimica et Biophysica Acta*, vol.1814, Nº 3, 28 de diciembre de 2010, en las páginas 409-419, describen un enfoque novedoso para la purificación y el análisis proteómico de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas patógenas a partir de suero.

Kaplan B et al., en *British Journal of Hematology*, vol. 144, Nº 5, 1 de marzo de 2009, en las páginas 705-715, describen cadenas ligeras libres en plasma de pacientes con amiloidosis de cadena ligera y enfermedad por depósito de cadenas no amiloides, y la alta proporción y heterogeneidad de cadenas ligeras libres monoclonales unidas por disulfuro como características patógenas de una enfermedad amiloide.

Zhang et al., en *Analytical Chemistry*, vol. 79, Nº 15, 1 de agosto de 2017, en las páginas 5723-5729, describen la caracterización de regiones variables de anticuerpos monoclonales por espectrometría de masas de arriba hacia abajo (*top-down*).

## Sumario

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan formas de realización adicionales de la invención.

5 La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el desarrollo de nuevos procedimientos basados en espectrometría de masas para determinar si una inmunoglobulina monoclonal está presente por encima del nivel de fondo policlonal o no y, en algunas formas de realización, para identificar y cuantificar la misma en una muestra, y procedimientos para determinar si la inmunoglobulina monoclonal contiene una cadena ligera kappa o lambda; o una  
10 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 directa de la clonalidad, dado que mide una propiedad fundamental de la inmunoglobulina monoclonal: su masa. Estos procedimientos son útiles para el cribado de muestras biológicas para la presencia o la ausencia de una inmunoglobulina monoclonal endógena por encima del fondo policlonal o una inmunoglobulina monoclonal  
15 terapéutica exógena, para realizar un seguimiento de la concentración de la inmunoglobulina monoclonal en un sujeto y para diagnosticar y realizar un seguimiento de una gammapatía monoclonal.

En un aspecto, la presente divulgación presenta procedimientos basados en espectrometría de masas para determinar la presencia o la ausencia de uno o más picos de proteína M en una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de  
20 suero, plasma, sangre completa, orina. Las inmunoglobulinas pueden aislarse de la muestra y someterse a una técnica de espectrometría de masas para determinar si una inmunoglobulina se encuentra o no por encima del fondo policlonal. Las inmunoglobulinas pueden aislarse de la muestra mediante fraccionamiento químico, por ejemplo, cromatografía en Melon Gel, por purificación por afinidad, por ejemplo purificación de proteína A, proteína G o proteína L, o por cromatografía de exclusión por tamaño.

25 Las inmunoglobulinas intactas se someten a los ensayos de espectrometría de masas descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, las inmunoglobulinas pueden procesarse para reducir su masa total mientras conservan las regiones variables únicas de las inmunoglobulinas antes de someterlas a la técnica de espectrometría de masas. En algunos casos, se someten a espectrometría de masas porciones de inmunoglobulinas que contienen las regiones variables. Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas se desacoplan de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y se someten a los procedimientos basados en espectrometría de masas descritos en el presente documento. Cualquier porción de la cadena polipeptídica o modificación postraduccional de la cadena polipeptídica también se puede escindir de la inmunoglobulina total utilizando proteasas, y someterla a los  
35 procedimientos basados en espectrometría de masas descritos en el presente documento.

En algunas formas de realización, la técnica de espectrometría de masas utilizada en estos procedimientos puede incluir una cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM). En algunas formas de realización, se puede utilizar una técnica de espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz (EM MALDI). En algunas formas de realización, las técnicas de espectrometría de masas en tándem (EM/EM) pueden ser una técnica de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM).  
40

Los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento, cuando se acoplan con un procedimiento de aislamiento de inmunoglobulina rápido y eficaz (por ejemplo, cromatografía en Melon Gel), se pueden utilizar para cribar muestras de pacientes, por ejemplo muestras de suero, plasma, sangre completa u orina, para inmunoglobulinas monoclonales endógenas presentes por encima del fondo policlonal y/o inmunoglobulinas monoclonales terapéuticas exógenas en un entorno de laboratorio clínico. Los procedimientos de cribado basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento muestran una velocidad, una sensibilidad, una resolución y una solidez mayores que las pruebas de laboratorio convencionales en el cribado para concentraciones elevadas de una inmunoglobulina monoclonal en muestras biológicas.  
45

En algunas formas de realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal terapéutico. Los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento comprenden además determinar la presencia o la ausencia de un anticuerpo monoclonal terapéutico en la muestra basándose en la presencia o la ausencia de un pico en el espectro de masas. En algunas formas de realización, la cuantificación del anticuerpo monoclonal terapéutico en la muestra se puede determinar basándose en el área del pico de la masa del fragmento de región variable.  
50

En otro aspecto, los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento pueden utilizarse para diagnosticar y para realizar un seguimiento, por ejemplo, para realizar un seguimiento del tratamiento, la progresión, la remisión, etc., de una gammapatía monoclonal en un sujeto. Una muestra puede someterse a procedimientos de cribado basados en espectrometría de masas descritos anteriormente para proporcionar un diagnóstico de la presencia o la ausencia de la gammapatía monoclonal. Cuando se diagnostica que el sujeto padece gammapatía monoclonal, los procedimientos descritos en el presente documento pueden utilizarse también para realizar un seguimiento de un tratamiento de gammapatía monoclonal. Dichos procedimientos 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 de la segunda muestra, y se someten a una técnica  
55

de espectrometría de masas. Se determina el nivel de una inmunoglobulina presente por encima del fondo policlonal antes y después del tratamiento y se realiza una comparación. 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 indican que el tratamiento puede ser ineficaz para el sujeto.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, una "muestra" puede ser cualquier muestra biológica, tal como una muestra de un tejido (por ejemplo, tejido adiposo, hepático, renal, cardíaco, muscular, óseo o cutáneo) o de un fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, líquido lagrimal o saliva), o un reactivo sintético.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" es un animal tal como un mamífero, por ejemplo un ser humano, un perro, un gato, un primate, un roedor, un cerdo, una oveja, una vaca o un caballo.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, "inmunoglobulinas que contienen regiones variables" pueden ser inmunoglobulinas intactas o porciones de inmunoglobulinas que contienen las regiones variables, por ejemplo, cadenas ligeras de inmunoglobulinas, cadenas pesadas de inmunoglobulinas, fragmentos de unión a antígeno (Fab) de inmunoglobulinas y mezclas de los mismos.

20 A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o en el ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y las referencias mencionadas en la misma, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, los materiales, los procedimientos y los ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

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

30 Descripción de los dibujos

35 Las figuras 1A-1D muestran los resultados del análisis de una muestra de suero de un paciente con mieloma múltiple IgG kappa. La figura 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 (Figura 1B), que se encuentra dentro del intervalo de masa esperado para una cadena ligera de IgG. La figura 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 (figura 1D), que se encuentran dentro del intervalo de masa esperado para una cadena pesada de IgG. La diferencia entre la masa molecular de la serie 2 y la serie 3 es de 162,20 Da, que se aproxima mucho a la masa de una subunidad de hexosa.

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

45 La figura 3 es 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.

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

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

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

La figura 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 por EM MALDI-TOF.

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

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

La figura 10 es un espectro de masas de una muestra de suero de un paciente con gammapatía monoclonal IgG kappa, medido por CL-EM, con puntos destacados del pico a 1229,9 de masa/carga que se selecciona como el ion precursor para CL-EM/EM.

5 La figura 11 muestra el espectro de masa de iones de fragmentos para el ion precursor marcado en la figura 10.

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

10 La figura 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.

15 La figura 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.

La figura 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 no resueltos, mientras que el suero normal enriquecido con 0,5 g/dl de adalimumab muestra iones de proteínas de carga múltiple claramente definidos. La figura 15C es un espectro convertido para la muestra de suero normal que muestra un amplio intervalo de picos no resueltos. La figura 15D es un espectro de masas convertido para el suero normal enriquecido con 0,5 g/dl de adalimumab que muestra un pico único a una masa molecular promedio de 23.412,19 Da. Esta masa concuerda de forma excelente con la masa molecular promedio calculada de 23.412,13 Da para la cadena ligera kappa de adalimumab.

20 La figura 16A-16C muestra los resultados del análisis de una muestra de suero del mismo paciente que se muestra en la figura 1 después de un tratamiento de 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 figura 16A es un espectro de masas que muestra una serie de iones de carga múltiple. La figura 16B muestra la masa molecular calculada para los iones en la figura A, que es solo 0,47 Da diferente de la masa molecular observada en la figura 1 para la cadena ligera. La figura 16A muestra que la masa molecular para los iones de la cadena pesada propuestos ya no se puede calcular, dado que los iones se encuentran por debajo del nivel de detección.

25 La figura 17 muestra los resultados de la EM de arriba hacia abajo de adalimumab añadido a suero normal. El ion a  $m/z = 1233$  en el espectro superior coincide con el ion de estado de carga +19 de la cadena ligera kappa de adalimumab y se seleccionó para EM de arriba hacia abajo. La flecha apunta al espectro de masas de iones de fragmentos. Los iones de fragmentos marcados coinciden con las masas esperadas para los iones de fragmentos de la porción C-terminal de la cadena ligera kappa que contiene la región constante. En la tabla se muestran las masas de iones y calculadas para la secuencia de aminoácidos específica de la región constante de la cadena ligera kappa.

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

Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

50 Descripción detallada

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

60 En el presente documento se describen procedimientos basados en espectroscopía de masas para identificar si una inmunoglobulina monoclonal está presente o no en una muestra biológica. La velocidad, la sensibilidad, la resolución y la solidez de la espectroscopía de masas hacen que los presentes procedimientos sean más eficaces que SPEP o UPEP para el cribado de muestras para gammapatías monoclonales. Un procedimiento descrito en el presente documento puede incluir el uso de una cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM). En algunas formas de realización, se pueden utilizar técnicas de espectrometría de masas en tándem (EM/EM), por ejemplo, una técnica

de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). En algunas formas de realización, se puede utilizar una técnica de espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (EM MALDI TOF).

## 5 Muestras y preparación de muestras

Una muestra para análisis puede ser cualquier muestra biológica, tal como una muestra de tejido (por ejemplo, tejido adiposo, hepático, renal, cardíaco, muscular, óseo o cutáneo) o de un fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, líquido lagrimal o saliva), o un reactivo sintético. La muestra biológica puede ser de un sujeto que tiene inmunoglobulinas, que incluye, pero sin limitación, un mamífero, por ejemplo un ser humano, un perro, un gato, un primate, un roedor, un cerdo, una oveja, una vaca, un caballo, un pájaro, un reptil o un pez.

Una muestra se puede tratar para eliminar componentes que podrían interferir con la técnica de espectrometría de masas. Se puede utilizar una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica en función del tipo de muestra. Las muestras sólidas y/o de tejido pueden triturarse y extraerse para liberar los analitos de interés de los componentes interferentes. En dichos casos, una muestra puede centrifugarse, filtrarse y/o someterse a técnicas cromatográficas para eliminar componentes interferentes (por ejemplo, células o fragmentos de tejido). En otros casos más, se pueden añadir reactivos conocidos para precipitar o unir los componentes interferentes. 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 puede desproteinizarse. Por ejemplo, de una muestra de plasma pueden haberse precipitado proteínas séricas utilizando reactivos convencionales tales como acetoniitrilo, KOH, NaOH u otros conocidos por los expertos en la técnica, operación opcionalmente seguida por centrifugación de la muestra.

Las inmunoglobulinas pueden aislarse de las muestras utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden purificar por fraccionamiento químico, por ejemplo, cromatografía en Melon Gel (Thermo Scientific), en el que resinas en Melon Gel se unen a proteínas que no son inmunoglobulinas 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, en la que las inmunoglobulinas se unen con esas proteínas a pH fisiológico y después se liberan de las proteínas reduciendo el pH. Cuando se utilizan muestras de suero, plasma o sangre completa, una muestra, tal como una muestra de 10 - 250  $\mu$ l, por ejemplo, 50  $\mu$ l, puede someterse directamente a purificación en Melon Gel, proteína A, proteína G o proteína L. Cuando se utilizan muestras de orina, se puede tamponar una muestra de orina, por ejemplo, una muestra de orina de 50  $\mu$ l se puede diluir en primer lugar con 50  $\mu$ l de bicarbonato de amonio 50 mM.

Las inmunoglobulinas intactas pueden procesarse adicionalmente para reducir su masa total mientras conservan la región variable única de la inmunoglobulina. En algunas formas de realización, las cadenas ligeras de 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 ditioneitol, tris(2-carboxietil)fosfina o 2-mercaptoetanol. En algunas formas de realización, la etapa de reducción se realiza a temperatura elevada, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 30  $^{\circ}$ C a aproximadamente 65  $^{\circ}$ C, tal como aproximadamente 55  $^{\circ}$ C, para desnaturalizar las proteínas. En algunas formas de realización, la muestra se trata adicionalmente, por ejemplo modificando el pH de la muestra o tamponando la muestra. En algunas formas de realización, la muestra puede acidificarse.

En algunas formas de realización, los fragmentos de unión a antígeno (Fab) de las inmunoglobulinas se pueden escindir de las inmunoglobulinas intactas utilizando proteasas tales como la pepsina. El exceso de reactivos y sales se puede eliminar de las muestras utilizando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

## 50 Procedimientos de espectrometría de masas

Después de la preparación de la muestra, una muestra de inmunoglobulina, tal como una muestra de inmunoglobulina intacta, de cadena ligera desacoplada o Fab, puede someterse a una técnica de espectrometría de masas (EM), ya sea directamente o después de separación en una columna de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En algunas formas de realización, se puede utilizar cromatografía líquida-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 cadena ligera o Fab. La CL-EM es una técnica analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía líquida con las capacidades de 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 utilizar cualquier máquina de CL-EM, por ejemplo, el espectrómetro de masas ABSciex 5600. El espectro de masas de iones puede analizarse para detectar uno o más picos que tengan una intensidad superior a la intensidad de los niveles de iones de fondo, por ejemplo, los iones resultantes de inmunoglobulinas no sobreexpresadas. Por ejemplo, se pueden examinar uno o más picos de iones, por ejemplo, un pico de un ion con la intensidad más alta, para determinar si uno o más picos de iones tienen una intensidad de iones mayor que la intensidad de fondo. En algunas formas de realización, la intensidad de iones de los, uno o más, picos es al menos dos desviaciones estándar mayor que la intensidad de fondo; en algunos casos, al menos el 50% mayor, al menos el 75% mayor, o al menos el 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. La presencia de uno o más picos que tienen una intensidad de iones mayor que el nivel de fondo se considera un pico de proteína M o pico M, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal.

5 En algunas formas de realización, se puede utilizar espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz-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 presentes en la muestra, es decir, la muestra de inmunoglobulina intacta, de cadena ligera o Fab. La espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz (EM MALDI) utiliza una técnica de ionización suave para obtener 10 iones grandes en la fase gaseosa, y es adecuada para analizar biomoléculas frágiles (tales como ADN, proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes, que tienden a fragmentarse cuando se ionizan por procedimientos de ionización convencionales. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) utiliza un campo eléctrico para acelerar los iones a través del mismo potencial, y después mide el tiempo que tardan en alcanzar el detector. Si todas las partículas tienen la misma carga, las energías cinéticas son idénticas y sus velocidades dependen solo de sus 15 masas. Los iones más ligeros alcanzan el detector en primer lugar. Las muestras se pueden preparar utilizando un procedimiento de gotitas secas para EM MALDI-TOF. Las ventajas de utilizar EM MALDI-TOF incluyen: 1) menores costes de instrumentación, 2) mayor rendimiento, 3) preparación de muestras sencilla, 4) instrumentación fácil de usar y 5) estados de carga más bajos. Se puede utilizar cualquier espectrómetro de masas MALDI-TOF, por ejemplo, el espectrómetro de masas MALDI-TOF Biflex III (Bruker Daltonics). El espectro de masas, por ejemplo, el espectro de 20 masas de iones +1 de polipéptidos de cadena ligera intactos, se puede analizar para identificar uno o más picos que tengan una intensidad de iones mayor que la intensidad de iones de fondo y a una masa/carga apropiada esperada para una cadena ligera o un fragmento de inmunoglobulina Fab, por ejemplo, a una m/z de aproximadamente 21.000 a aproximadamente 26.000, o una m/z de aproximadamente 22.000 a aproximadamente 24.500, o una m/z de aproximadamente 23.000 a aproximadamente 24.000 para cadenas ligeras; o una m/z de aproximadamente 40.000 a 25 aproximadamente 65.000, o una m/z de aproximadamente 45.000 a aproximadamente 62.000; o una m/z de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 60.000 para fragmentos de inmunoglobulina Fab. En algunas formas de realización, los, uno o más, picos tiene una intensidad de iones al menos dos desviaciones estándar mayor que la intensidad de iones de fondo; o en algunas formas de realización, al menos el 50% mayor, al menos el 75% mayor, o al menos el 100% mayor, o al menos 3 veces mayor, 5 veces mayor, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces 30 mayor, 25 veces mayor, 50 veces mayor, 75 veces mayor, 100 veces mayor o más que la intensidad de iones de fondo. La presencia de uno o más picos que tienen una intensidad de iones mayor que el nivel de intensidad de iones de fondo y a una m/z apropiada para una cadena ligera o un fragmento de inmunoglobulina Fab se considera como un pico de proteína M o pico M, que indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal.

35 En algunas formas de realización, se puede utilizar 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 muestra de cadena ligera de inmunoglobulina desacoplada, se somete a CL-EM, y se genera un espectro de masas de fragmentos de iones de cadena ligera, por ejemplo, una distribución 40 de fragmentos de inmunoglobulina de cadena ligera que tienen +1 de m/z, tal como se ha descrito anteriormente. El pico de ion más intenso se identifica y se selecciona como el ion precursor para la segunda ronda de espectrometría de masas, CL-EM/EM. Una vez que se determina la m/z del ion precursor de mayor intensidad, el procedimiento de CL-EM/EM permite que la porción de cuadrupolo del espectrómetro de masas seleccione ese ion específico. Durante la segunda ronda de CL-EM/EM, este ion precursor se fragmenta utilizando disociación inducida por colisión (CID), 45 que implica la colisión de un ion con un átomo neutro o una molécula en la fase gaseosa y la disociación posterior del ion. Los iones de fragmentos producidos durante la CID se pueden detectar utilizando la porción de tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas. 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 se pueden comparar con una lista de una o más m/z esperadas para iones de fragmentos de proteínas, por ejemplo, iones de fragmentos de proteínas +1, que se 50 esperaría que resultaran de la región constante C-terminal de la cadena ligera. La secuencia de ensayo amino 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 C-terminal de la cadena ligera kappa. Cuando se correlacionan una o más m/z de los iones de fragmentos, por ejemplo, coinciden, con una o más m/z de los iones de fragmentos de proteínas esperados, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más, se determina que la cadena ligera de inmunoglobulina 55 es una cadena ligera kappa.

De forma similar, se puede utilizar 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 muestra de cadena ligera de inmunoglobulina desacoplada, se somete a CL-EM, y se genera un espectro de masas de fragmentos de iones de cadena ligera, por ejemplo, una distribución de fragmentos 60 de inmunoglobulina de cadena ligera que tienen +1 de m/z, tal como se ha descrito anteriormente. Se selecciona un ion precursor para la segunda ronda de CL-EM/EM. Preferentemente, pero no necesariamente, el ion precursor se selecciona del ion más abundante dentro del intervalo de masas para la selección de iones precursores. Una vez que se determina la m/z del ion precursor, el procedimiento de CL-EM/EM permite que la porción cuadrupolo del 65 espectrómetro de masas seleccione ese ion específico. Durante la segunda ronda de CL-EM/EM, este ion precursor se fragmenta utilizando disociación inducida por colisión (CID), que implica la colisión de un ion con un átomo neutro

o una molécula en la fase gaseosa y la disociación posterior del ion. Los iones de fragmentos producidos durante la CID se pueden detectar utilizando la porción de tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas. 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 se pueden comparar con una lista de una o más  $m/z$  esperadas para iones de fragmentos de proteínas, por ejemplo, iones de fragmentos de proteínas +1, que se esperaría que resultaran de la porción N-terminal de una cadena ligera de la región constante. Dichos iones se denominan iones b para la porción N-terminal de la región constante lambda. La secuencia de ensayo amino de la región constante de la cadena ligera está disponible en bases de datos públicas. La comparación se puede realizar utilizando un programa informático disponible comercialmente, por ejemplo ProSight PTM 2.0. Cuando se correlacionan una o más  $m/z$  de los iones de fragmentos, por ejemplo, coinciden, con una o más  $m/z$  de los iones de fragmentos de proteínas esperados, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más, se determina que la cadena ligera de inmunoglobulina es una cadena ligera lambda.

Procedimientos para cribar muestras biológicas, y para diagnosticar y realizar un seguimiento de gammapatía monoclonal

Los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento pueden utilizarse para determinar la expresión elevada de inmunoglobulina monoclonal en una muestra biológica. Las inmunoglobulinas pueden aislarse 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 fondo policlonal. En algunas formas de realización, las inmunoglobulinas intactas pueden someterse a los ensayos de espectrometría de masas. En algunas formas de realización, las inmunoglobulinas pueden procesarse para reducir su masa mientras conservan las regiones variables únicas de las inmunoglobulinas antes de someterlas a la técnica de espectrometría de masas. En esos casos, se someten porciones de inmunoglobulinas que contienen las regiones variables a espectrometría de masas. Por ejemplo, las cadenas ligeras de inmunoglobulina pueden desacoplarse de las cadenas pesadas de inmunoglobulina y someterse a los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento. Los fragmentos de unión a antígeno (Fab) de las inmunoglobulinas también se pueden escindir de la inmunoglobulina total utilizando enzimas tales como la pepsina, y someterse a los procedimientos basados en la espectrometría de masas divulgados en el presente documento.

Los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento cuando se combinan con un procedimiento de aislamiento de inmunoglobulina rápido y eficaz (por ejemplo, cromatografía en Melon Gel) se pueden utilizar para cribar muestras de pacientes, por ejemplo muestras de suero, plasma, sangre completa u orina, para gammapatías monoclonales en un entorno de laboratorio clínico. Los procedimientos de cribado basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento muestran una velocidad, una sensibilidad, una resolución y una solidez superiores que las pruebas de laboratorio convencionales en el cribado para la expresión elevada de inmunoglobulina monoclonal en muestras biológicas.

Los procedimientos basados en espectrometría de masas divulgados en el presente documento pueden utilizarse para diagnosticar y realizar un seguimiento de gammapatía monoclonal en un sujeto. Se puede obtener una muestra del sujeto y someterla a procedimientos de cribado basados en espectrometría de masas divulgados anteriormente para proporcionar un diagnóstico de la presencia o la ausencia de gammapatía monoclonal. Cuando se diagnostica que el sujeto padece gammapatía monoclonal, los procedimientos divulgados en el presente documento pueden utilizarse además para realizar un seguimiento de un tratamiento de gammapatía monoclonal. Dichos procedimientos incluyen 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 de la segunda muestra y se someten a una técnica de espectrometría de masas. El nivel de una inmunoglobulina se determina antes y después del tratamiento y se realiza una comparación. 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 adicionalmente en los ejemplos siguientes.

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

Se aislaron inmunoglobulinas totales sometiéndolo a una muestra de suero de 50  $\mu$ l de un sujeto a purificación con Melon Gel (Thermo Scientific) según el prospecto del fabricante. Las inmunoglobulinas de la cadena ligera se desacoplaron 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 los reactivos en exceso se eliminaron utilizando un tubo de filtro de 3 kDa. La muestra de inmunoglobulina desacoplada se acidificó con ácido fórmico al 0,1% y después se examinó por cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) utilizando un espectrómetro de masas ABSciex 5600 equipado con una columna de fase inversa C8.

Las figuras 1A-1D muestran los resultados del análisis de una muestra de suero de un paciente con mieloma múltiple IgG kappa utilizando los procedimientos descritos en el presente documento. La figura 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 (figura 1B), que se encuentra dentro del intervalo de masa esperado para una cadena ligera de IgG. La figura 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 (figura 1D), que se encuentran dentro del intervalo de masa esperado para una cadena pesada de IgG. La diferencia entre la masa molecular de la serie 2 y la serie 3 es de 162,20 Da, que se aproxima mucho a la masa de una subunidad de hexosa.

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

La figura 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.

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

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

También se utilizó espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF) para realizar un seguimiento de anticuerpos monoclonales en suero y orina. se utilizaron adalimumab purificado en Melon Gel (HUMIRA®) y controles de suero normales para obtener resultados iniciales utilizando EM MALDI-TOF (figuras 5-7). El pico más abundante que representa la cadena ligera de inmunoglobulina en la figura 5 es de aproximadamente 3000 recuentos para el adalimumab, mientras que el nivel de fondo de las cadenas ligeras de inmunoglobulina en la muestra de control normal en la figura 6 es aproximadamente de 50 recuentos. A continuación, el adalimumab se diluyó diez veces y se añadió a una muestra de suero de control normal para simular la presencia de una inmunoglobulina monoclonal en una muestra de suero del paciente y se analizó mediante EM MALDI-TOF. Tal como se muestra en la figura 7, se detectó adalimumab en la muestra de suero normal por EM MALDI-TOF.

Después se utilizó EM MALDI-TOF para identificar anticuerpos monoclonales en muestras de suero de un paciente con mieloma múltiple. La muestra de suero se preparó tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1 y se analizó por EM MALDI-TOF. El anticuerpo monoclonal de la cadena ligera asociado al clon maligno se observó claramente a una masa/carga de 22.783 (figura 8).

También se evaluó la capacidad de EM MALDI-TOF para identificar la presencia de cadenas ligeras libres monoclonales (> 3 mg/ml) en la muestra de orina de pacientes con mieloma múltiple. Una muestra de orina de 50 µl del paciente se diluyó primero con 50 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y después se redujo con DTT 100 mM durante 30 minutos a 55 °C. La muestra reducida se acidificó con ácido fórmico y después se examinó mediante 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 figura 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 utilizar EM MALDI-TOF para cribar muestras de pacientes para gammapatías monoclonales.

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

La figura 10 es un espectro de masas de una muestra de suero de un paciente con gammapatía monoclonal IgG kappa, medido por CL-EM, con puntos destacados del pico a 1229,9 de masa/carga que se selecciona como el ion precursor para CL-EM/EM. Una vez que se determinó la masa del ion precursor, se seleccionó un procedimiento CL-EM/EM que permite que la porción cuadrupolo del espectrómetro de masas seleccione ese ion específico. Este ion precursor se fragmentó después utilizando disociación inducida por colisión (CID) en la porción de la celda de colisión del espectrómetro de masas. Los iones de fragmentos producidos se analizaron después utilizando la porción de tiempo de vuelo (TOF) del espectrómetro de masas.

La figura 11 mostró el fragmento de espectro de iones para el ion precursor marcado en la figura 10. En el lado derecho de la figura 11 se encontraba una lista de fragmentos de iones y C-terminales y sus masas de la región constante para la cadena ligera kappa. La figura 11 también mostró una flecha apuntando desde la lista en el residuo de P (prolina) 11 con una masa de 1237,5994, a un pico en el espectro de iones de fragmentos en la masa 1237,6263. Al comparar otros picos de iones de fragmentos con la lista de iones y para la región constante C-terminal para la cadena ligera kappa, fue posible identificar el pico M como una cadena ligera kappa.

Se prepararon muestras de suero de varios pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras kappa de pico M conocidas tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. La figura 12 mostró los espectros de masas de la

cadena ligera de pico M de las muestras de suero de diferentes pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras kappa pico M conocidas. Cada espectro mostró un conjunto diferente de iones de carga múltiple de la cadena ligera única de cada paciente. Estos resultados mostraron claramente que la CL-EM/EM de la cadena ligera intacta puede utilizarse para determinar si es una cadena ligera kappa.

Se realizaron experimentos equivalentes en pacientes con mieloma múltiple con cadenas ligeras lambda de pico M conocidas encontradas en la orina. Las muestras de orina se prepararon tal como se ha descrito en el ejemplo 1. Los datos obtenidos para las muestras de orina de los pacientes demostraron la sensibilidad analítica y la especificidad superiores del procedimiento con respecto a los procedimientos utilizados actualmente en los laboratorios clínicos, por ejemplo, electroforesis en gel de proteínas de suero (SPEP) o electroforesis en gel de proteínas de orina (UPEP). La figura 13 mostró el espectro de masa de la cadena ligera de pico M de una muestra de orina de un paciente con cadenas ligeras lambda de pico M conocidas. El espectro de la parte superior de la figura 13 mostró los iones de carga múltiple de cadenas ligeras libres lambda (FLC) que se encontró que estaban presentes en la orina del paciente utilizando un inmunoensayo estándar. El espectro de la parte inferior de la figura 13 mostró el espectro de iones de fragmentos por CL-EM/EM del ion de la cadena ligera lambda intacto del paciente a 1140,4582 de masa/carga. Mediante el uso de un paquete informático disponible comercialmente denominado ProSight, se puede determinar la identidad de los iones de fragmentos observados. El programa informático identificó los iones como iones b producidos a partir de la porción N-terminal de la región constante lambda. Los iones que coinciden con los iones b esperados se marcaron con un círculo en el espectro inferior de la figura 13. Estos resultados mostraron claramente que puede utilizarse CL-EM/EM de una cadena ligera intacta para determinar si es una cadena ligera lambda.

Las muestras de orina de pacientes con cadenas ligeras libres de kappa conocidas se analizaron utilizando el mismo procedimiento. Los resultados de estos experimentos se mostraron en la figura 14. La parte superior de la figura 14 mostró el espectro para la cadena ligera libre kappa intacta en la muestra de orina. El espectro fue similar a los observados para el suero. La parte inferior de la figura 14 mostró el espectro de iones de fragmentos para el ion intacto de carga múltiple a 1060,6605 de masa/carga. Se resaltaron los iones de fragmentos que coinciden con los iones esperados de la región constante C-terminal. Los iones de fragmentos observados fueron los mismos que los observados en muestras de suero de pacientes con una cadena ligera kappa (véase la figura 11). Esta observación confirmó que las cadenas ligeras kappa pueden identificarse en muestras de orina y de suero.

Se produjeron claras diferencias en los iones de fragmentos entre cadenas ligeras kappa y lambda y se pueden detectar mediante 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 de la porción C-terminal de la molécula. Los iones lambda intactos expuestos a las mismas condiciones de CID, EM/EM habían producido iones b a partir de la porción N-terminal de la molécula. Se puede utilizar un procedimiento similar para identificar los diferentes subtipos lambda, lo que proporciona un aspecto de diagnóstico adicional a esta metodología. La serie única de iones y producida por la secuencia de aminoácidos C-terminal de kappa se puede utilizar como una marca de EM/EM similar a las marcas de proteínas que se añaden a las proteínas recombinantes con fines de purificación.

#### **Ejemplo 4. Adalimumab en suero normal como sistema modelo**

El adalimumab es una inmunoglobulina monoclonal terapéutica anti-TNF que se prescribe ampliamente para regular a la baja la respuesta inflamatoria en pacientes con trastornos autoinmunitarios. Las inmunoglobulinas monoclonales terapéuticas tales como el adalimumab son patrones sustitutos ideales para simular una inmunoglobulina monoclonal en suero debido a que están fácilmente disponibles en una alta pureza y generalmente presentan una gran cantidad de literatura sobre sus propiedades estructurales. La figura 15 muestra los espectros de masas para suero normal y suero enriquecido con 0,5 g/dl (30  $\mu$ M) de adalimumab. Cada espectro de masas representa los espectros sumados a lo largo del tiempo de elución de la cadena ligera de adalimumab. El espectro de masas del suero normal en la sección A muestra un pico ancho no resuelto 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 de carga múltiple 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 ancha de masas sin ninguna masa individual mayor en abundancia que el fondo. Esto se encuentra en marcado contraste 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 concuerda 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 microLC-ESI-Q-TOF para la cuantificación, se añadió adalimumab a tampón de bicarbonato de amonio 50 mM, suero normal y orina normal. Se utilizaron diez concentraciones de patrón diferentes que varían de 0,005 a 5,0 g/dl. Las curvas patrón producidas en suero utilizaron Melon Gel para enriquecer en inmunoglobulinas, mientras que las curvas hechas en orina y tampón se redujeron y se analizaron sin la purificación de Melon Gel. Los valores de linealidad y del intervalo dinámico lineal en la tabla se dividen según las dos técnicas de cuantificación. El primer enfoque etiquetado como "área de pico de deconvolución" utiliza 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 etiquetado como "área de pico de iones extraídos" se refiere al uso de 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 ensayos de 10 preparaciones de adalimumab en Melon Gel replicadas que se añadieron a suero normal a 0,1 g/dl y se encontró que el CV para el área del pico de la cadena ligera era del 6,2%, mientras que el CV para la cadena pesada era del 11%. El límite de cuantificación definido por un CV < 20% para 10 réplicas utilizando las áreas de pico de deconvolución fue de 0,005 g/dl para la cadena ligera y de 0,025 g/dl para la cadena pesada de adalimumab añadida a suero normal.

#### Ejemplo 5. Seguimiento 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 figura 1. El espectro de la figura 1A representa una porción de los espectros de masas sumados a lo largo del pico de CL de inmunoglobulina y muestra una serie de iones de carga múltiple. La masa molecular convertida se muestra en la figura 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 del panel C muestra otra porción del pico de CL de inmunoglobulina sumado y muestra una serie diferente de iones de carga múltiple. Se encontró que la masa molecular para esta serie mostrada en la figura 1D tenía dos componentes, uno a 51.596,07 Da y otro a 51.758,27 Da, los cuales están de acuerdo con la cadena pesada de IgG. La diferencia de 162,20 Da entre las series 2 y 3 puede deberse a dos proteoformas de la cadena pesada que difieren en el número de unidades de hexosa (PM promedio, 162,14 Da) en la cadena de hidratos de carbono. Estaban disponibles 25 muestras adicionales tomadas durante un período de 7 años para ensayo de este paciente. La figura 16 muestra el resultado utilizando espectrometría de masas para una muestra tomada después de que el paciente hubiera sido tratado de mieloma múltiple y se encontró que era negativa por PEL, IFE y el inmunoensayo de FLC cuantitativo. Sin embargo, los iones de carga múltiple de la cadena ligera son claramente evidentes en el espectro de masas mostrado en la figura 16A. Después de la conversión en masa molecular, se observa un pico distinto a 23.452,17 Da que difiere en 0,47 Da en comparación con el valor calculado en el espectro de la muestra de diagnóstico inicial tomada más de 6 años antes. La tabla 1 enumera un resumen de los resultados del seguimiento de la proteína M en suero por PEL, IFE y EM de microLC-ESI-Q-TOF y muestra que la cadena ligera se observa en todas las fechas de muestreo, incluidas todas las fechas en las que PEL e IFE fueron negativos. Además, 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 cálculos de masa molecular durante el período de muestra de 7 años. La cadena pesada se observó en las muestras positivas a PEL e IFE, y en esas muestras, los cálculos de masa molecular fueron coherentes a lo largo del período de 7 años. Esto apoya la suposición de que la masa molecular de la proteína M es un marcador altamente sensible del clon de células plasmáticas. Además, se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar la correlación en respuesta entre el valor del pico 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 tenían  $r^2 = 0,9205$  y  $0,9222$ , respectivamente.

Se realizaron experimentos adicionales utilizando muestras de orina y suero emparejadas tomadas de un paciente con una gammapatía monoclonal conocida para determinar si la masa molecular de la cadena ligera monoclonal se mantendría constante después de eliminarla a través del riñón a 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 microLC-ESI-Q-TOF fueron negativas por PEL e IFE para una inmunoglobulina monoclonal tanto en suero como en orina. Nuestros hallazgos 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 utilizar para realizar un seguimiento de una inmunoglobulina monoclonal independientemente del tipo de muestra y que la EM de microLC-ESI-Q-TOF es un procedimiento para identificar una inmunoglobulina monoclonal en la orina.

Tabla 1. Comparación de los resultados de PEL e IFE de la proteína M con las áreas de pico y las masas moleculares observadas para la proteína M por EM de microLC-ESI-Q-TOF<sup>a</sup>

fecha de muestreo	pico M (g/dl)	IFE	cadena ligera		cadena pesada	
			área de pico	masa molecular (Da)	masa molecular (Da)	
23/2/2005 <sup>b</sup>	4,35	pos	3010899	23452,64	51595,07	51758,27
29/3/2006	0,26	pos	34839	23452,10		
24/4/2007	0	neg	9301	23451,78		
11/10/2007	0	neg	11496	23452,31		
23/4/2008	0,54	pos	152021	23452,20	51595,46	51757,84
7/5/2009	0,43	pos	322375	23452,34	51596,66	51758,52
27/7/2010	3,24	pos	3121072	23452,50	51596,56	51758,91
22/8/2011 <sup>c</sup>	0	neg	2112	23452,17		
5/3/2012	0,79	pos	600281	23452,50	51596,44	51758,74

<sup>a</sup>Los resultados son de muestras de suero obtenidas de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple tomadas durante un período de 7 años. <sup>b</sup>La fecha de la muestra 23/2/2005 se utilizó en la figura 2. <sup>c</sup>La fecha de la muestra 22/08/2011 se utilizó en la figura 3.

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

5 La EM de arriba hacia abajo se realizó en un ion de carga múltiple de la cadena ligera de adalimumab, que tiene un isotipo kappa. Los resultados de un análisis de arriba hacia abajo utilizando adalimumab añadido a suero normal se muestran en la figura 17. La figura 17A muestra los iones de carga múltiple de la cadena ligera kappa junto con una flecha hacia el fragmento de espectro de masas de iones producido a partir de la CID del precursor en  $m/z = 1233$  mostrado en la figura 17B. Los iones de fragmentos se marcan con sus masas monoisotópicas, que coinciden estrechamente con las masas monoisotópicas calculadas para iones y de la región constante de la cadena ligera kappa. Para determinar si esto seguiría siendo válido para otros pacientes con cadenas ligeras kappa, se analizó un conjunto de 20 pacientes IgG kappa mediante 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 ion precursor de carga múltiple diferente debido a una secuencia de aminoácidos de la región variable diferente de un individuo. Sin embargo, independientemente del ion precursor específico del paciente, se identificaron los mismos iones y que coinciden con la región constante kappa. 10 15 Los 20 pacientes analizados mostraron los mismos iones específicos de fragmentos kappa. Los experimentos por EM CL-ESI-Q-TOF también se realizaron en una cadena ligera lambda disponible comercialmente. El espectro de masas de la parte superior de la figura 18 muestra la cadena ligera lambda de carga múltiple con el fragmento de espectro del ion en la parte inferior de la figura 18. La comparación inicial entre las masas monoisotópicas para los iones de fragmentos observados y los posibles iones de la región constante lambda 5' no produjo coincidencias. Se utilizó 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 figura 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 están marcadas en el espectro. Aunque la intensidad de la serie 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 mediante un fragmento de EM de arriba hacia abajo, y se observaron en cada paciente los iones b que coinciden con la porción N-terminal de la región constante lambda. Además, las muestras de orina positivas por IFE se analizaron mediante EM de arriba hacia abajo y se encontró que las muestras positivas para lambda tenían iones de fragmentos específicos de lambda y las muestras positivas para kappa tenían iones de fragmentos específicos de kappa. Estos hallazgos nos llevaron a concluir que podría utilizarse EM de arriba hacia abajo para la isotipificación de cadenas ligeras kappa y lambda. 20 25 30

35 Los resultados mostrados en el presente documento proporcionan la evidencia empírica para confirmar la utilidad de la espectrometría de masas como una herramienta para realizar un seguimiento de una proteína M en pacientes con una gammapatía monoclonal. La masa molecular de la inmunoglobulina monoclonal, ya sea la cadena ligera, la cadena pesada o la molécula intacta, representa un marcador sensible y específico de clones de células plasmáticas secretoras de 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 del paciente. En el futuro, la espectrometría de masas podría desempeñar un papel importante en la cuantificación y el seguimiento de inmunoglobulinas en la salud y la enfermedad humanas. 40

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar la presencia o la ausencia de uno o más picos de proteína M en una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) aislar las inmunoglobulinas totales de la muestra;
- (b) desacoplar las inmunoglobulinas de la cadena ligera de las inmunoglobulinas de la cadena pesada en las inmunoglobulinas totales para generar una muestra de inmunoglobulinas desacopladas; y
- 10 (c) someter la muestra de inmunoglobulinas desacopladas a una técnica de espectrometría de masas para determinar la presencia o la ausencia de un pico de proteína M,
- comprendiendo también opcionalmente determinar la presencia o la ausencia de gammapatía monoclonal en la muestra basándose en la presencia o la ausencia de un pico de proteína M en el espectro de masas, en el que los picos de proteína M indican la presencia de inmunoglobulinas monoclonales por encima del fondo policlonal.
- 15 2. Un procedimiento para diagnosticar gammapatía monoclonal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- 20 (a) aislar inmunoglobulinas totales de una muestra;
- (b) desacoplar las inmunoglobulinas de la cadena ligera de las inmunoglobulinas de la cadena pesada en las inmunoglobulinas totales para generar una muestra de inmunoglobulinas desacopladas;
- 25 (c) someter la muestra de inmunoglobulinas desacopladas 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 una gammapatía monoclonal basándose en la presencia o la ausencia de un pico de proteína M, en el que el pico de proteína M indica la presencia de una inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal.
- 30 3. Un procedimiento para realizar un seguimiento de un tratamiento de gammapatía monoclonal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- 35 (a) aislar las inmunoglobulinas totales de una primera muestra antes del tratamiento y una segunda muestra durante o después del tratamiento;
- (b) desacoplar las inmunoglobulinas de la cadena ligera de las inmunoglobulinas de la cadena pesada en las inmunoglobulinas totales para generar una primera y una segunda muestra de inmunoglobulinas desacopladas;
- 40 (c) someter la primera y la segunda muestra de inmunoglobulina desacoplada a una técnica de espectrometría de masas para determinar un primer nivel de inmunoglobulina en la primera muestra de inmunoglobulina desacoplada, y un segundo nivel de inmunoglobulina en la segunda muestra de inmunoglobulina desacoplada; y
- 45 (d) comparar el primer nivel y el segundo nivel, llevándose a cabo el procedimiento de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.
4. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende aislar las inmunoglobulinas de la muestra mediante purificación por afinidad.
- 50 5. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la inmunoglobulina de cadena ligera se desacopla de la inmunoglobulina de cadena pesada con un agente reductor.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la técnica de espectrometría de masas comprende una cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) o una espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz (EM MALDI).
- 55 7. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra es una muestra de sangre completa, suero, plasma u orina, o un reactivo sintético.
- 60 8. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, en el que el aislamiento de inmunoglobulinas totales de la muestra comprende la purificación por fraccionamiento químico o por purificación por afinidad.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además el cribado de la muestra por electroforesis.
- 65

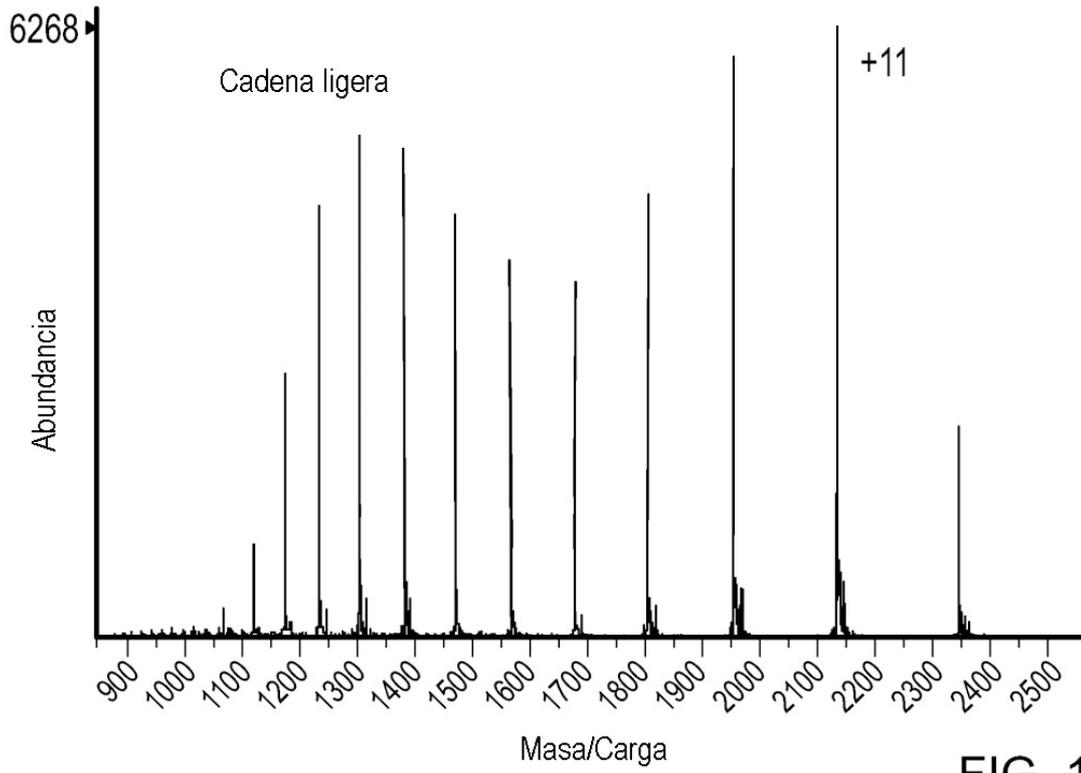


FIG. 1A

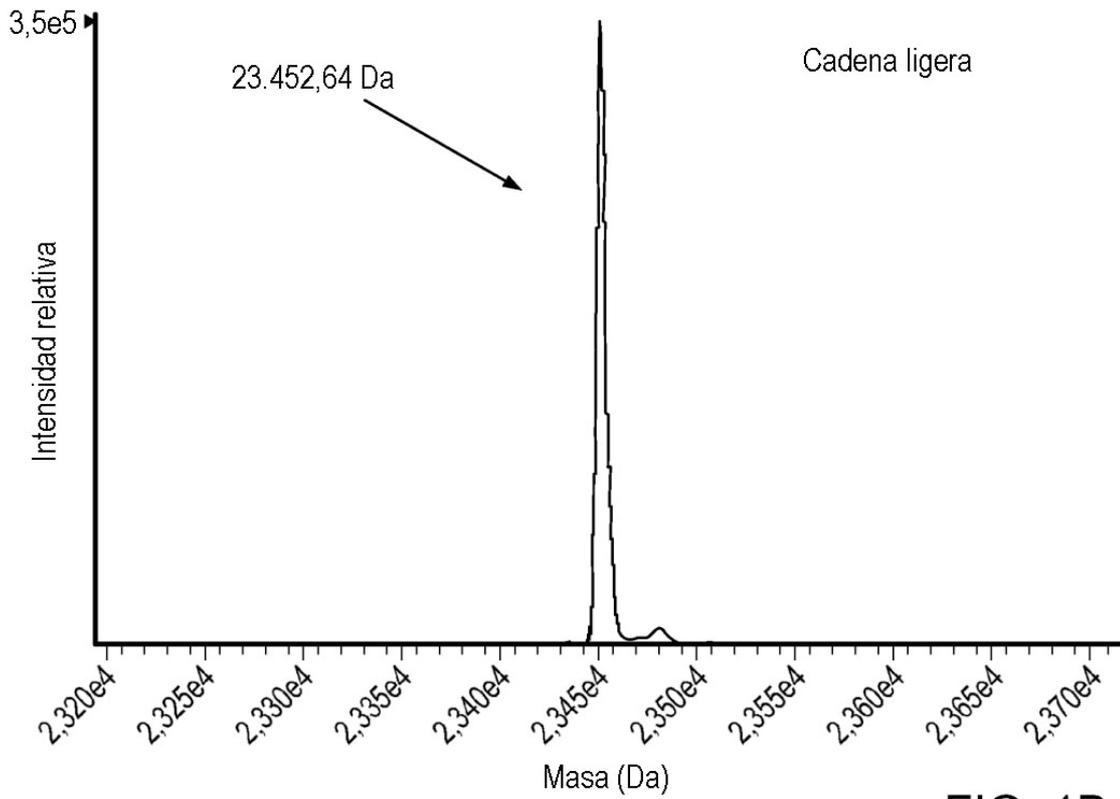


FIG. 1B

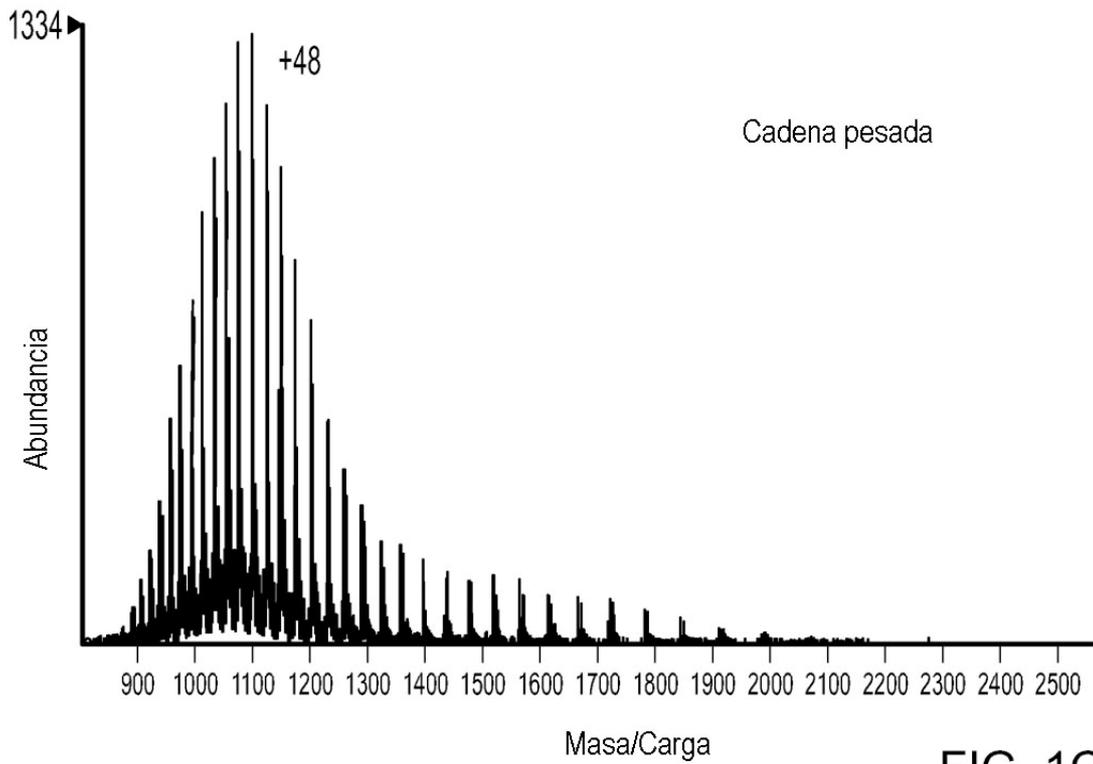


FIG. 1C

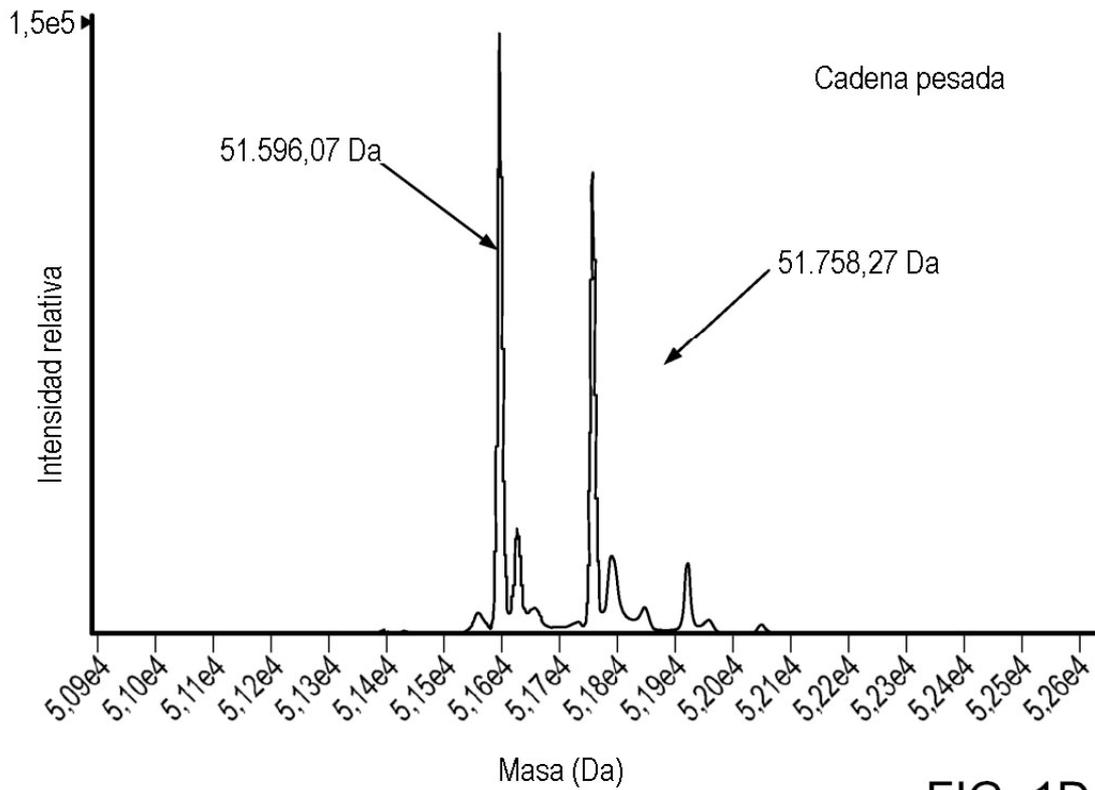


FIG. 1D

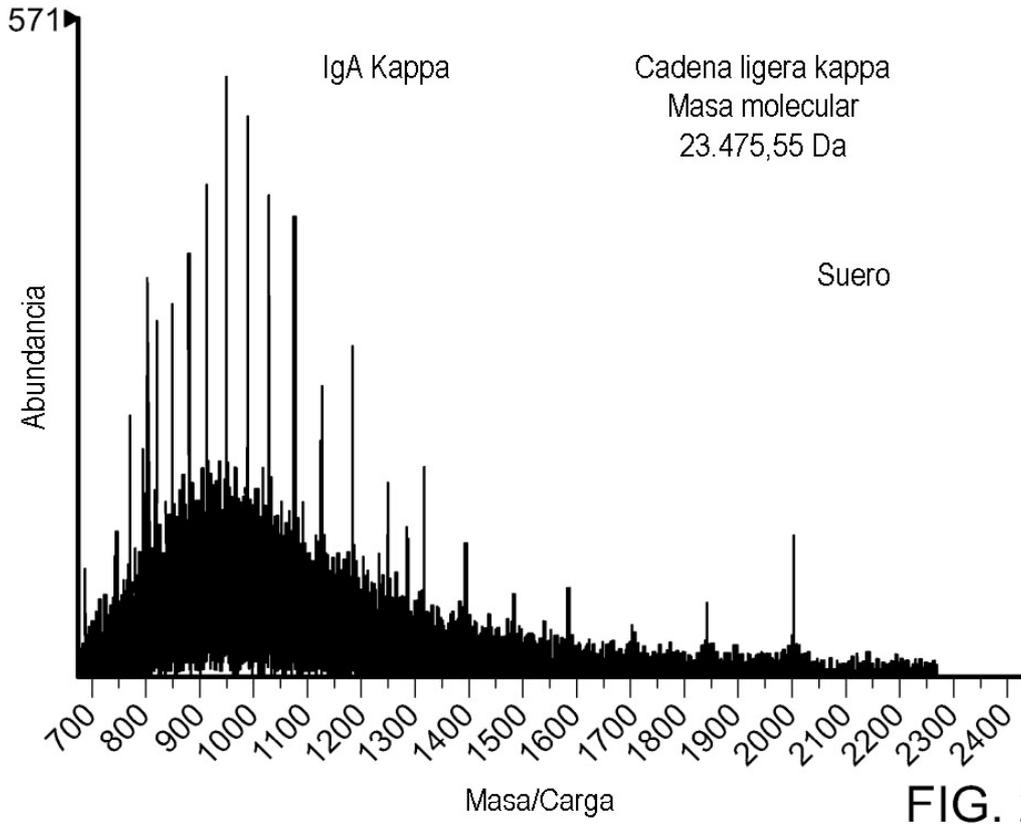


FIG. 2A

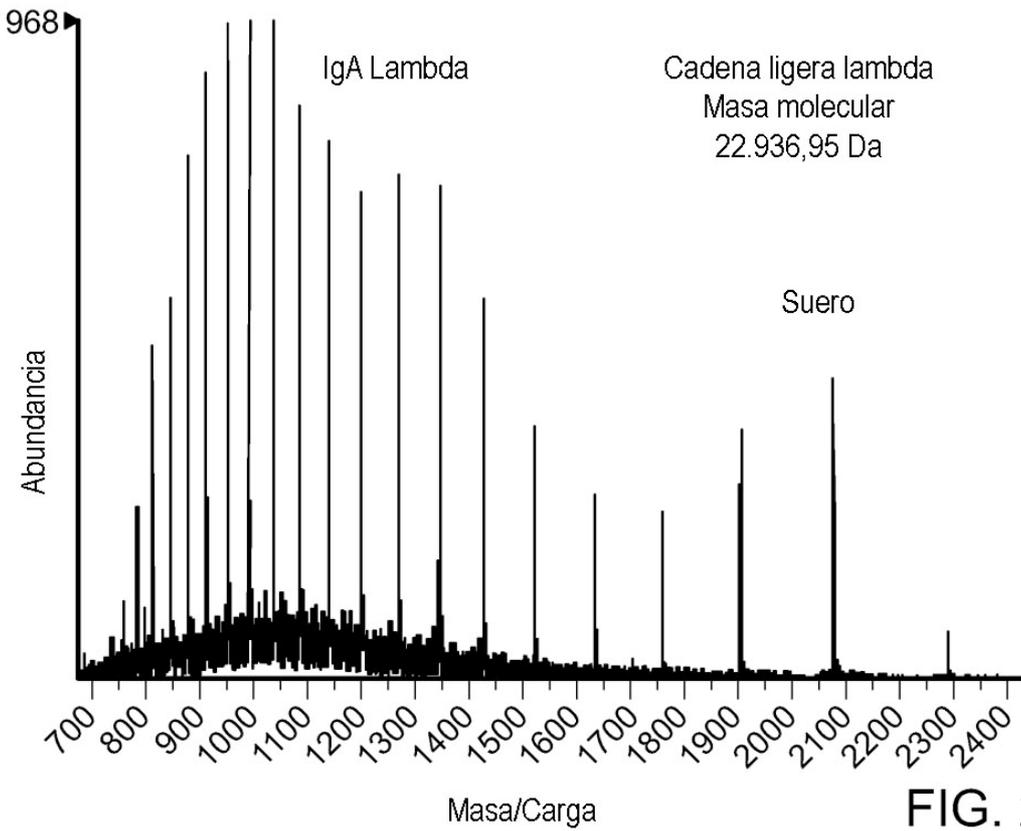


FIG. 2B

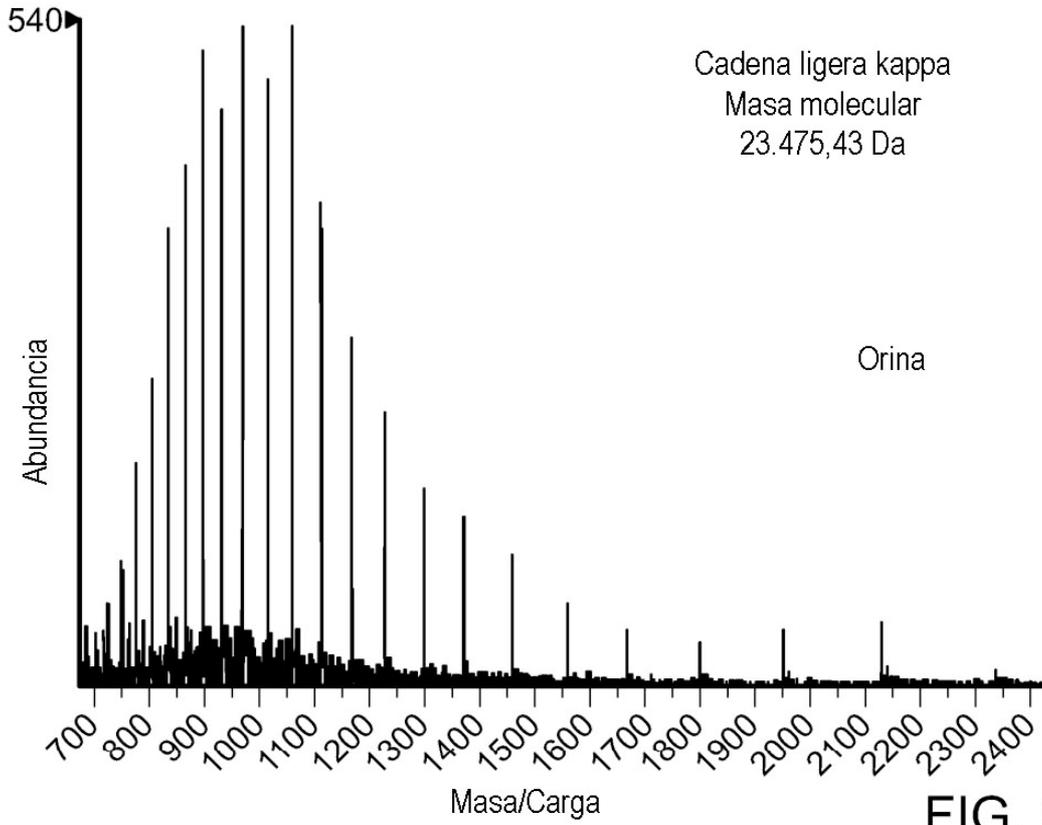


FIG. 2C

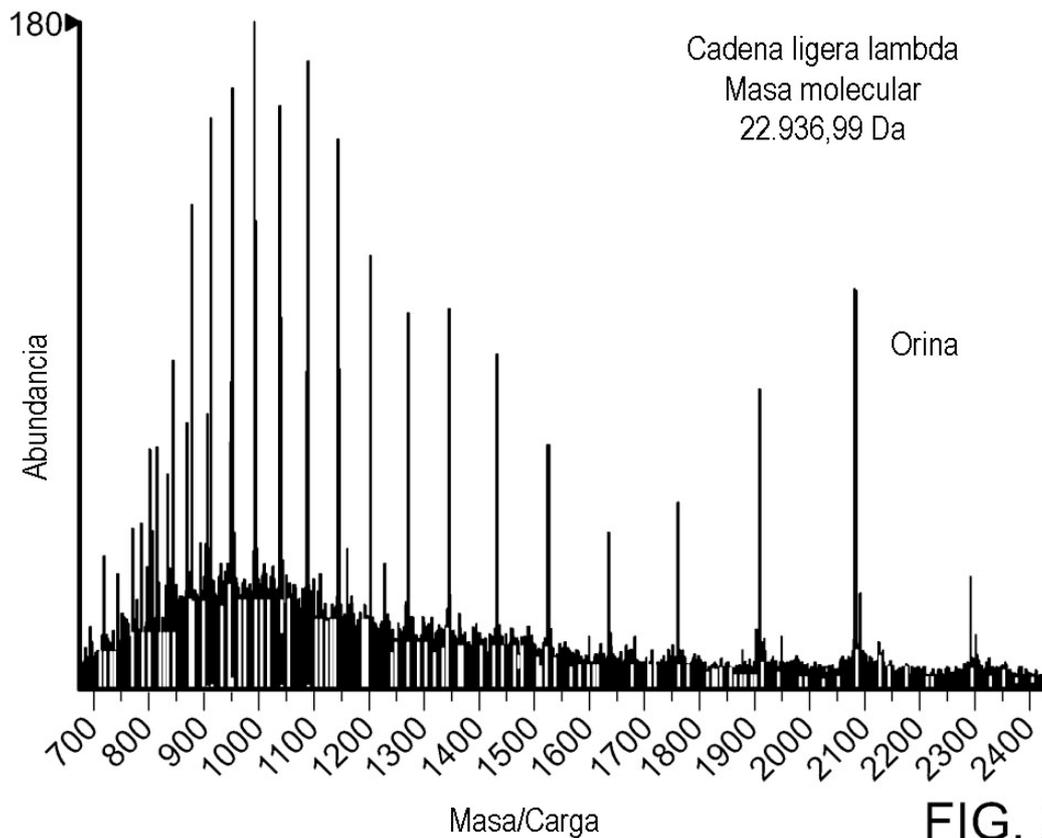


FIG. 2D

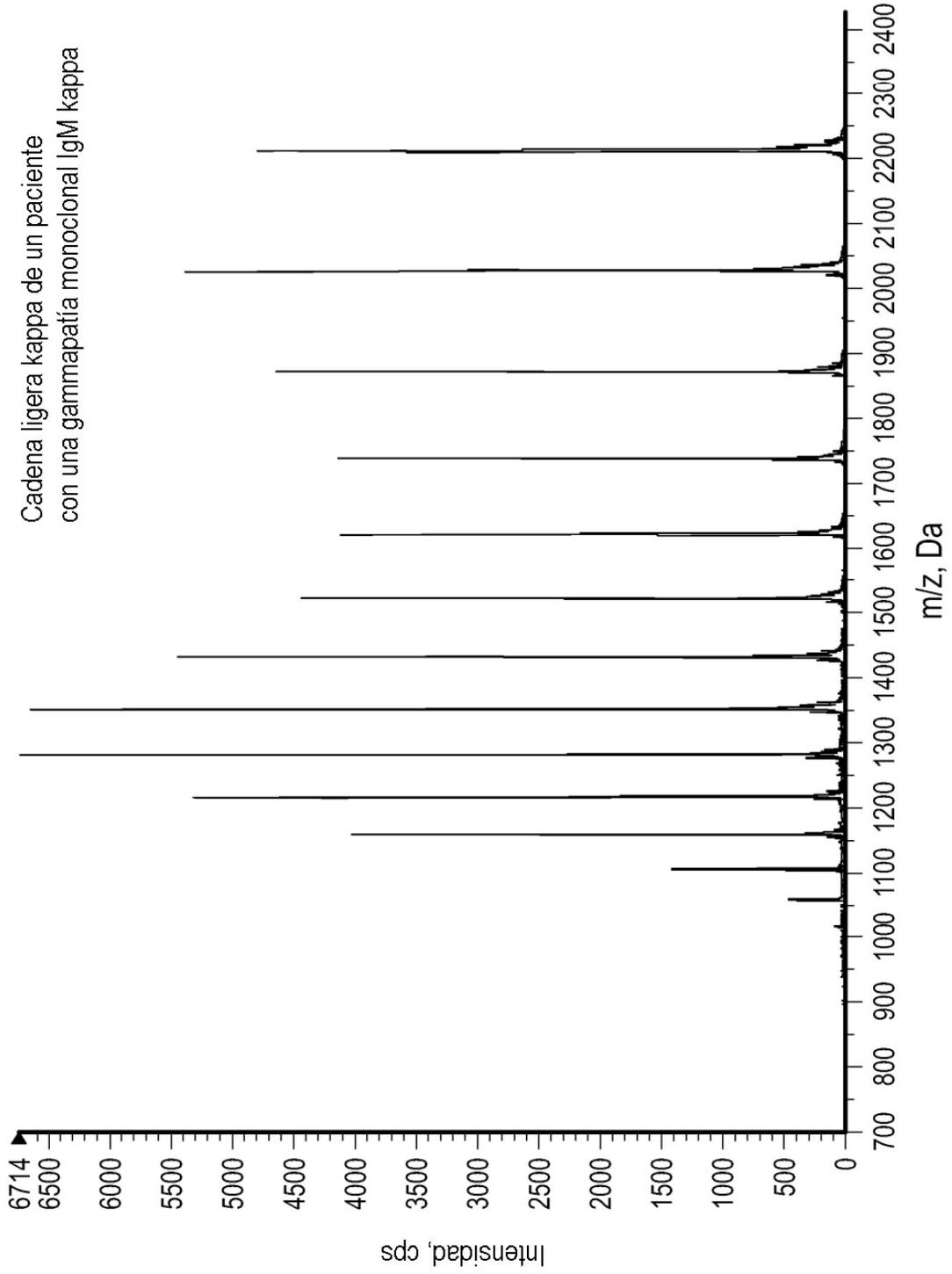


FIG. 3

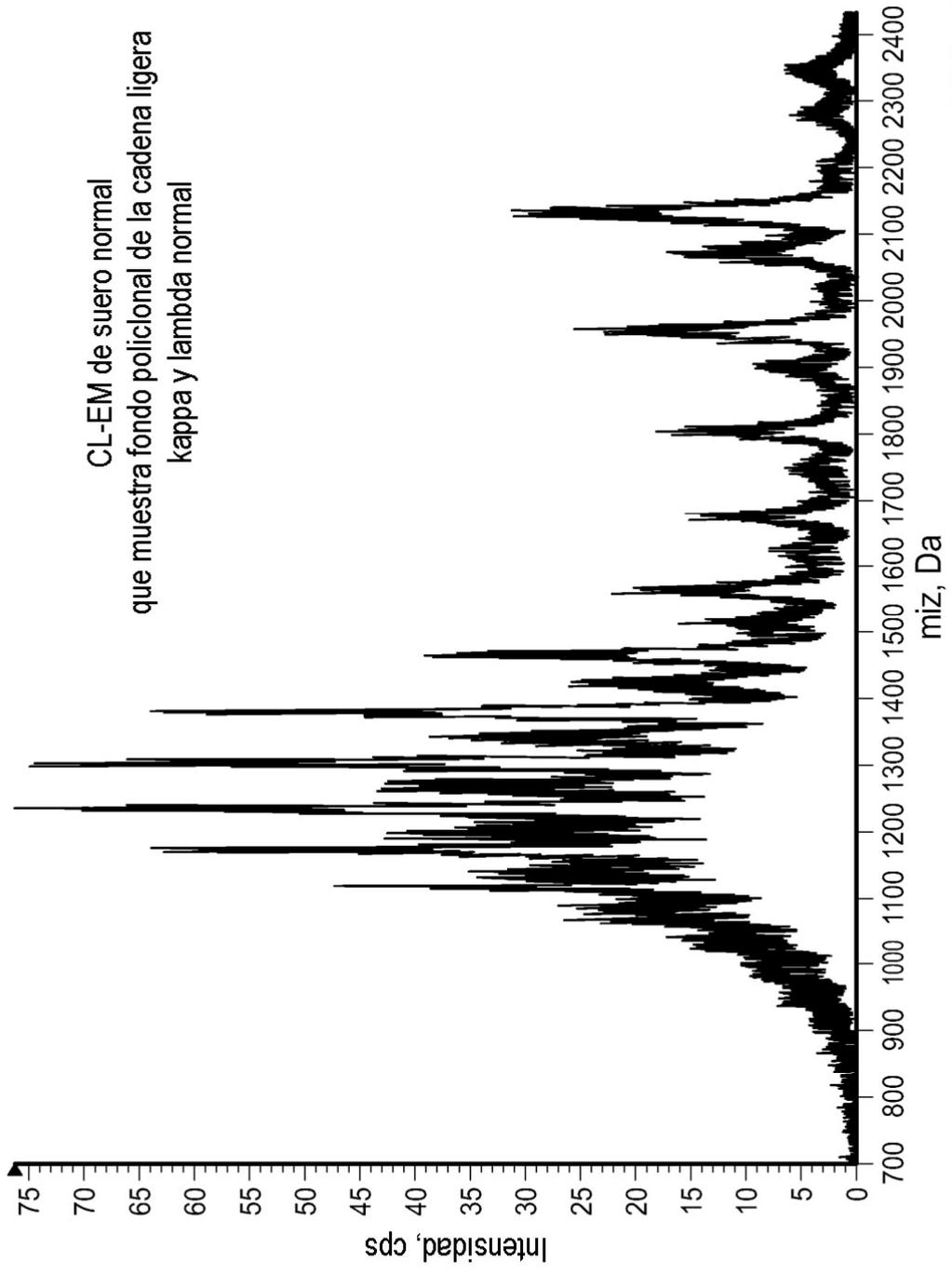


FIG. 4

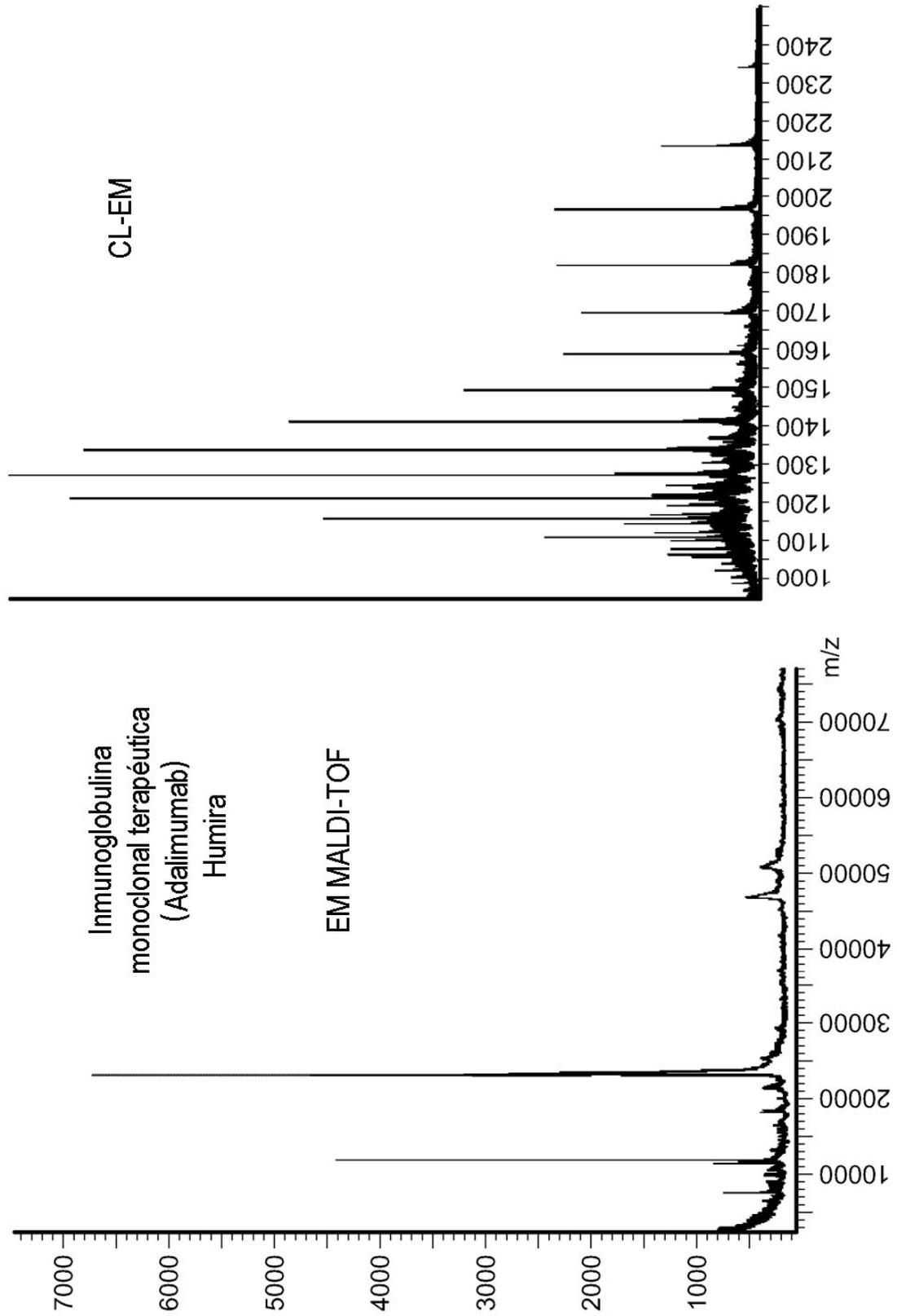


FIG. 5

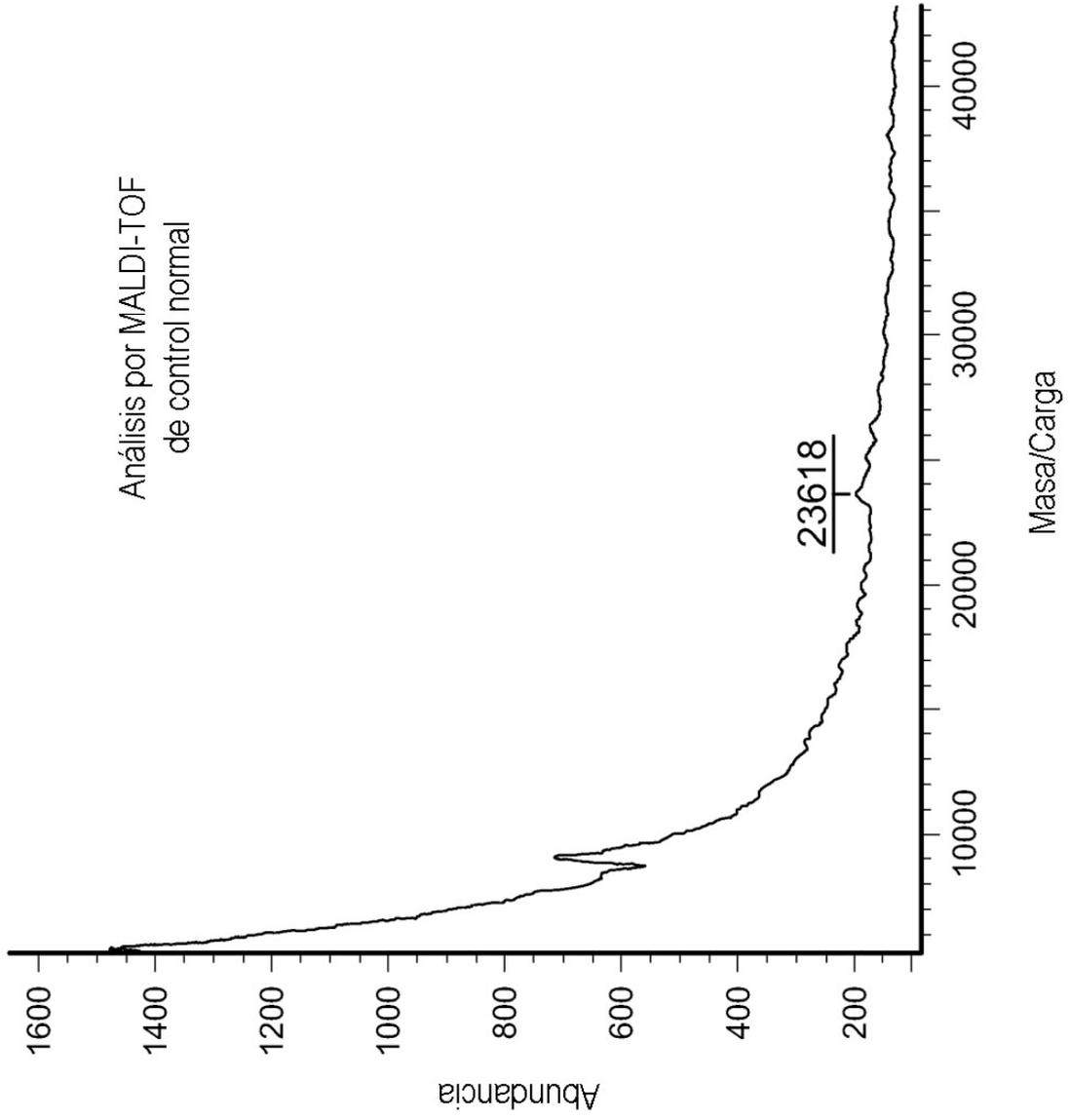


FIG. 6

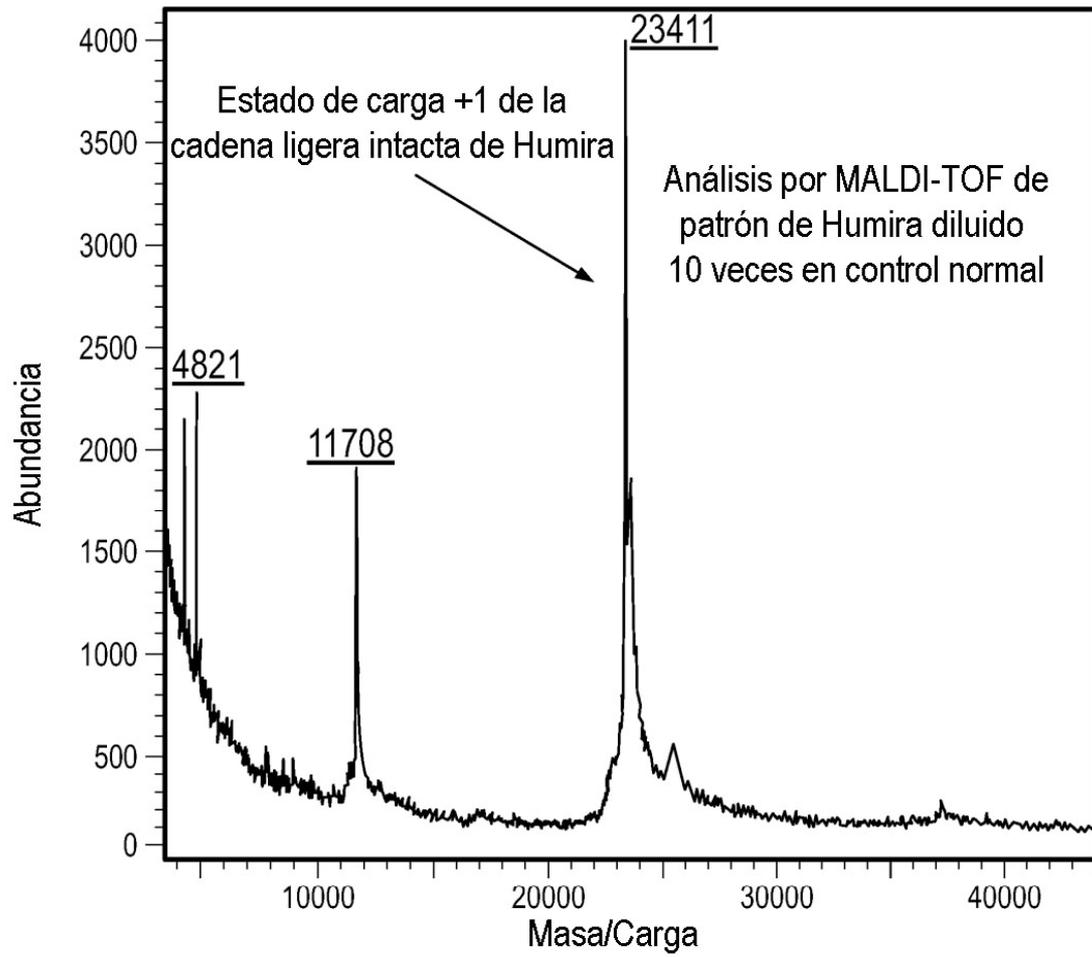


FIG. 7

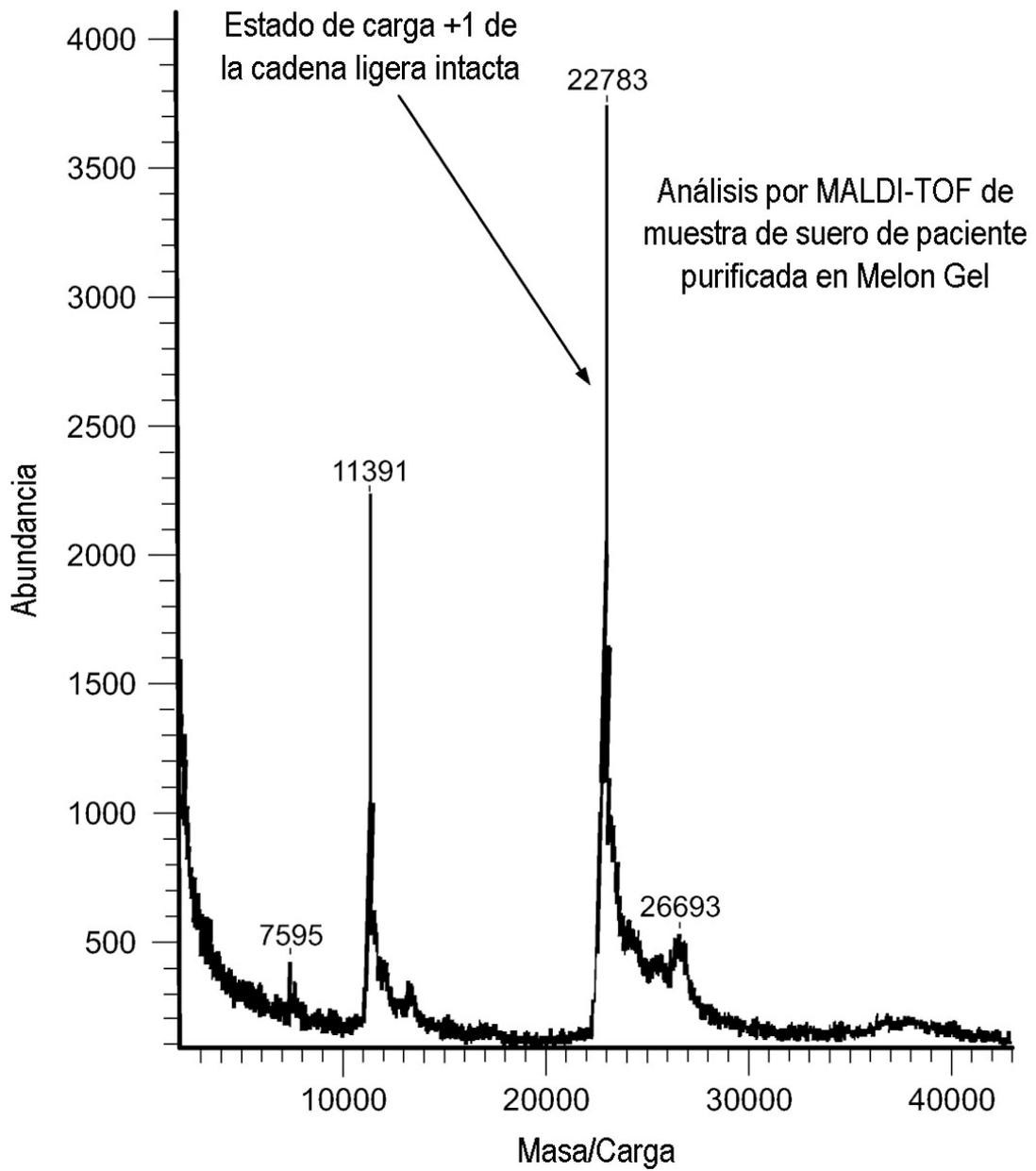


FIG. 8

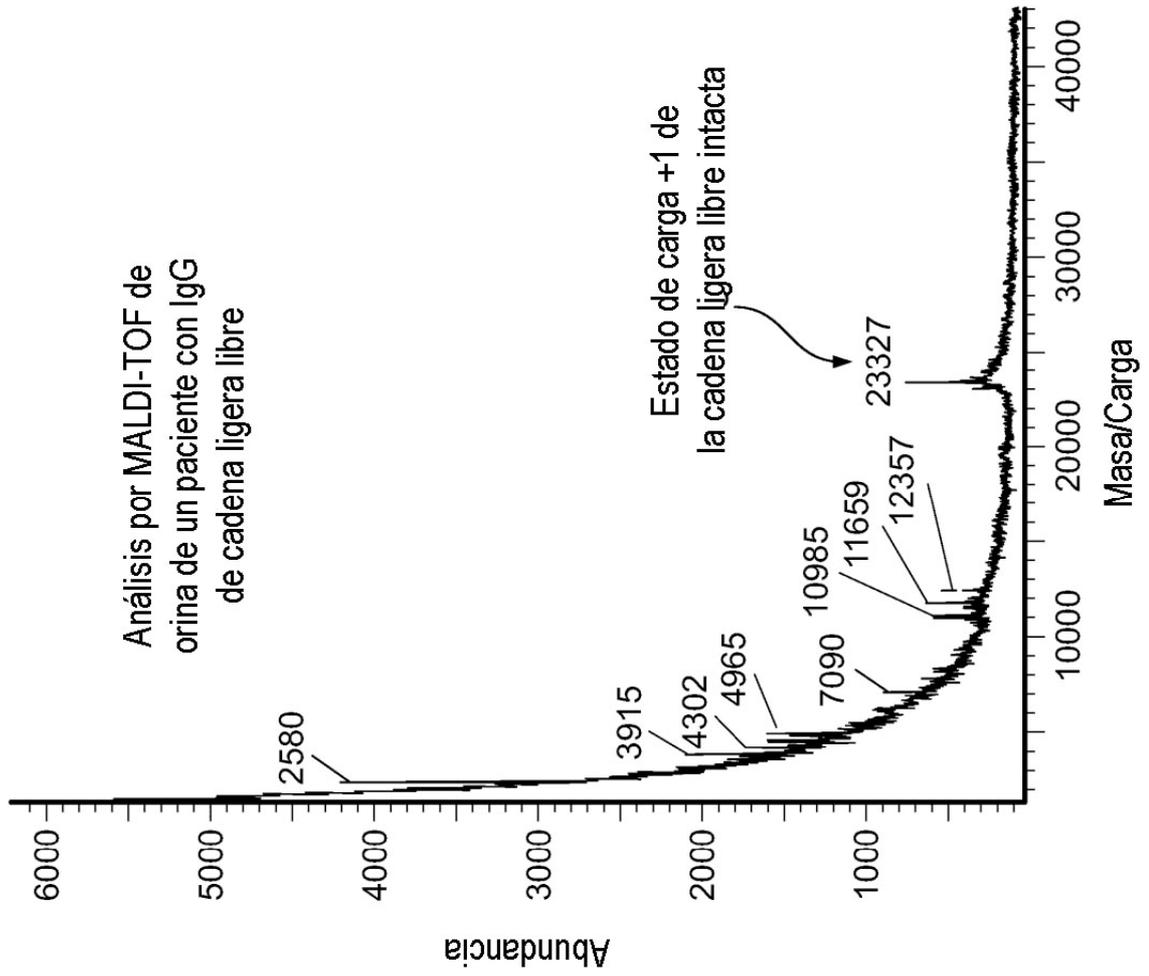


FIG. 9

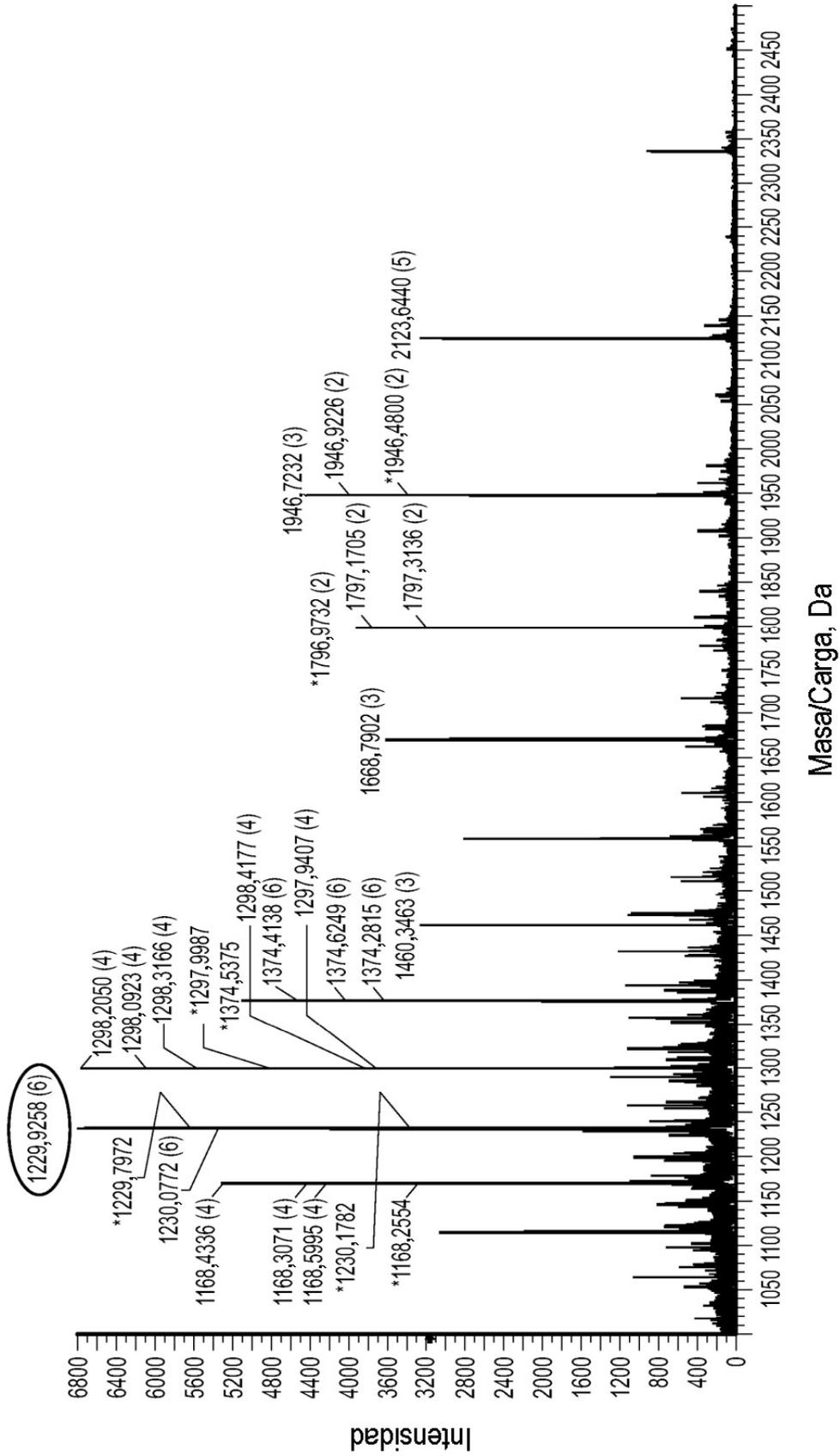


FIG. 10

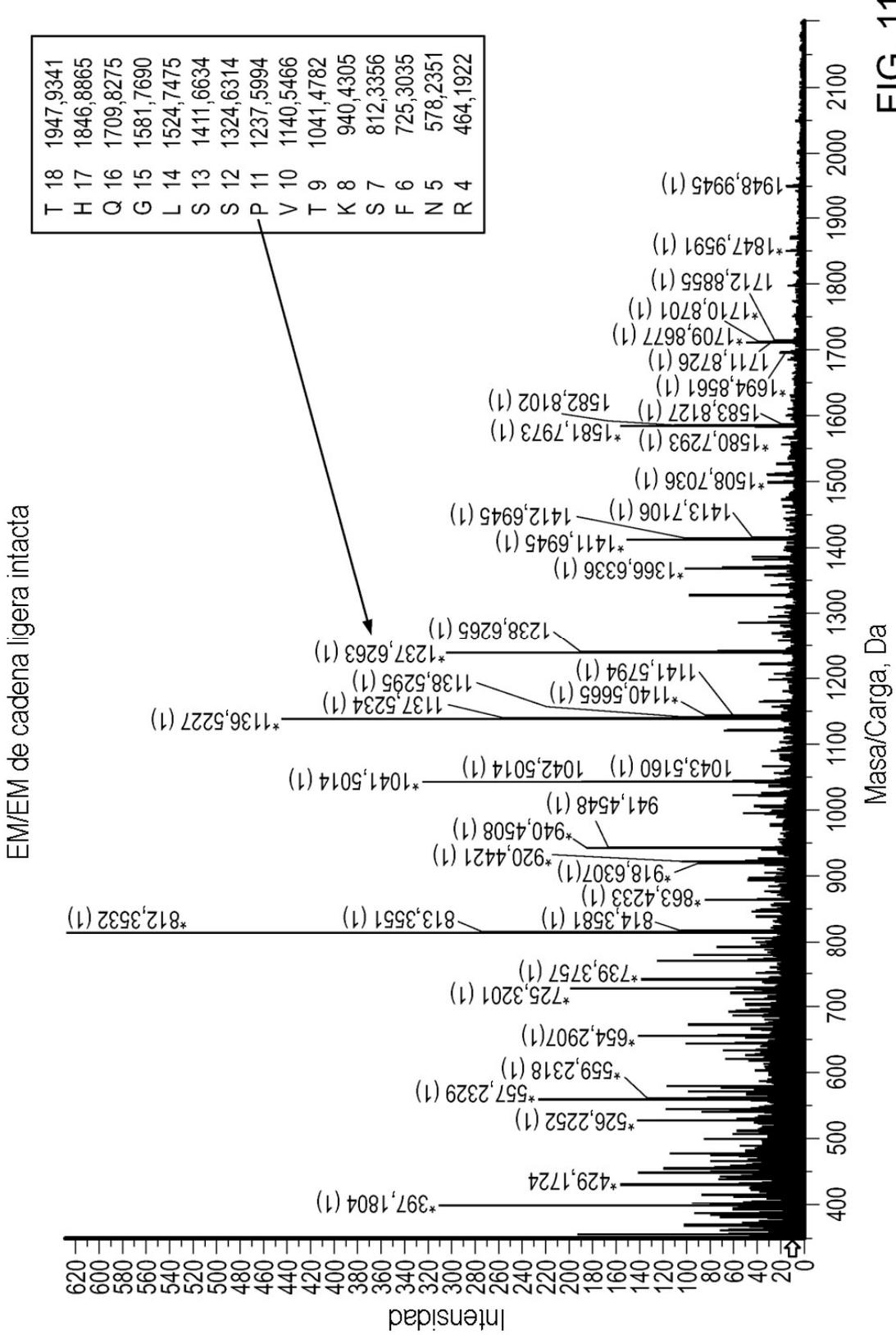


FIG. 11

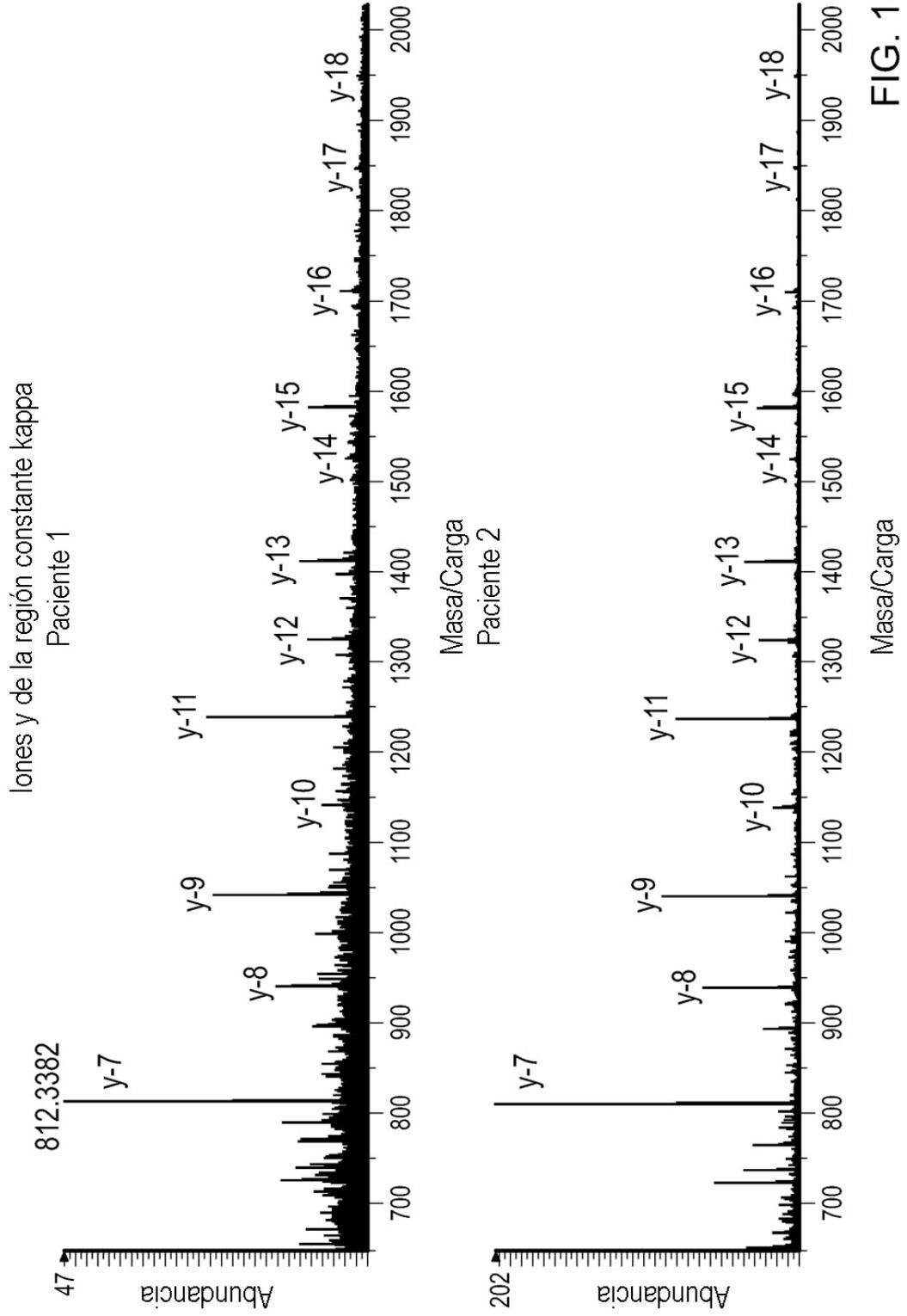


FIG. 12

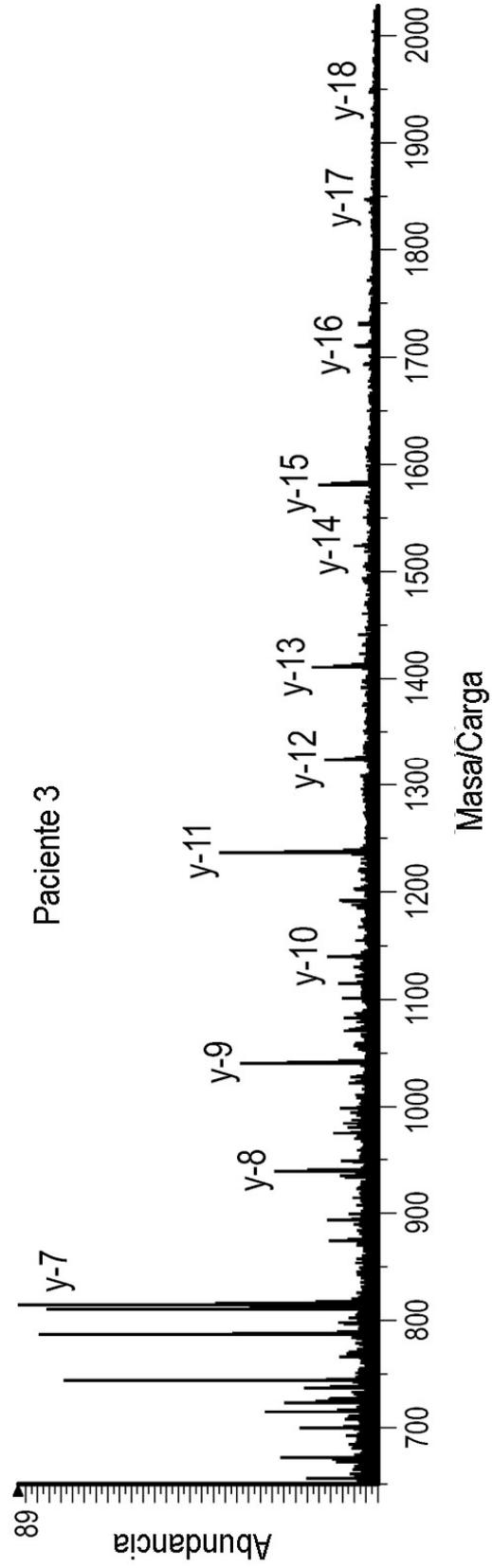


FIG. 12 (Cont.)

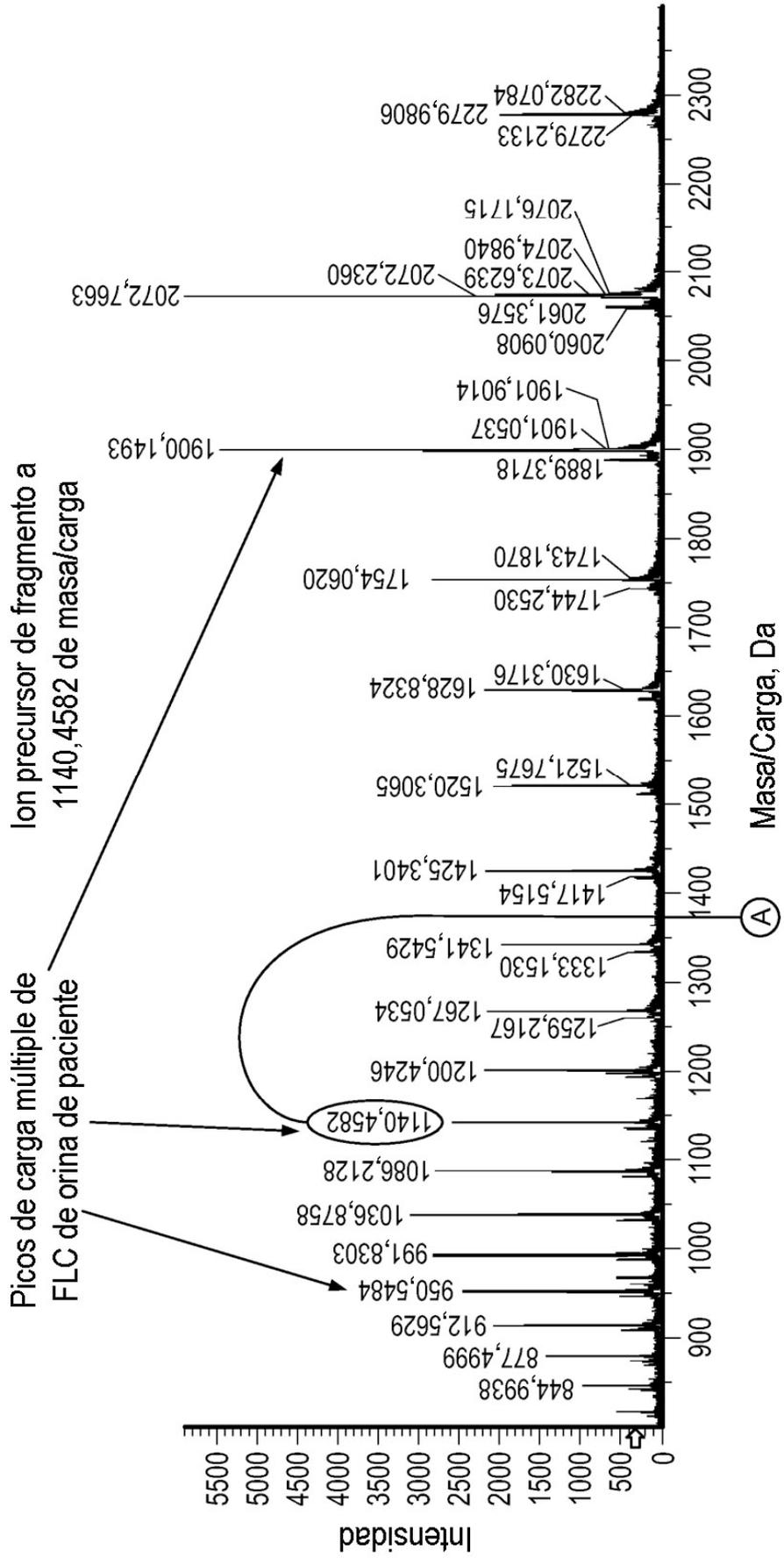


FIG. 13

(A)

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

ID	Nombre	m/z monoisotrópica
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

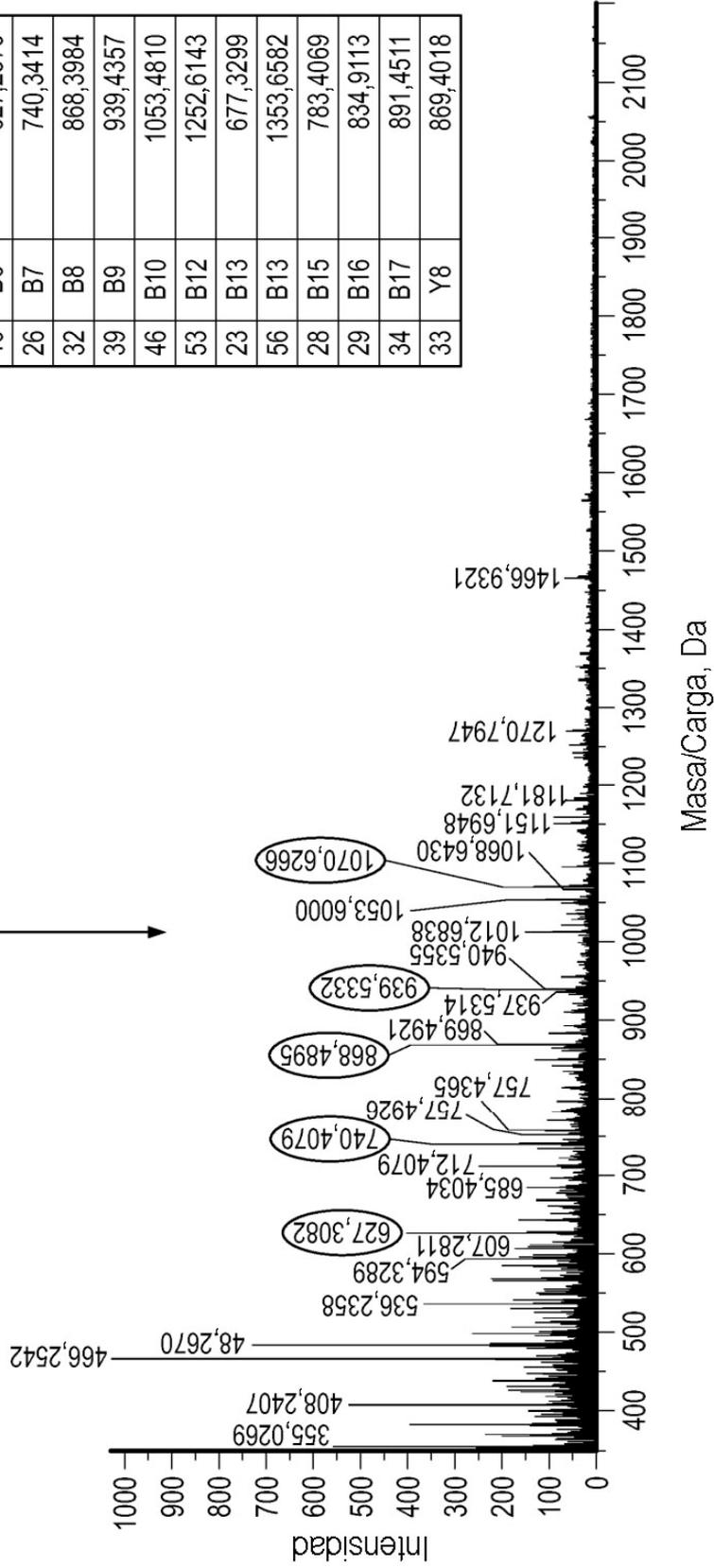


FIG. 13(Cont.)

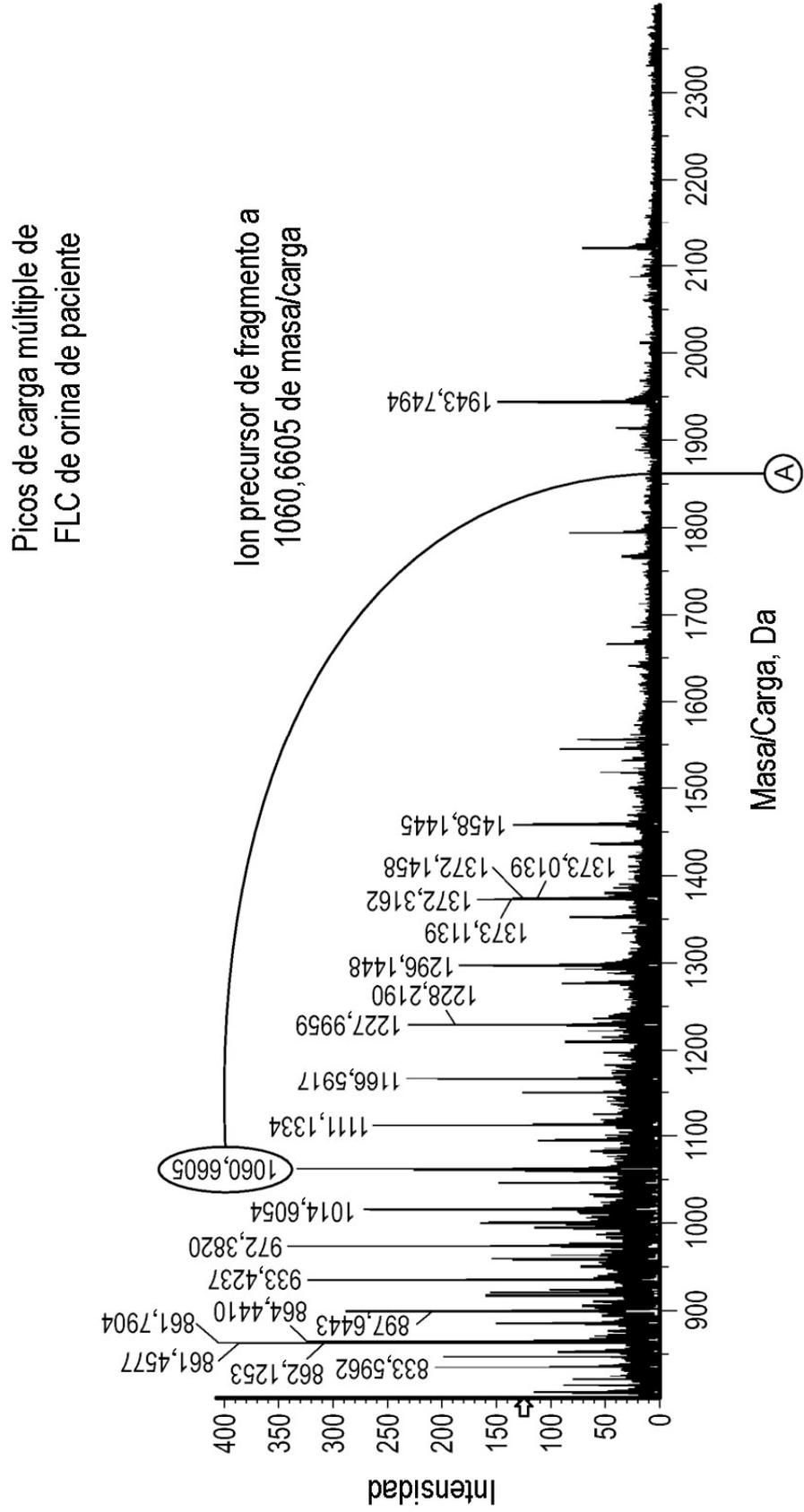
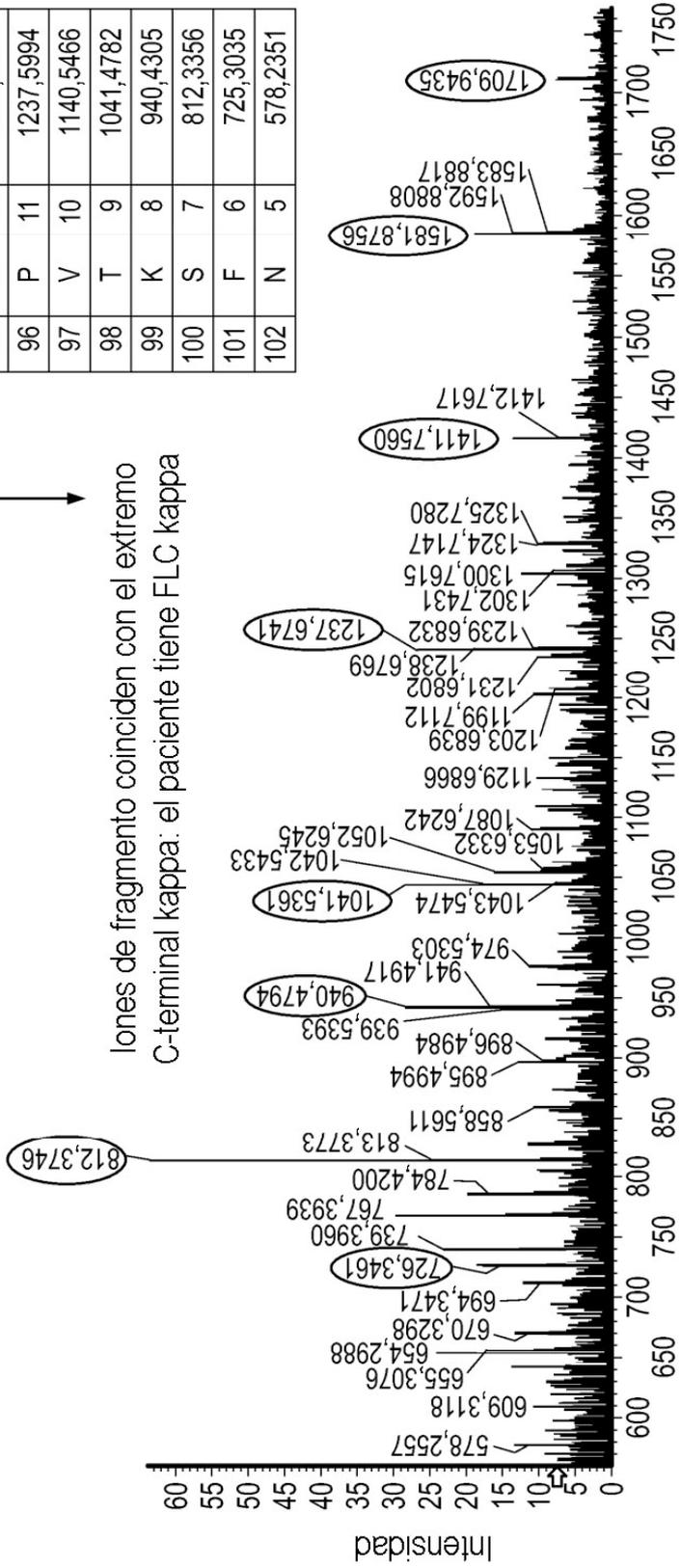


FIG. 14

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) →

lones de fragmento coinciden con el extremo C-terminal kappa: el paciente tiene FLC kappa



Masa/Carga, Da

FIG. 14(Cont.)

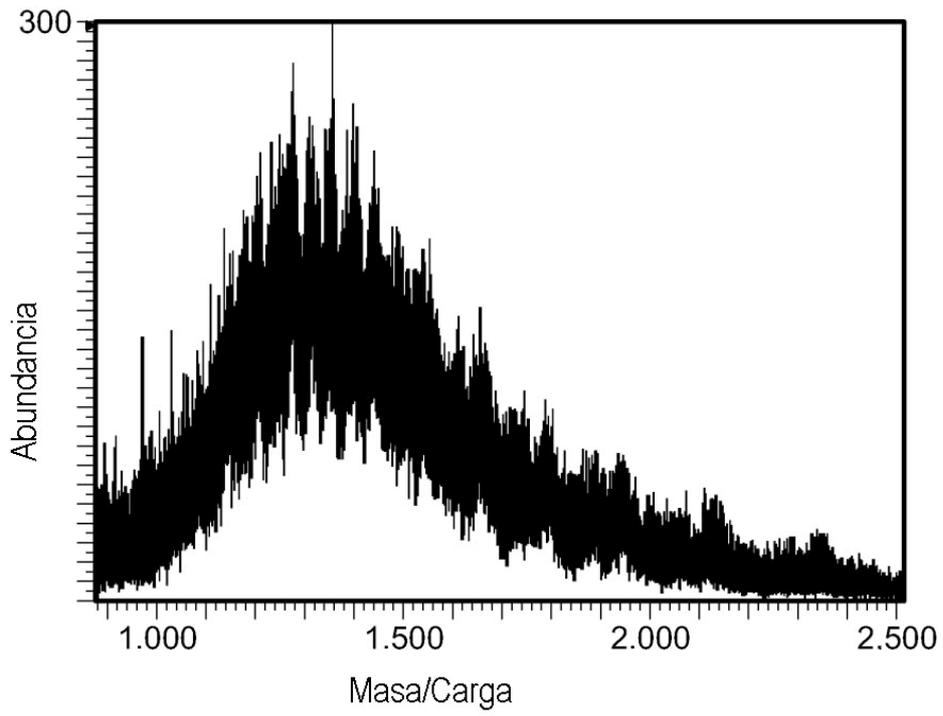


FIG. 15A

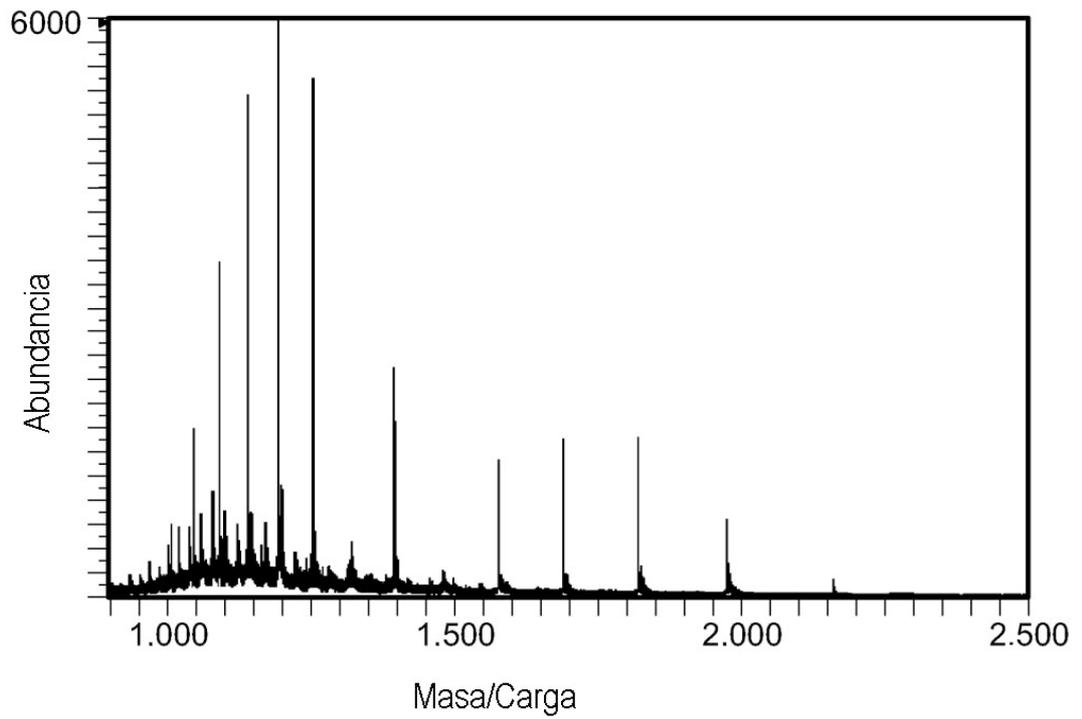


FIG. 15B

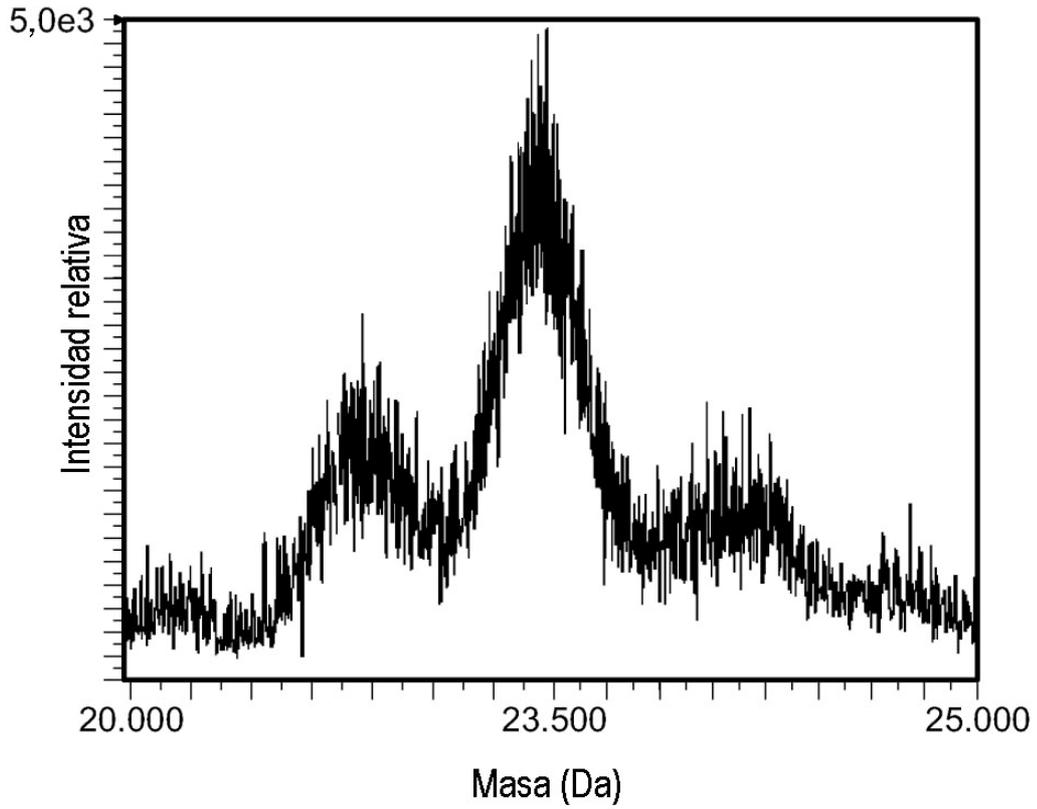


FIG. 15C

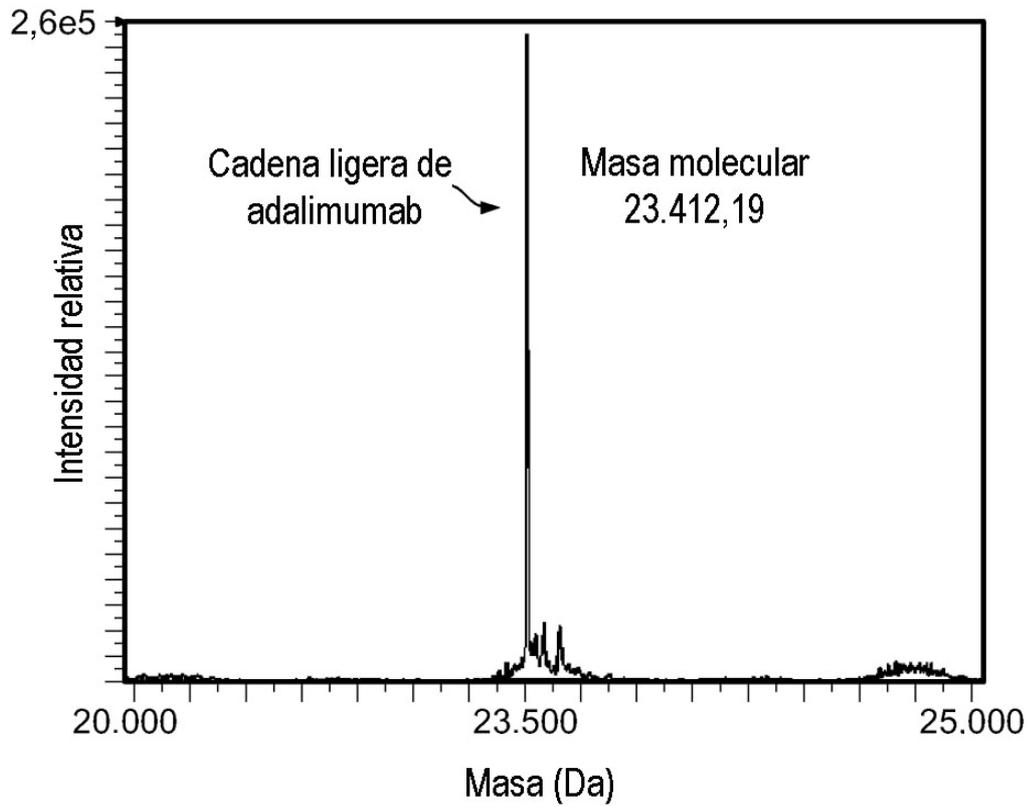


FIG. 15D

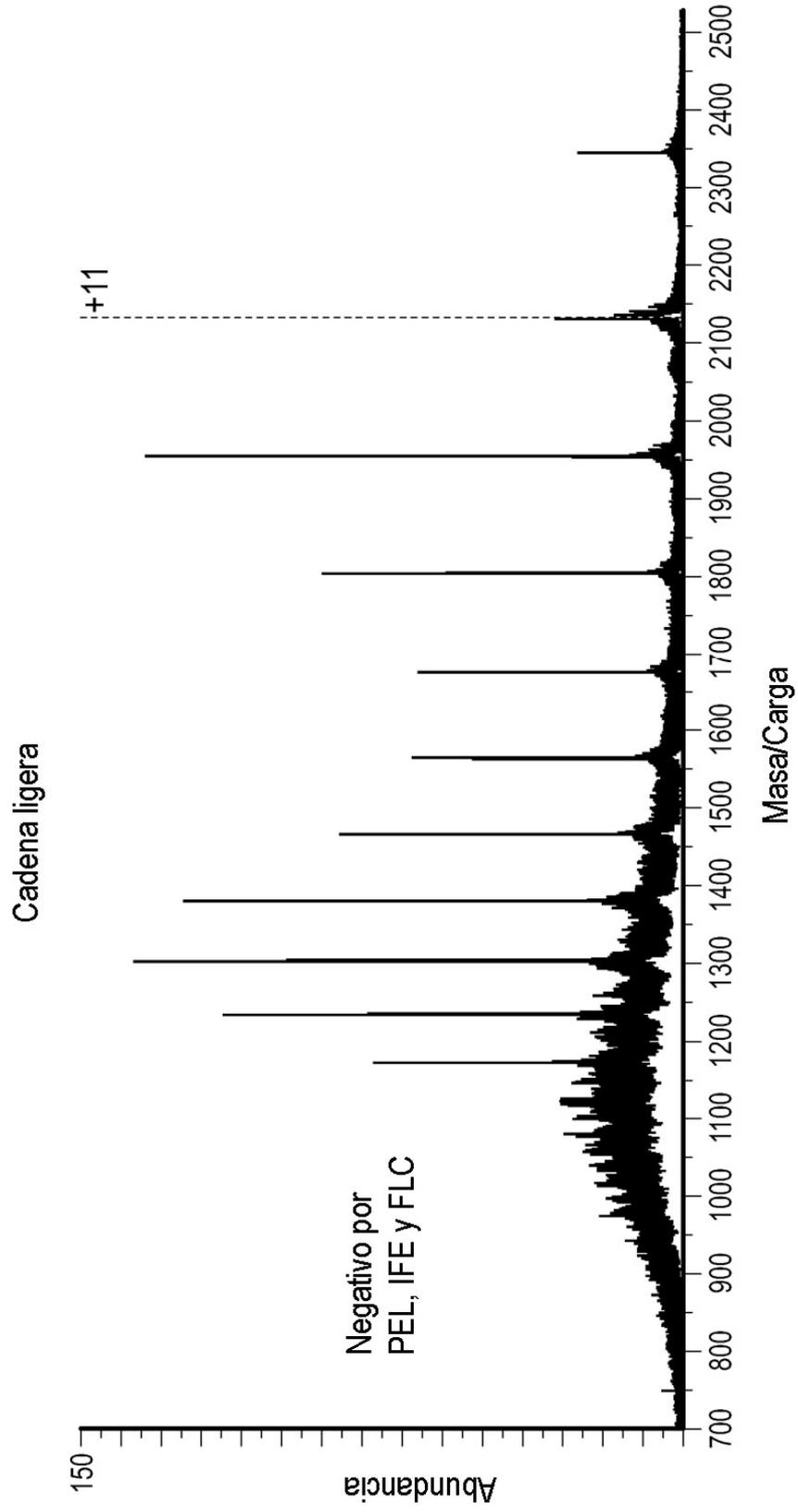


FIG. 16A

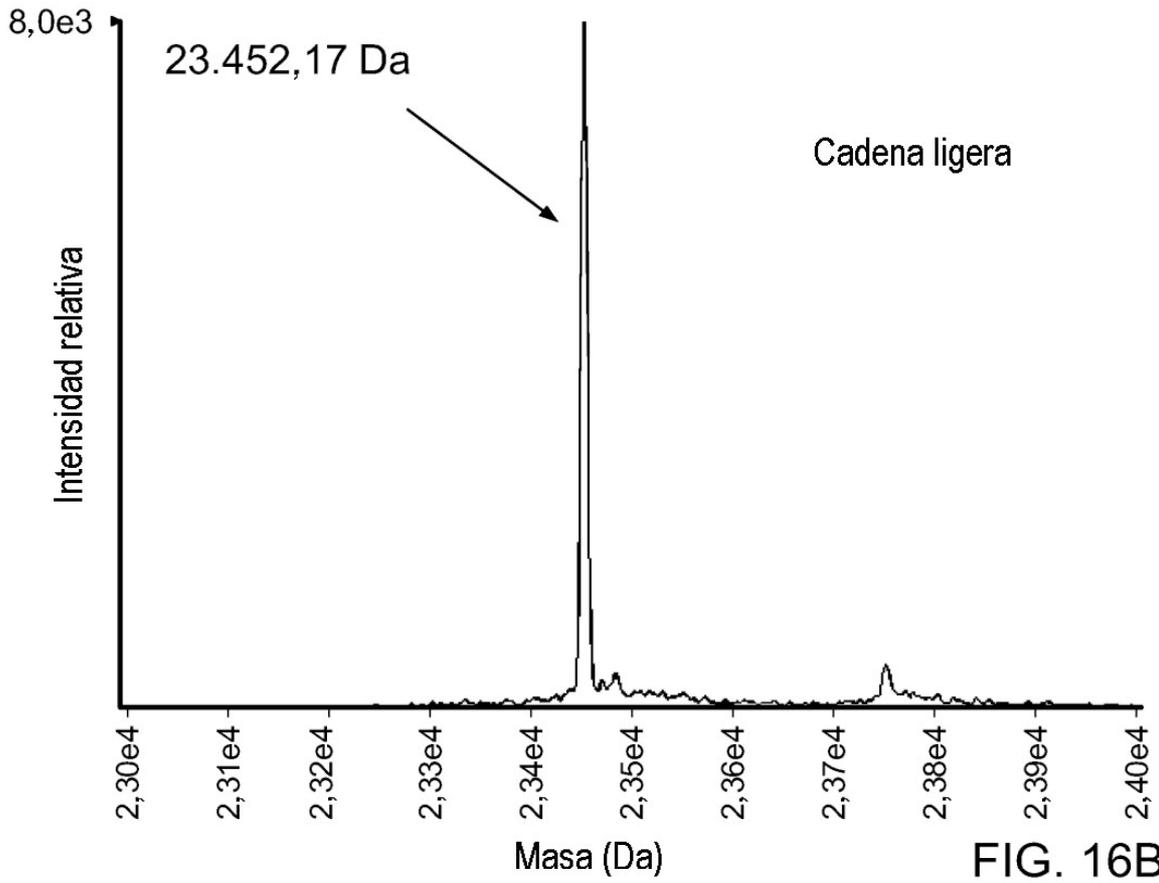


FIG. 16B

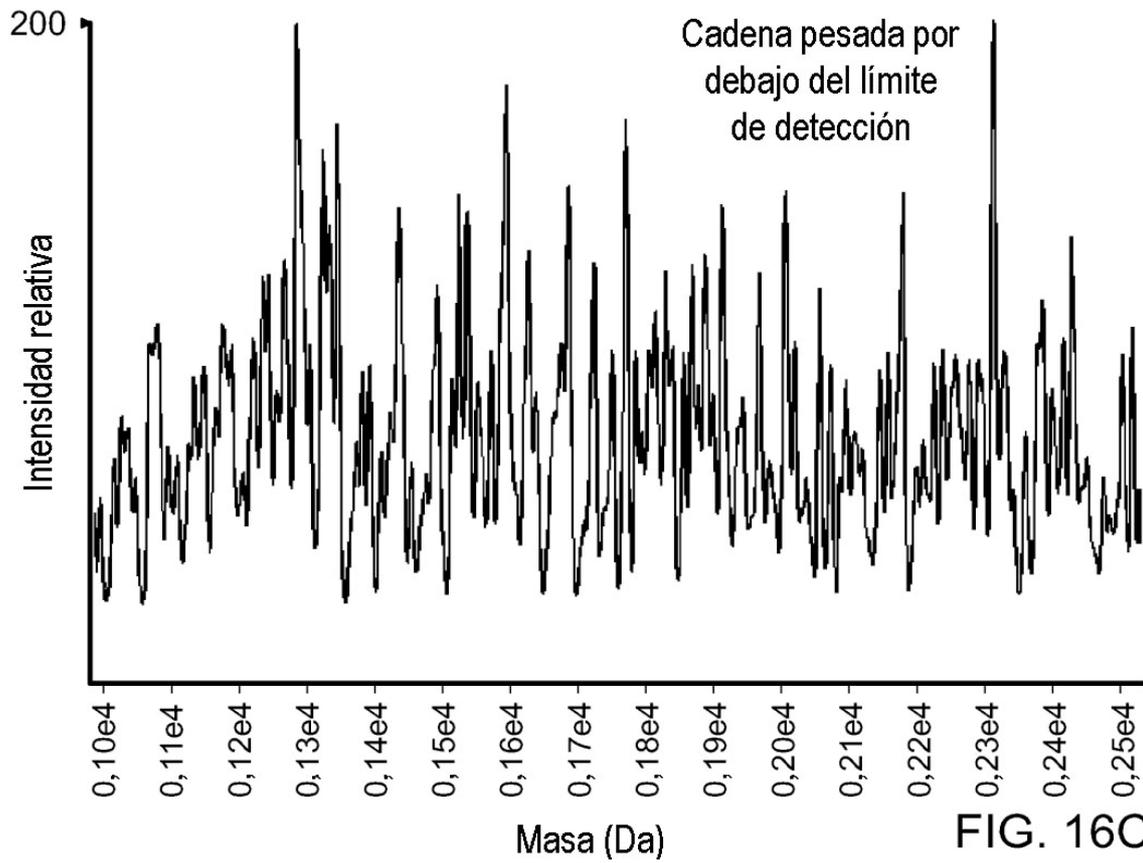


FIG. 16C

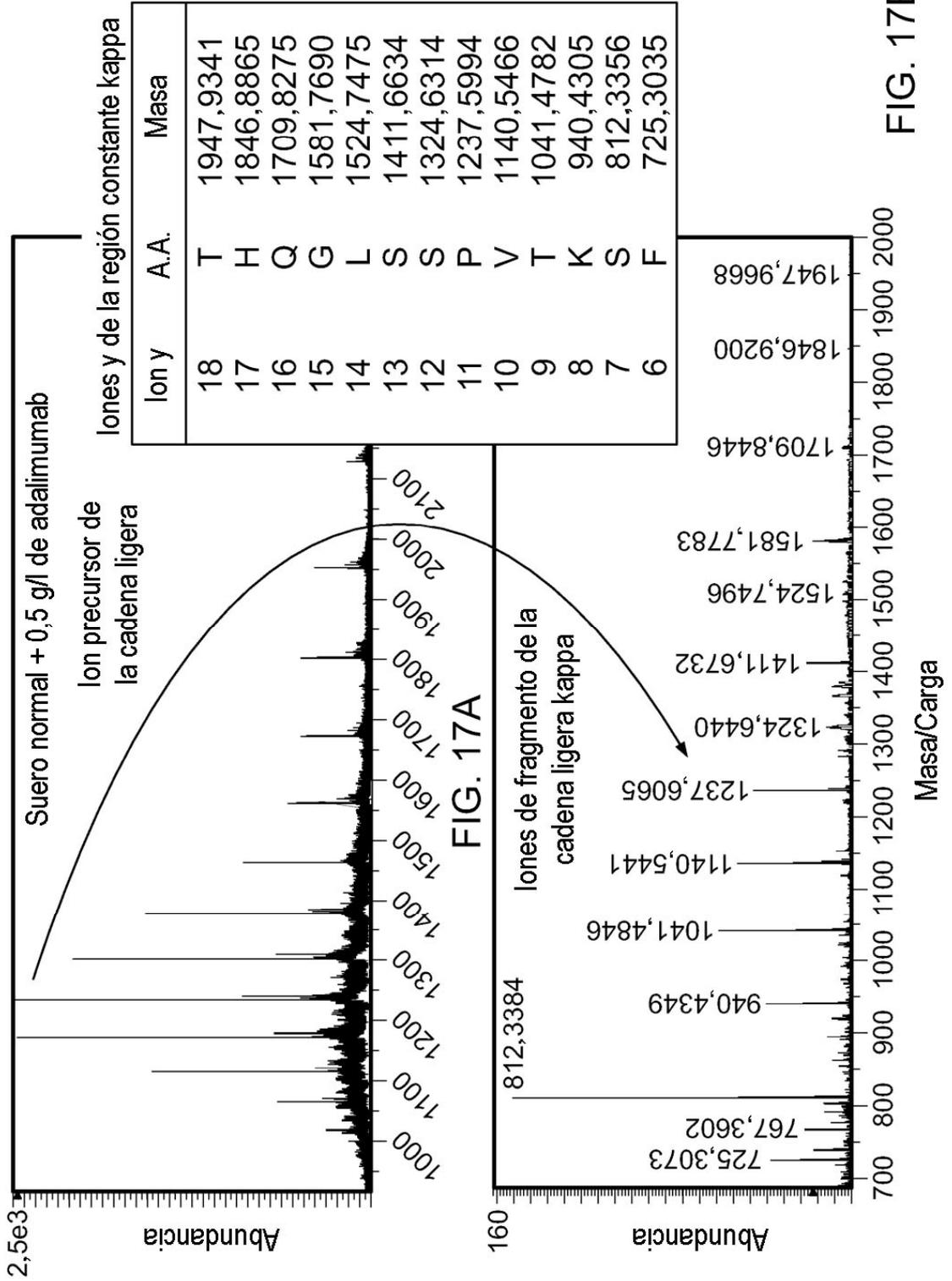


FIG. 17B

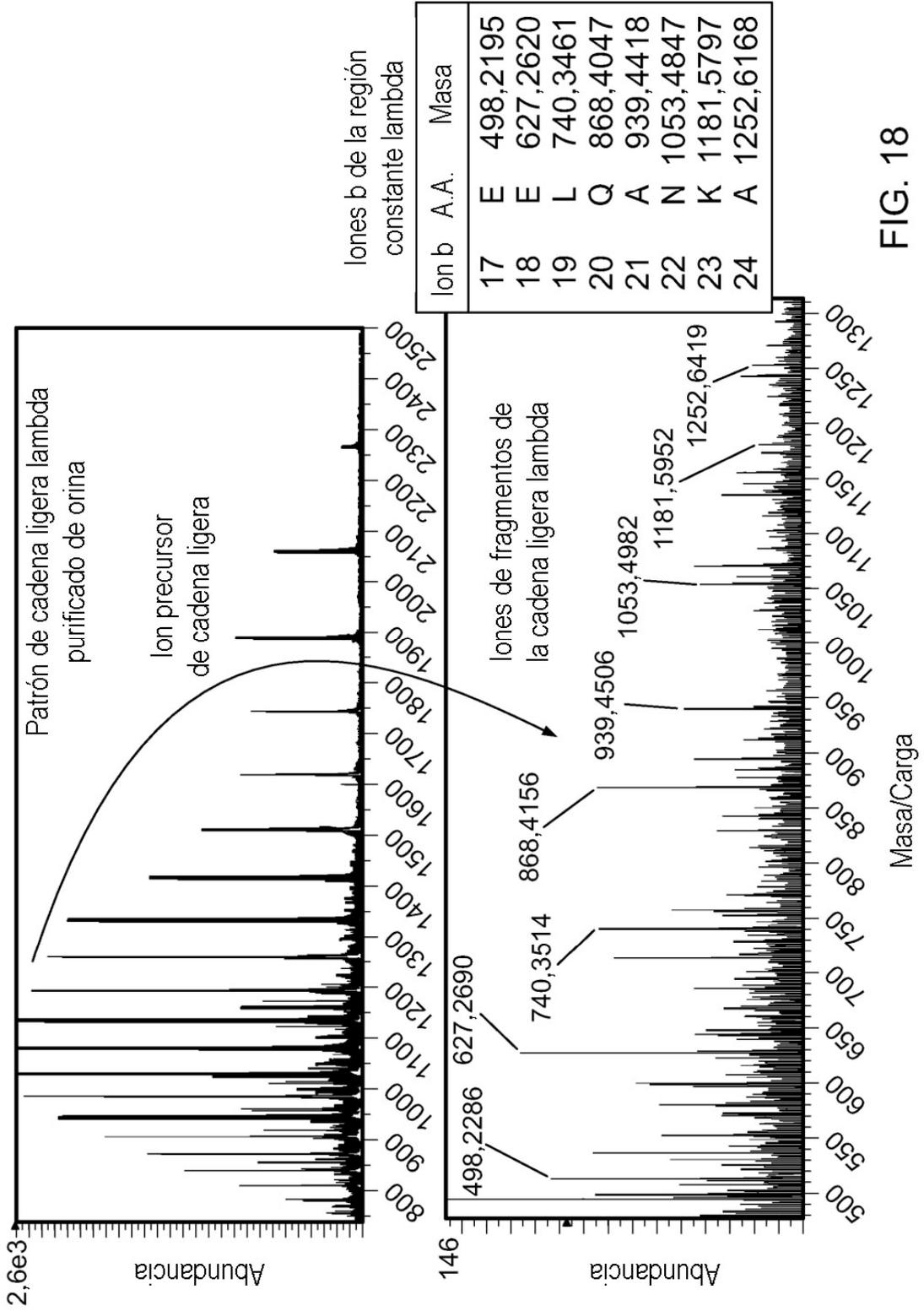


FIG. 18