

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 740**

51 Int. Cl.:

G01N 33/561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2016** **E 16305975 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 3276351**

54 Título: **Método de electroforesis con inmunofijación con inmunodesplazamiento en gel de componentes diana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

73 Titular/es:

SEBIA (100.0%)
Parc Technologique Léonard de Vinci, 27, rue
Léonard de Vinci
91090 Lisses, FR

72 Inventor/es:

NOUADJE, GEORGES y
LIGNEEL, THIERRY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 805 740 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de electroforesis con inmunofijación con inmunodesplazamiento en gel de componentes diana

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de análisis de muestras biológicas por electroforesis con inmunofijación (IFE, forma siglada de *immunofixation electrophoresis*).

10 La invención se refiere especialmente a un método para el análisis de muestras biológicas mediante electroforesis con inmunofijación, que implica el inmunodesplazamiento del componente diana (o componentes diana) que pueda estar presente en la muestra biológica sometida a ensayo, constituyendo dicho componente (o componentes) diana un componente (o componentes) interferente cuando se considera la interpretación de los resultados de inmunofijación. El inmunodesplazamiento se lleva a cabo en un soporte electroforético que es un gel, como se define en el presente documento.

A este respecto, la invención se refiere a un método que puede aplicarse de provechosamente en protocolos de diagnóstico, cuando se busca la investigación y/o tipificación de muestras biológicas de proteínas que pueden ser testigo de trastornos monoclonales, también conocidos como gammapatías monoclonales.

20 La invención también es de particular interés para el control de pacientes después de una terapia que implica la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos.

Además, se divulga un kit adecuado para implementar el método (o los métodos) descritos en el presente documento.

25 Antecedentes de la invención

La electroforesis de proteínas séricas (SPE, forma siglada de *serum protein electrophoresis*) y la electroforesis de inmunofijación (IFE) son métodos ampliamente utilizados en laboratorios de análisis clínicos para la detección, identificación y seguimiento de la progresión de inmunoglobulinas implicadas en gammapatías monoclonales.

30 Varias enfermedades pueden presentarse con una gammapatía monoclonal, tal como la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), pero también el mieloma múltiple, el SIDA, la leucemia linfocítica crónica, el linfoma no Hodgkin, particularmente el linfoma esplénico de la zona marginal y el linfoma linfoplasmocítico, la hepatitis C, una enfermedad del tejido conjuntivo tal como el lupus, la inmunosupresión después del trasplante de órganos, la macroglobulinemia de Waldenström, el síndrome de Guillain-Barré o síndrome Tempi.

La electroforesis de inmunofijación (IFE) es un método bien establecido para la detección y tipificación de determinadas proteínas, especialmente de anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas en muestras biológicas. Habitualmente, las muestras biológicas sometidas a ensayo son suero, orina y líquido cefalorraquídeo. La IFE es un procedimiento de dos fases que combina la electroforesis de proteínas como primera etapa y la inmunofijación como segunda etapa. Esa técnica es ampliamente utilizada como análisis de rutina llevado a cabo, en particular, en laboratorios de análisis clínicos, para el análisis de muestras biológicas con vistas a tipificar las inmunoglobulinas (también denominadas proteínas monoclonales o componentes monoclonales/anticuerpos/inmunoglobulinas en el presente documento) que contienen. La técnica, que combina la electroforesis con la formación de precipitados en el gel de electroforesis, se conoce desde hace mucho tiempo y la describen en particular Alper C A y Johnson A M Vox. Sang. 17: 445 (1969), Cawley L P *et al.*, Clin. Chem. 22: 1262 (1976), Ritchie R F y Smith R Clin. Chem. 22: 497, 1735, 1982 (1976). Permite la identificación de anomalías en distintas muestras biológicas, en particular en líquidos biológicos, por ejemplo suero, orina o líquido cefalorraquídeo.

50 En la primera etapa de la IFE, se realiza la electroforesis del contenido de proteínas de una muestra biológica en un soporte electroforético (generalmente un gel) con un campo eléctrico aplicado. Esto permite la separación de la fracción (o fracciones) proteica (resolución) en forma de un perfil electroforético.

55 La electroforesis de proteínas en gel aprovecha el hecho de que en el gel las proteínas tienen una carga eléctrica intrínseca. Al aplicar un campo eléctrico, la carga intrínseca de una proteína dada imparte una movilidad electroforética a dicha proteína y, por lo tanto, permite su migración en el gel hacia un electrodo que tiene una carga opuesta a la carga de la proteína. Como una muestra biológica contiene varios tipos de proteínas, las proteínas que tienen una movilidad electroforética más baja se moverán más lentamente que las que tienen una movilidad electroforética más alta y, por lo tanto, se puede lograr la separación de las proteínas de la muestra biológica entre sí.

65 En la segunda etapa de la IFE, se realiza la inmunofijación para permitir la detección y tipificación de los anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas que pueden estar presentes en la muestra sometida a ensayo. Con este fin, en gel de agarosa se depositan en paralelo varias alícuotas de la misma muestra biológica. Después de la electroforesis de la primera etapa, cada carril sometido a electroforesis se incuba con un tipo de anticuerpo que es específico para los tipos de inmunoglobulinas que se investigan (IgG, IgA, IgM, kappa y lambda, y posiblemente kappa libre, lambda libre,

IgD e IgE), lo que conduce a la formación de inmunocomplejos entre las inmunoglobulinas de la muestra y los anticuerpos. Después de lavar el gel para eliminar las proteínas no precipitadas, una etapa de tinción puede revelar la posición de los inmunocomplejos: en ausencia de proteínas monoclonales, solo aparece un fondo teñido difuso (correspondiente a una multitud de anticuerpos monoclonales que constituyen el "fondo policlonal"); en presencia de proteínas monoclonales, las bandas teñidas se revelan en regiones específicas del gel. El uso de un carril de referencia en la que no se aplica antisuero, hace posible la tipificación de cada banda monoclonal que es visible en el gel, en comparación con el carril de referencia.

Las inmunoglobulinas generalmente se forman a partir de cadenas pesadas (2 cadenas pesadas) y cadenas ligeras (2 cadenas ligeras). En la estructura de cuatro cadenas se han identificado cinco isotipos de cadena pesada (M, G, A, D, E - clases isotípicas) y dos isotipos de cadena ligera (kappa y lambda - tipos isotípicos). Dependiendo de las enfermedades de los pacientes investigados, las proteínas monoclonales que se pueden identificar son de una naturaleza distinta, constituidas por una molécula de anticuerpo intacta o por un fragmento de anticuerpo. Por lo tanto, las cadenas pesadas o las cadenas ligeras se pueden producir solas. Este es el caso, por ejemplo, de las proteínas de Bence Jones secretadas en la orina de pacientes con mielomas, que están en forma de cadenas ligeras solo. Los isotipos que han de determinarse para las inmunoglobulinas pueden caracterizarse en función de la naturaleza de sus cadenas pesadas y/o en función de la naturaleza de sus cadenas ligeras.

Por lo tanto, de acuerdo con los procedimientos de IFE conocidos en la técnica, se pueden aplicar a determinados carriles del gel una solución fijadora (para el carril sometido a electroforesis de referencia, denominado ELP en el presente documento) y antisueros que comprendan anticuerpos de captura que son específicos para distintas clases y tipos de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgK, IgL, IgKlibre, IgLlibre). El gel, la solución fijadora y estos distintos antisueros (anticuerpos de captura) se incuban durante un tiempo durante el cual se forman los inmunocomplejos entre la inmunoglobulina o inmunoglobulinas) específicas y los anticuerpos de captura. Después, las ubicaciones de tales inmunocomplejos en el gel se pueden visualizar mediante tinción del gel. Como resultado, la presencia de una banda específica es generalmente indicativa de la presencia de una proteína monoclonal correspondiente a una clase y tipo de inmunoglobulina particular. Una "proteína monoclonal" se caracteriza por cadenas pesadas de una única clase isotípica (y posiblemente una subclase, aunque la IFE convencional no analiza este parámetro) y por cadenas ligeras de un único tipo isotípico.

Dentro de los últimos adelantos de la técnica se conocen aparatos que realizan IFE. Por ejemplo, el sistema de electroforesis Hydrasys® (SEBIA) disponible en el mercado es un instrumento semiautomático de parámetros múltiples que permite llevar a cabo la IFE de principio a fin: la aplicación de muestras sobre el gel, la migración, incubación del gel con antisueros (anticuerpos de captura), la tinción/decoloración y el secado de la fase final se pueden realizar de forma semiautomática siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema de electroforesis Hydrasys® posee un aplicador con transportador para aplicar las muestras sobre el gel, que incluye 13 posiciones distintas para la aplicación de muestras sobre el gel. Dependiendo del programa seleccionado, el sistema puede procesar simultáneamente 1, 2, 4 o 9 muestras de inmunofijación (1). La implementación del método de la invención se describe en la sección de Ejemplos a continuación, utilizando el sistema de electroforesis Hydrasys®. Sin embargo, el experto en la materia confiará fácilmente en el principio descrito en el presente documento para la implementación de los métodos descritos en el presente documento en otros aparatos convencionales diseñados para llevar a cabo procedimientos de IFE, las etapas de electroforesis y de inmunofijación seguirán siendo las mismas.

Para el análisis electroforético de las inmunoglobulinas contenidas en una muestra biológica, además de la electroforesis de proteínas séricas (SPE) y la electroforesis de inmunofijación (IFE), también se utiliza electroforesis capilar (CE, forma siglada de *capillary electrophoresis*). Actualmente se utiliza para la identificación de proteínas monoclonales que pueden estar presentes en una muestra biológica analizada una adaptación particular de la CE, que se basa en una etapa de inmunodesplazamiento. El inmunodesplazamiento de la electroforesis capilar puede utilizar un anticuerpo modificado químicamente que, a pesar de tal modificación, conserva su capacidad de unirse a proteínas monoclonales. Esta modificación química proporciona carga negativa adicional a los anticuerpos, para permitir que los anticuerpos y sus complejos se muevan fuera de la zona gamma, (14 - 15) o fuera del patrón de proteínas séricas durante la migración electroforética (16).

El documento EP 2 184 606 A1, cuál es la solicitud de prioridad de la Referencia 16, divulga un método para el análisis mediante electroforesis capilar de una muestra que puede contener un compuesto diana. El método divulgado implica una etapa de mezcla de al menos una parte de la muestra con un compañero de unión para la diana, y luego una etapa de separación mediante electroforesis en un medio de separación en el que el compañero de unión para la diana tiene una carga negativa neta. El método del documento EP 2 184 606 A1 precisa necesariamente que el compañero de unión para la diana comprenda un denominado "segmento polimérico polianiónico". La presencia de un segmento polimérico polianiónico adecuado tiene como objetivo lograr una separación suficiente, mediante electroforesis capilar, entre los analitos contenidos en la muestra analizada.

El documento US 2005/164302 A1, que corresponde a la Referencia 15, también divulga un método para el análisis mediante electroforesis capilar de una muestra que puede contener un compuesto diana, en el que, en contraste con el documento EP 2 184 606 A1, no hay "segmento polimérico polianiónico" implicado. Si la migración fuera de la zona gamma se logra como se indica anteriormente, no se extiende fuera del patrón de proteínas séricas (y, por lo tanto,

no resuelve el problema de lograr una separación suficiente entre los analitos contenidos en una muestra sometida a ensayo).

A fines del inmunodesplazamiento y en el contexto de la CE con inmunodesplazamiento, la muestra se incuba con un antisuero (anticuerpo) modificado específico, antes de someter la mezcla al procedimiento de electroforesis capilar. La desaparición o no de un pico de la zona gamma durante la migración con este antisuero modificado específico permite la clasificación y tipificación de la muestra. Sin embargo, la interpretación de los resultados que se pueden obtener a través de la CE, puede seguir siendo difícil, incluso cuando se utiliza CE con inmunodesplazamiento, además del hecho de que la sensibilidad de la CE con inmunodesplazamiento sigue siendo inferior que la sensibilidad de la IFE convencional. Además, la IFE convencional sigue siendo el método de referencia para la tipificación de inmunoglobulinas y el seguimiento de pacientes que presentan mieloma múltiple, aunque está sujeta a otros problemas, como se analiza a continuación.

Aunque la interpretación de los resultados de la IFE puede verse como un ejercicio muy cualitativo, sujeto a la experiencia y competencias del experto, los expertos en la materia consideran la interpretación de los resultados de los experimentos de IFE convencionales más fácil que la de otras técnicas (por ejemplo, SPE o CE), excepto en determinadas situaciones. De hecho, los métodos de IFE actuales no siempre evitan la presencia de patrones confusos. Por ejemplo, en presencia de dos o más componentes monoclonales en la muestra analizada, por ejemplo, como resultado de la proliferación de varios clones de linfocitos B en un paciente, mediante la inmunofijación deberían revelarse varias bandas monoclonales. Cuando está presente una gammopatía biclonal, deberían observarse por inmunofijación dos bandas de cadena pesada (idénticas o distintas) y dos bandas de cadenas ligeras (idénticas o distintas). Sin embargo, tales bandas biclonales pueden comigrar y, por lo tanto, hacer difícil la interpretación. Cuando está presente una gammopatía oligoclonal, deberían observarse múltiples bandas posiblemente débiles de uno o más tipos de cadenas pesadas y uno o dos tipos de cadenas ligeras. Sin embargo, la detección de una gammopatía oligoclonal en presencia de un fondo policlonal significativo puede ser dudosa. De manera similar, en presencia de un fondo policlonal, especialmente cuando la muestra analizada se diluye para minimizar la interferencia de dicho fondo policlonal en los carriles de los antisueros (anticuerpos de captura), la proteína monoclonal que pueda contener la muestra analizada también puede diluirse, haciéndose invisible en el fondo policlonal. En este caso, la posibilidad de la presencia de proteína monoclonal no puede excluirse.

A partir de lo anterior, se puede observar que, en varios casos, la interpretación de los resultados de la IFE realizada utilizando los métodos convencionales actuales puede ser difícil. Generalmente, la presencia de la denominada proteína (o proteínas) o componente (componentes) interferente que puede comigrar en un gel de IFE hace que la interpretación sea más difícil. Este problema no tiene solución en la técnica.

Además, a día de hoy, los fármacos terapéuticos de anticuerpos monoclonales se utilizan cada vez más en numerosas disciplinas médicas, incluida la inmunología de la alergia, la gastroenterológica, la hematología, la oncología, la reumatología y la dermatología, y el trasplante de órganos (2 - 9). En este contexto, la interferencia de fármacos en la IFE sérica realizada sobre muestras recogidas de pacientes tratados o muestras de suero enriquecidas se ha descrito para una serie de anticuerpos monoclonales terapéuticos (11 - 12).

Por otro lado, la presencia de fármacos terapéuticos de anticuerpos monoclonales también puede llevar a los médicos a sospechar falsamente afecciones tales como la tal como la gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI). Como los laboratorios de análisis clínicos rara vez cuentan con una extensa historia clínica del paciente, es probable que se estén informando componentes monoclonales débiles sin saberlo debido a fármacos de anticuerpos monoclonales (13).

En este caso, de nuevo, la presencia de una proteína (o proteínas) o componente (o componentes) interferente exógeno bajo la forma de un anticuerpo monoclonal administrado a un paciente, que puede comigrar con una proteína (o proteínas) o componente (o componentes) monoclonal endógeno cuando se realiza una IFE en la muestra de dicho paciente, hace que la interpretación sea más difícil.

Por lo tanto, existe una necesidad de superar estos problemas, cuando se realiza el análisis de muestras mediante IFE, que son susceptibles de contener o contienen un componente (o componentes) interferente exógeno o endógeno. Dicho componente (o componentes) interferente exógeno o endógeno es un componente que puede hacer difícil la interpretación de la IFE, como se ha explicado anteriormente. El componente (o componentes) interferente puede ser un anticuerpo (o anticuerpos) o inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) exógena o endógena interferente, tal como un anticuerpo (o anticuerpos) monoclonal terapéutico o una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) endógena, incluyendo un anticuerpo (o anticuerpos) monoclonal endógeno o un antisuero (o antisueros) policlonal o componente (o componentes) de los mismos, contenido en la muestra del paciente que se analiza.

La presencia de tal componente (o componentes) interferente en una muestra analizada mediante IFE puede tener la consecuencia de llevar a una interpretación clínica errónea o dudosa de la IFE, o hacerla imposible.

La presente invención propone una solución a estos problemas. A este respecto, la invención se refiere a un método de análisis mediante IFE que permite una facilidad de interpretación superior de los resultados de la IFE, que, por lo

tanto se puede aplicar provechosamente en protocolos de diagnóstico, cuando se busca la investigación y/o tipificación de muestras biológicas de proteínas que pueden ser testigo de trastornos monoclonales, también conocidos como gammopatías monoclonales. La invención también es de particular interés para el control de pacientes después de una terapia que implica la administración de anticuerpos monoclonales terapéuticos.

Sumario de la invención

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a un método para el análisis por electroforesis con inmunofijación (IFE) de una muestra biológica que comprende una o más proteínas, en particular para el análisis por IFE de un componente (o componentes) monoclonal que pueda estar presente en dicha muestra biológica, que comprende las etapas de:

- a. depositar al menos una parte alícuota de la muestra biológica en un área de depósito de una placa de gel electroforética, estando dicha área de depósito de muestras en una posición de la placa de gel que permita la migración electroforética del contenido proteico de la muestra depositada hacia el lado anódico de la placa de gel, y
- b. depositar al menos un anticuerpo que está modificado (anticuerpo modificado) para portar cargas eléctricas negativas adicionales, teniendo dicho anticuerpo modificado especificidad antigénica para una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica y teniendo dicho anticuerpo modificado la capacidad/aptitud para formar un inmunocomplejo, especialmente un inmunocomplejo soluble, con dicha inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma, en donde el al menos un anticuerpo modificado se deposita en un área de depósito de la placa de gel electroforética que coincide con el área de depósito de muestras de la etapa a. o está separada del área de depósito de la etapa a., estando en el mismo carril pero en una posición que es más catódica con respecto a la posición del área de depósito de muestras de la etapa a., en particular entre la extremidad catódica de la placa de gel y el área de depósito de muestras de la etapa a.,

en donde las etapas a. y b. pueden realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras están separadas o, en cualquier orden cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras coinciden, y

- c. someter a electroforesis la placa de gel para obtener un perfil de separación de proteínas de la muestra biológica depositada en la etapa a., desplazando específicamente el al menos un anticuerpo modificado depositado en la etapa b. la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica fuera de la zona gamma y/o el perfil de proteínas durante la migración electroforética, y
- d. aplicar al menos un anticuerpo de captura en la zona (o zonas) apropiada de la placa de gel sometida a electroforesis, en donde dicho anticuerpo de captura tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular (determinado), o tiene especificidad para la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma, o tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular (determinado) y/o inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se encuentra en un inmunocomplejo entre la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma y el al menos un anticuerpo modificado, y permitir su reacción para hacer posible la formación de inmunocomplejos precipitados y/o detectables, y
- e. opcionalmente, teñir los inmunocomplejos formados en la etapa c. y opcionalmente la etapa d.

La invención se refiere más particularmente a un método para el análisis por electroforesis con inmunofijación (IFE) de una muestra biológica que comprende una o más proteínas, en particular para el análisis por IFE de una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) que pertenece a una clase seleccionada entre IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, o un fragmento de la misma que puede estar presente en dicha muestra biológica, que comprende las etapas de:

- a. depositar al menos una parte alícuota de la muestra biológica en un área de depósito de una placa de gel electroforética, estando dicha área de depósito de muestras en una posición de la placa de gel que permita la migración electroforética del contenido proteico de la muestra depositada hacia el lado anódico de la placa de gel, y
- b. depositar al menos un anticuerpo que está modificado para portar cargas eléctricas negativas adicionales, teniendo dicho anticuerpo modificado especificidad antigénica para una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica y teniendo la capacidad de formar un inmunocomplejo con dicha inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma, en donde el al menos un anticuerpo modificado se deposita en un área de depósito de la placa de gel electroforética que coincide con el área de depósito de muestras de la etapa a. o está separada del área de depósito de la etapa a., estando en el mismo carril pero en una posición que es más catódica con respecto a la posición del área de depósito de muestras de la etapa a., en particular entre la extremidad catódica de la placa de gel y el área de depósito de muestras de la etapa a.,

en donde las etapas a. y b. pueden realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras están separadas o, cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras coinciden, el depósito de un anticuerpo de acuerdo con la

etapa b. se lleva a cabo antes o después del depósito de una parte alícuota de la muestra biológica de acuerdo con la etapa a., y

- 5 c. someter a electroforesis la placa de gel para obtener un perfil de separación de proteínas de la muestra biológica depositada en la etapa a., desplazando específicamente el al menos un anticuerpo modificado depositado en la etapa b. la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica fuera de la zona gamma y/o el perfil de proteínas durante la migración electroforética, y
- 10 d. aplicar al menos un anticuerpo de captura en la zona (o zonas) apropiada de la placa de gel sometida a electroforesis, en donde dicho anticuerpo de captura tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular, o tiene especificidad para la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma, o tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular y/o la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se encuentra en un inmunocomplejo entre la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma y el al menos un anticuerpo modificado, y permitir su reacción para hacer posible la formación de inmunocomplejos precipitados y/o
- 15 detectables, y
- e. opcionalmente, tñir los inmunocomplejos formados en la etapa c. y opcionalmente la etapa d.

La inmunoglobulina diana o fragmento de la misma reconocida por, y a la que se une, el anticuerpo modificado en el método de la invención puede ser una inmunoglobulina o fragmento de la misma asociada con una afección patológica, tal como componentes monoclonales patológicos, o una inmunoglobulina o fragmento de la misma que puede interferir con el análisis apropiado de la muestra, dando lugar de este modo a perfiles de IFE confusos. Se entenderá que la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma definida en el presente documento corresponde a un componente interferente exógeno o endógeno que se puede encontrar en la muestra biológica sometida a ensayo. Un componente interferente exógeno o endógeno puede ser un anticuerpo o inmunoglobulina exógena o endógena, tal como un anticuerpo monoclonal terapéutico o una inmunoglobulina endógena, incluyendo un anticuerpo monoclonal o antisuero policlonal endógeno o componente del mismo. La invención también es aplicable a la detección de mezclas de componentes interferentes, como se define en el presente documento.

La presencia de un componente (o componentes) monoclonal en una muestra biológica es característica de una producción excesiva de un único tipo de inmunoglobulina que pertenece a una clase seleccionada entre IgG, IgA, IgM, IgD o IgE. El componente (o componentes) monoclonal surge de la proliferación de un clon específico de linfocitos B malignos o hiperestimulados que, a su vez, genera una población homogénea de inmunoglobulinas monoclonales.

Por "componente (o componentes) monoclonal" se entiende en el presente documento una inmunoglobulina que pertenece a las clases mencionadas anteriormente, o un fragmento de la misma, según se define por los isotipos de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera, y que es producida por un único clon específico de linfocitos B en asociación con un contexto patológico. Como se define en el presente documento, el componente (o componentes) monoclonal incluye cadenas ligeras libres (kappa y lambda). El método de IFE descrito en el presente documento permite el análisis del contenido en una proteína (o proteínas) de una muestra biológica, incluyendo o además del análisis del componente (o componentes) monoclonal que puede contener. El método IFE descrito en el presente documento también permite el análisis de muestras que contienen antisueros policlonales.

Por el contrario, una inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se define en el presente documento puede tener las mismas características estructurales que un "componente (o componentes) monoclonal" como se define en el presente documento.

La presencia de anticuerpos terapéuticos en una muestra normalmente se asocia con un tratamiento farmacológico de un paciente que puede ser desconocido por el facultativo a cargo del análisis por IFE.

Se proporciona que, en conformidad con la invención, la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma puede ser una pluralidad de inmunoglobulinas distintas o fragmentos de las mismas, tales como componentes monoclonales como se define en el presente documento.

Además, por la referencia a "al menos un anticuerpo que está modificado para portar cargas eléctricas negativas adicionales", y de acuerdo con una realización particular, se entiende también una mezcla de varios anticuerpos que tienen especificidad antigénica para múltiples y respectivamente distintas inmunoglobulinas diana predeterminadas o un fragmento (o fragmentos) de las mismas como se define en el presente documento.

En términos generales, la presente invención proporciona un procedimiento de inmunodesplazamiento en gel que se utiliza junto con electroforesis con inmunofijación, con el objetivo de desplazar específicamente al menos una diana predeterminada, incluyendo una inmunoglobulina interferente o fragmento de la misma, fuera de una zona de interés, especialmente fuera de la zona gamma, en un soporte electroforético que es un gel tal como un gel de agarosa, mediante el uso de al menos un anticuerpo modificado específico para al menos una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma.

Por "zona de interés" en la expresión "fuera de una zona de interés", se hace referencia a la zona (o zonas)

comúnmente identificada en una placa de gel electroforético por el experto. La presente invención busca la eliminación de la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana interferente o fragmento (o fragmentos) de la misma de una zona de interés que puede corresponder a la zona "gamma" o, también, de acuerdo con otras realizaciones particulares, a una zona que se extiende desde la zona gamma (que está más cerca del lado catódico de la placa de gel electroforético) hasta la beta o alfa, incluyendo la zona (o zonas) alfa1 y/o alfa2 de la placa de gel electroforética. De acuerdo con una realización particular, el desplazamiento se logra fuera de la zona gamma durante la migración electroforética. De acuerdo con otra realización particular, el desplazamiento se logra fuera de la zona alfa, en particular fuera de la zona alfa1, o fuera de la zona alfa2. De acuerdo con otra realización particular, el desplazamiento se logra fuera del perfil proteico de la muestra tomada en su conjunto.

Por lo tanto, la presente invención puede verse como una mejora para la electroforesis con inmunofijación de muestras que contienen un componente (o componentes) interferente exógeno (tal como anticuerpos monoclonales terapéuticos) o un componente (o componentes) interferente endógeno, que son las denominadas inmunoglobulinas diana (interferentes) predeterminadas o fragmento de las mismas.

De acuerdo con este aspecto y ventaja sobresaliente, la presente invención es importante para el análisis de determinadas muestras biológicas que dan patrones de electroforesis con inmunofijación confusos, tales como muestras biológicas de pacientes que tienen gammopatías biclonales (dos bandas idénticas de la cadena pesada y dos bandas distintas de las cadenas ligeras ubicadas en la misma posición en el patrón de electroforesis) u oligoclonales, o muestras de pacientes en los que la presencia de una cadena pesada de inmunoglobulina es detectada sin la cadena ligera correspondiente.

De acuerdo con una realización particular, el procedimiento de inmunofijación después de la electroforesis en presencia de un anticuerpo modificado utiliza sueros anti-inmunoglobulinas (anticuerpo (o anticuerpos) de captura) comunes para fines de tipificación. Los sueros anti-inmunoglobulinas (anticuerpo (o anticuerpos) de captura) pueden ser de origen humano o animal. Pueden ser humanizados. Dicho anticuerpo (o anticuerpos) de captura puede reconocer un isotipo de anticuerpo particular, para revelar su presencia. Dicho anticuerpo (o anticuerpos) de captura también puede reconocer la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se define en el presente documento. De acuerdo con otra realización, dicho anticuerpo (o anticuerpos) de captura también puede reconocer un isotipo de anticuerpo particular como se encuentra en un inmunocomplejo entre la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma y un anticuerpo modificado como se define en el presente documento.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo (o anticuerpos) de captura reconoce un inmunocomplejo soluble que implica la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se define en el presente documento. Por "inmunocomplejo soluble", se entiende un complejo que no precipita o no se encuentra en forma precipitada en un medio que consiste en un gel electroforético como se define en el presente documento, especialmente un gel electroforético utilizado para llevar a cabo el método de la invención.

La invención se basa en el hecho de que un anticuerpo modificado cargado en el gel electroforético cerca del área (o áreas) de aplicación de muestras, migra más rápido debido a la modificación química que le proporciona cargas eléctricas negativas adicionales con respecto al anticuerpo no modificado, durante el procedimiento de electroforesis, lo que le permite unirse específicamente a la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma y desplazarla fuera de la zona gamma, o fuera de una zona de interés como se define en el presente documento.

Además, se divulga un kit adecuado para llevar a cabo un método de la invención, especialmente un kit que contiene una solución de anticuerpos modificado contra una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma (exógena o proteína) y un cargador de muestras adicional.

Ventajosamente, tal kit debe utilizarse junto con los protocolos y/o kits de inmunofijación disponibles, tales como los programas y/o kits de IF (forma siglada de inmunofijación) disponibles para el dispositivo Hydrasys® sin ningún cambio de protocolo o programa, aparte de la presencia de un cargador de muestras adicional y de un anticuerpo modificado. Ventajosamente, con respecto a los métodos de inmunofijación conocidos, la presente invención no precisa ninguna modificación de una predilución (o prediluciones) de la muestra biológica ni incubación de la muestra biológica con un anticuerpo modificado antes de la electroforesis, como es el caso con los métodos conocidos de electroforesis capilar con inmunodesplazamiento.

Descripción detallada

De acuerdo con realizaciones particulares, las muestras biológicas analizadas se seleccionan entre: muestras de suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

Se pueden utilizar todos los tipos de gel electroforético convencionales.

De acuerdo con una realización particular, la placa de gel electroforética corresponde a un gel de alta resolución, tal como un gel de agarosa, que mejorará la resolución en la zona gamma del gel. Los gels de agarosa adecuados son conocidos en la técnica. La agarosa común y adecuada puede tener una concentración de agarosa del 0,5 % al 2 %.

De acuerdo con una realización particular, la concentración de agarosa es del 0,8 %.

Sin embargo, se puede utilizar otro tipo de geles, incluyendo geles de acrilamida.

- 5 De acuerdo con una realización particular, la inmunoglobulina predeterminada o fragmento de la misma es un anticuerpo terapéutico, en particular un anticuerpo monoclonal recombinante terapéutico.

Los anticuerpos monoclonales recombinantes terapéuticos pueden proceder del ratón (los "-omabs"), ser humanizado (los "-zumabs") o pueden ser anticuerpos quiméricos humano-ratón (los "-ximabs") o anticuerpos monoclonales humanos (-umabs"). Por lo tanto, pueden aparecer como una banda de proteína monoclonal visible en el patrón de electroforesis de pacientes que reciben fármacos de anticuerpos monoclonales recombinantes.

Particularmente, a día de hoy, pueden verse anticuerpos monoclonales humanizados y quiméricos de ratón-humano al realizar inmunofijación y pueden señalarse erróneamente como proteína monoclonal o pueden comigrar con proteínas monoclonales endógenas. En estos casos, un análisis de seguimiento con el método de electroforesis con inmunofijación no es fácil o es imposible antes de la finalización de la terapia. En el caso particular del mieloma múltiple, el grupo de trabajo internacional sobre mieloma (IMWG, forma siglada de *international myeloma working group*) ha establecido criterios para la respuesta clínica al tratamiento, que incluyen cambios de los niveles de monoclonales en suero mediante SPE e IFE (10). En los análisis por IFE, para que un paciente se clasifique como que tiene una respuesta completa al tratamiento utilizando criterios del IMWG, el suero debe ser negativo para una proteína monoclonal (o proteínas monoclonales), sin que aparezca ninguna banda. Por lo tanto, las interferencias de fármacos pueden tener un impacto importante desde el punto de vista clínico sobre la evaluación de la respuesta al tratamiento (11 - 12). Además, en ausencia de la proporción de una historia clínica extensa del paciente al facultativo que realiza una IFE, y dado que la presencia de fármacos de anticuerpos monoclonales puede llevar a los médicos a sospechar falsamente afecciones tales como la gammopatía monoclonal de significado incierto (GMSI), es probable que puedan informarse componentes monoclonales débiles sin saberlo debido a los fármacos de anticuerpos monoclonales (13). La presente invención supera estos problemas.

Los anticuerpos monoclonales diseñados para uso terapéutico y dirigidos en conformidad con la invención habitualmente pertenecen a la clase IgG. Por lo tanto, de acuerdo con una realización particular, la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es un anticuerpo monoclonal terapéutico que pertenece a la clase IgG. Sin embargo, se entenderá que la presente invención es fácilmente aplicable a todos los tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos, sin distinción de tipo o clase, como se divulga en el presente documento, e incluye a todas las subclases conocidas. Además, los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden abarcar anticuerpos con otras estructuras distintas a las de los anticuerpos de origen natural. Pueden ser anticuerpos humanos, murinos humanizados o quiméricos, o variantes de los mismos, especialmente variantes manipuladas químicamente o un anticuerpo monoclonal de vector, por ejemplo acoplados a un fármaco. En el presente documento, dentro de la definición de "anticuerpo monoclonal terapéutico" se incluyen: anticuerpos monoclonales enteros (completos), fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, scFv (fragmento variable monocatenario), di-scFv (fragmento variable monocatenario dimérico), sdAb (anticuerpo de dominio único), anticuerpos monoclonales biespecíficos, tales como un anticuerpo trifuncional o fragmentos F(ab')₂ unidos químicamente, pero también un BiTE (captador biespecífico de linfocitos T).

Dado que la "inmunoglobulina diana o fragmento de la misma" discutida en el presente documento se puede encontrar fácilmente en cualquier anticuerpo monoclonal terapéutico, se entiende que la presente invención es aplicable a todos los tipos disponibles de anticuerpos monoclonales terapéuticos, sin distinción.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos abarcados pueden ser anticuerpos monoclonales anti-cáncer, que pueden tener como diana células malignas mediante varios mecanismos. Además, se pueden utilizar en radioinmunoterapia o en terapia de profármaco y enzima dirigida por anticuerpo (ADEPT, forma siglada de *antibody-directed enzyme prodrug therapy*), en que están unidos a una enzima activadora de un fármaco. Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse en la terapia de puntos de control, en que se utilizan para evadir las defensas que utilizan los tumores para suprimir al sistema inmunitario. Los anticuerpos monoclonales también se utilizan para enfermedades autoinmunitarias.

Los anticuerpos monoclonales terapéuticos pueden ser específicos para receptores celulares, para citocinas tales como IFN- α , interleucinas, quimiocinas, interferones o factores de crecimiento.

Los ejemplos de dianas de anticuerpos monoclonales terapéuticos incluyen la integrina alfa-4 ($\alpha 4$), un epítipo de la proteína F del VRS, anti-IL-6R, CTLA-4, PD-1, CD11a, CD20, CD30, CD38, CD52, proteína del sistema del complemento C5, receptores del factor de crecimiento epidérmico, ErbB2, IL-12, IL-23, IL-1 β , receptor de IL-2R α (CD25), inmunoglobulina E (IgE), inhibición de la glucoproteína IIb/IIIa, inhibición de la señalización de TNF- α , inhibición del factor activador de linfocitos B, integrina $\alpha 4\beta 7$, inhibidor del ligando de RANK, receptor CD3 de linfocitos T, se dirige al receptor de muerte celular programada 1 (PD-1), inhibidor de TNF-alfa, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A).

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo monoclonal terapéutico se selecciona entre: Adalimumab, Trastuzumab, Ofatumumab, Siltuximab, Rituximab, Bevacizumab, Infliximab, Cetuximab y Efalizumab, Natalizumab, Panitumumab, Tolicizumab, Clenoliximab, Etaracizumab, Visilizumab, Elotuzumab, Nimotuzumab, Ramcicirumab, Elotuzumab, Daratumumab, Mapatumumab, Golimumab, Ustekinumab, anticuerpos funcionalmente equivalentes, es decir, anticuerpos que tienen la misma diana antigénica, o cualquier mezcla de los mismos.

De acuerdo con otra realización particular, la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es una inmunoglobulina monoclonal endógena o un fragmento de la misma.

De acuerdo con otra realización particular, la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es un antisuero policlonal endógeno (o un componente de este antisuero policlonal como se encuentra dentro de dicho antisuero policlonal).

Cuando la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es una inmunoglobulina endógena o fragmento de la misma, y de acuerdo con una realización más particular, se puede seleccionar entre: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, cadena kappa, cadena lambda, cadena kappa libre y cadena lambda libre.

De acuerdo con una realización más particular, la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es una mezcla de las dianas anteriores.

Por ejemplo, si la diana interferente es un fondo policlonal G significativo, que, por consiguiente, implica IgG tanto lambda como kappa, se lo puede desplazar por una combinación de anticuerpo anti-IgLambda y anticuerpo anti-IgKappa modificados

Además, en la muestra de un paciente sometido a una multiterapia se pueden encontrar varios anticuerpos monoclonales terapéuticos distintos.

Por consiguiente, la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma puede ser de uno o más de un tipo o, a la inversa, los anticuerpos modificados (y los anticuerpos de captura respectivos utilizados) pueden ser uno o más de uno, es decir, dos, tres, cuatro o más anticuerpos. A menos que se indique de otro modo, los elementos técnicos descritos en el presente documento en el "singular" con respecto a este punto también se aplican en la forma "plural".

El anticuerpo a modificar puede ser un anticuerpo monoclonal humano o antisueros policlonales humanos, dependiendo de la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma a desplazar. El anticuerpo a modificar puede ser humano o de cualquier animal hospedador.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo que se modifica es un anticuerpo monoclonal humano o animal, o un antisuero policlonal humano o animal, en particular un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal específico para una inmunoglobulina que pertenece a una clase isotípica seleccionada entre: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, o específico para una inmunoglobulina que pertenece a un tipo isotípico seleccionado entre: kappa y lambda, o específico para una cadena ligera libre seleccionada entre: kappa libre y lambda libre.

De acuerdo con un aspecto particular, el anticuerpo modificado tiene la estructura de un anticuerpo entero (completo). De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado es un anticuerpo generado contra un anticuerpo monoclonal terapéutico, tal como los divulgados en el presente documento, y el anticuerpo modificado se prepara utilizando anticuerpos contra anticuerpos terapéuticos proporcionados por el fabricante y modificados para su uso en el método de la invención.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado se modifica para portar cargas eléctricas negativas "adicionales" y de este modo posee una carga negativa intrínseca aumentada con respecto al mismo anticuerpo de origen no modificado. Por "adicional" se entiende, por lo tanto, que la cantidad de cargas eléctricas negativas en el anticuerpo o la carga negativa intrínseca del anticuerpo aumenta con respecto al anticuerpo de origen no modificado, tomado en las mismas condiciones. Sin embargo, la modificación llevada a cabo no alterará su especificidad para la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma, que tiene que ser desplazada de acuerdo con el método de la invención.

Básicamente, la carga negativa del anticuerpo modificado aumentará de manera que su posición con respecto a su movilidad electroforética en el gel, específicamente el gel de agarosa, ya no está en la región gamma. Por lo tanto, el anticuerpo modificado debe migrar hacia el lado anódico del gel, para alcanzar una posición que sea más anódica con respecto a la posición que puede alcanzar el mismo anticuerpo de origen no modificado.

La cantidad de cargas eléctricas negativas de un anticuerpo o un anticuerpo modificado, y especialmente el aumento en la cantidad de cargas eléctricas negativas en el anticuerpo modificado, puede estimarse mediante la determinación de la movilidad electroforética de dicho anticuerpo o anticuerpo modificado.

La movilidad electroforética de una molécula (μep) es directamente proporcional a la carga eléctrica neta de dicha

molécula, de acuerdo con la ecuación de Debye-Huckel-Henry $\mu_{ep} = q/6\pi\eta R$, en donde q es la carga eléctrica neta de la molécula, η es la viscosidad del medio y R es el radio iónico de la molécula.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado tiene una movilidad electroforética aumentada con respecto a la movilidad electroforética del anticuerpo de origen no modificado, tomado en las mismas condiciones. El aumento de la movilidad electroforética es el resultado de una modificación, especialmente una modificación química del anticuerpo como se divulga en el presente documento.

La movilidad electroforética de un anticuerpo modificado de acuerdo con la invención se puede evaluar mediante electroforesis capilar en solución libre, por ejemplo, en un aparato de CE de Agilent equipado con un detector UV-Vis, expresándose la movilidad electroforética en $\text{cm}^2/\text{V.S.}$ Un ejemplo de condiciones adecuadas para evaluar, en consecuencia, la movilidad electroforética de tal anticuerpo modificado con una técnica de CE es: Tampón de análisis: Tris/Veronal 70 mM, pH 9,2, Capilar de 25 μm de diámetro y 33 cm de largo, Temperatura de migración: 22 °C y voltaje: 14 kV.

De acuerdo con una realización particular, por "movilidad electroforética aumentada", se entiende que la relación de la movilidad electroforética del anticuerpo modificado (μ_{ep} modificada) con respecto a la movilidad electroforética del anticuerpo nativo (μ_{ep} nativa) es superior a 1. La movilidad electroforética μ_{ep} puede medirse convencionalmente en $\text{cm}^2/\text{V.S.}$, especialmente con un sistema como se divulga anteriormente,

De acuerdo con una realización particular, dicha relación es superior a 1,5 o superior a 2.

De acuerdo con una realización particular, dicha relación está entre 1,5 y 6, o entre 2 y 6, o entre 3 y 6, o entre 4 y 6, o entre 1,5 y 5, o entre 2 y 5, o entre 3 y 5, o entre 4 y 5.

Por ejemplo, se ha calculado que para el anticuerpo policlonal anti-IgG modificado con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico, utilizado en el Ejemplo 6 en el presente documento, por ejemplo, la relación es de aproximadamente 4,6, significando dicha relación de aproximadamente 4,6 que la movilidad electroforética del anticuerpo nativo se ha aumentado en 4,6 y, por consiguiente, que el anticuerpo modificado porta aproximadamente 4,6 veces más cargas negativas que el anticuerpo nativo no modificado.

Por ejemplo, se ha calculado de manera similar que para el anticuerpo anti-humano Trastuzumab modificado del Ejemplo 2, dicha relación es de aproximadamente 2,4, lo que significa, por consiguiente, que la movilidad electroforética del anticuerpo nativo ha aumentado en 2,4 y que el anticuerpo modificado porta aproximadamente 2,4 veces más cargas negativas que el anticuerpo nativo no modificado.

De acuerdo con una realización particular, la movilidad electroforética de un anticuerpo modificado, medida en $\text{cm}^2/\text{V.S.}$ de acuerdo con el protocolo divulgado en el presente documento, es al menos igual o mayor que la movilidad electroforética medida para un componente sometido a electroforesis de manera natural fuera de la "zona de interés", como se define en el presente documento. Por ejemplo, dicha movilidad electroforética de un anticuerpo modificado puede ser al menos igual o mayor que la movilidad electroforética de la albúmina humana, medida de acuerdo con un protocolo convencional, tal como el protocolo divulgado anteriormente.

De acuerdo con una realización particular, las consideraciones desarrolladas anteriormente con respecto a la movilidad electroforética de un anticuerpo modificado utilizado dentro de la presente invención se aplican de manera similar a la movilidad electroforética de un inmunocomplejo formado entre una inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se define en el presente documento y un anticuerpo modificado de acuerdo con la presente invención.

Sin embargo, de acuerdo con una realización particular, un anticuerpo modificado conserva la afinidad o el nivel de afinidad del anticuerpo nativo por su inmunoglobulina diana o fragmento de la misma. La afinidad se mide convencionalmente a través de un valor de K_d . Los valores de K_d para un anticuerpo habitualmente oscilan de valores de K_d bajos de micromolar (10^{-6}) a nanomolar (10^{-7} a 10^{-9}) y hasta valores o un intervalo de K_d en picomolar (10^{-12}) para anticuerpos de muy alta afinidad. El hecho de que la afinidad sigue siendo suficiente se puede apreciar en la visualización de los resultados del método.

Se observa que la afinidad de un anticuerpo modificado por su diana de inmunoglobulina (también designada eficacia de desplazamiento) puede evaluarse determinando la relación mínima de la concentración entre el anticuerpo modificado y la inmunoglobulina diana que hace posible que tenga lugar el desplazamiento completo de una concentración determinada de la inmunoglobulina diana. Esta evaluación se obtiene experimentalmente aumentando progresivamente la concentración de la diana de inmunoglobulina mientras la concentración del anticuerpo modificado permanece sin cambios, hasta que el desplazamiento de la diana de inmunoglobulina se vuelve simplemente parcial. Esto hizo posible la determinación de los valores de la relación expresados en las siguientes páginas, señalando que tal relación también depende del tipo y título del anticuerpo a modificar.

Por "que tiene especificidad antigénica para una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica" y "que tiene la capacidad/aptitud de formar un inmunocomplejo con

dicha inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma", se entiende que la implementación del método de la invención precisa que la multivalencia y/o la densidad de carga del anticuerpo modificado haga posible su desplazamiento fuera de la región de interés como se define en el presente documento, especialmente fuera de la región gamma del gel, sin afectar la capacidad real del anticuerpo para unirse y desplazar su antígeno, que es la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado ha perdido su capacidad de precipitar en el gel electroforético utilizado en el método de la invención, como se define en el presente documento. Lo mismo se aplica al inmunocomplejo (o los inmunocomplejos) que implica a tal anticuerpo modificado.

Por consiguiente, el inmunocomplejo formado entre el anticuerpo modificado utilizado en la presente invención y la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma tiene una movilidad electroforética que hace posible una migración más rápida en el gel, lo que permite la migración del inmunocomplejo a una zona ubicada fuera de la zona de interés como se define en el presente documento, en particular fuera de la zona gamma del gel, mientras que una inmunoglobulina diana o fragmento de la misma que no estuviere unida a tal anticuerpo modificado permanecería en dicha zona de interés, especialmente en la zona gamma.

Puede emplearse cualquier método para modificar anticuerpos que permita aumentar su carga negativa, sin alterar su especificidad. De acuerdo con una realización particular,

el aumento de la carga negativa se logra de acuerdo con las explicaciones técnicas proporcionadas en el presente documento.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado es un producto de reacción de un anticuerpo con un anhídrido de ácido carboxílico. La fórmula general de los anhídridos de ácido carboxílico es $R_1-CO-O-CO-R_2$, siendo R_1 y R_2 grupos orgánicos y/o átomos de hidrógeno idénticos o distintos. Los anhídridos de ácido carboxílico como se definen en el presente documento abarcan dianhídridos que incluyen dos funciones anhídrido de ácido, o anhídridos tricarboxílicos.

De acuerdo con una realización particular, un anticuerpo modificado de acuerdo con la presente divulgación se modifica químicamente utilizando un anhídrido tal como anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico, que reacciona de forma eficaz con grupos amino primarios y funciones de hidroxilo contenidas en las inmunoglobulinas, y les proporciona una determinada cantidad de funciones ácido carboxílico adicionales, por lo tanto, cargas negativas adicionales en el tampón de pH alcalino de la matriz de gel de agarosa.

De acuerdo con otras realizaciones particulares, el anticuerpo modificado es un producto de reacción de un anticuerpo con un anhídrido de ácido carboxílico, en particular un anhídrido de ácido carboxílico que es anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico o un dianhídrido seleccionado entre: dianhídrido piromelítico (anhídrido 1,2,4,5 benceno tetracarboxílico), dianhídrido benzofenona-3,3',4,4'-tetracarboxílico, dianhídrido dietilentriaminopentaacético.

De acuerdo con una realización particular, la concentración del anhídrido de ácido carboxílico utilizado para la reacción de modificación del anticuerpo se adapta para obtener una movilidad electroforética adecuada del anticuerpo modificado resultante, de acuerdo con las consideraciones desarrolladas anteriormente. En particular, un aumento de la concentración del anhídrido de ácido carboxílico utilizado puede aumentar la cantidad de cargas eléctricas negativas añadidas al anticuerpo modificado resultante y, de este modo, su movilidad electroforética.

Se ha descubierto que puede conseguirse la saturación de todos los grupos amino e hidroxilo contenidos en un anticuerpo si se utiliza un exceso de anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico. Por "exceso", se entiende que la movilidad electroforética del anticuerpo modificado resultante deja de aumentar con la concentración de anhídrido de ácido carboxílico utilizado, y/o que el peso molecular del anticuerpo modificado aumenta con respecto al peso molecular del anticuerpo nativo (el peso molecular puede medirse en kDa de forma convencional. Un aumento del peso molecular puede estar asociado con la reticulación del anticuerpo).

De acuerdo con una realización particular, la concentración del anhídrido de ácido carboxílico utilizado para la modificación del anticuerpo es de 10 mM y 200 mM, en particular de 50 mM a 160 mM. De acuerdo con una realización particular, la concentración del anhídrido de ácido carboxílico utilizado para la modificación del anticuerpo policlonal es igual o está por debajo de 200 mM o es igual o está por debajo de 150 mM, en particular de 50 mM a 200 mM, en particular de 100 a 150 mM.

De acuerdo con una realización particular, la concentración del anhídrido de ácido carboxílico utilizado para la modificación del anticuerpo monoclonal es igual o está por debajo de 75 mM, en particular de 10 mM a 75 mM.

De acuerdo con una realización más particular, el anhídrido de ácido carboxílico utilizado para la modificación del anticuerpo es anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico, utilizado dentro de los intervalos divulgados en cualquiera de los párrafos anteriores.

De acuerdo con una realización particular, la modificación del anticuerpo se logra utilizando una concentración de anhídrido que evita una pérdida significativa de la capacidad del anticuerpo para unirse a la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma. Por "pérdida significativa" se entiende que el anticuerpo modificado no es adecuado para unirse apropiadamente a la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma con el fin de lograr el método descrito en el presente documento. De acuerdo con una realización particular, tales concentraciones son como se divulga en los párrafos anteriores.

De acuerdo con una realización particular, la concentración del anticuerpo a modificar con anhídrido de ácido carboxílico se adapta para evitar el enlace entre las moléculas de anticuerpo modificadas, lo que más adelante puede afectar la especificidad del anticuerpo modificado resultante. Convenientemente, el experto en la materia puede estimar fácilmente el enlace entre las moléculas de anticuerpo modificadas, mediante la medición del peso molecular del anticuerpo resultante. Por lo tanto, el experto en la materia determinará fácilmente la concentración de anticuerpo apropiada a utilizar.

De acuerdo con una realización particular, la concentración del anticuerpo a modificar para fines de modificación de anticuerpos es de 0,1 a 30 g/l.

De acuerdo con una realización particular, la concentración de anticuerpo policlonal utilizada para la modificación del anticuerpo policlonal está por debajo de 30 g/l, en particular de 3 a 30 g/l.

De acuerdo con una realización particular, la concentración de anticuerpo monoclonal utilizada para la modificación del anticuerpo monoclonal está por debajo de 10 g/l, en particular de 0,1 a 10 g/l.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado tiene la capacidad/aptitud de formar un inmunocomplejo con una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma, en donde el inmunocomplejo es soluble dentro de un gel electroforético, en particular el gel electroforético utilizado con el método de la invención. Por "inmunocomplejo soluble", se entiende un complejo que no precipita o no se encuentra en forma precipitada en un medio que es un gel electroforético como se define en el presente documento, especialmente un gel electroforético utilizado para llevar a cabo el método de la invención.

De acuerdo con una realización particular, un anticuerpo modificado utilizado en la presente invención ha perdido su capacidad/aptitud de precipitación en un medio que es un gel electroforético como se define en el presente documento, especialmente un gel electroforético utilizado para llevar a cabo el método de la invención. De acuerdo con una realización más particular, un anticuerpo modificado utilizado en la presente invención ha perdido su capacidad/aptitud de precipitación como se define anteriormente, mientras mantiene su capacidad de unirse y desplazar su antígeno (es decir, la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma), de acuerdo con la presente divulgación.

Además, se ha descubierto que el uso adicional de antisueros (anticuerpos de captura) dirigidos contra al menos uno de los componentes del inmunocomplejo formado en la etapa d. anterior hizo posible la precipitación de un inmunocomplejo formado entre un anticuerpo modificado como se define en el presente documento y una inmunoglobulina diana o fragmento del mismo como se define en el presente documento.

Por lo tanto, la etapa d. descrita anteriormente consiste en la aplicación de al menos un anticuerpo (o antisuero) de captura en la zona (o zonas) apropiada de la placa de gel sometida a electroforesis, para permitir su reacción con la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento (o fragmentos) de la misma y/o con determinado isotipo (o isotipos) de anticuerpo, en condiciones que permitan la formación de inmunocomplejos precipitados y/o detectables.

De acuerdo con una realización particular, dichas "condiciones que permiten la formación de inmunocomplejos precipitados y/o detectables" son convencionales en el contexto de la IFE. En particular, se pueden aplicar sin cambios las condiciones convencionales detalladas en la referencia (1).

El anticuerpo (o anticuerpos) de captura puede ser específico para uno u otro componente (o componentes) del inmunocomplejo (ya sea la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma, o el isotipo de anticuerpo determinado, incluido un isotipo de anticuerpo modificado), o específico para el inmunocomplejo tomado en su conjunto, es decir, un inmunocomplejo formado entre un anticuerpo modificado y su componente monoclonal/inmunoglobulina diana o fragmento del mismo, o antisuero policlonal.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo (o anticuerpos) de captura destinados a revelar el inmunocomplejo de anticuerpo modificado/diana tiene especificidad por la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma dentro del inmunocomplejo, especialmente el inmunocomplejo soluble.

De acuerdo con una realización particular, el procedimiento de inmunofijación después de la electroforesis en presencia de un anticuerpo modificado utiliza sueros anti-inmunoglobulinas humanas (anticuerpo (o anticuerpos) de captura) comunes para fines de tipificación.

De acuerdo con una realización particular, cada carril del gel se incubaba con un antisuero anti humano específico

(anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) como anticuerpos de captura.

Además, se divulga un método para la obtención de un anticuerpo modificado, especialmente un anticuerpo modificado adecuado para su uso en los métodos de IFE descritos en el presente documento, que implica la reacción de un anticuerpo como se define y/o divulga en el presente documento con un anhídrido de ácido carboxílico, como se define y/o divulga en el presente documento.

Los anticuerpos adecuados que pueden modificarse, por consiguiente, pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, como se define o divulga en cualquiera de las realizaciones de la presente descripción.

Los anhídridos de ácido carboxílico adecuados son como se define o divulga en cualquiera de las realizaciones de la presente descripción.

De acuerdo con una realización particular, el anhídrido de ácido carboxílico es anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico.

De acuerdo con otras realizaciones, los anhídridos de ácido carboxílico pueden seleccionarse del grupo de compuestos de dianhídridos tales como dianhídrido piroméltico (anhídrido 1,2,4,5 benceno tetracarboxílico), dianhídrido benzofenona-3,3',4,4'-tetracarboxílico y dianhídrido dietilentriaminopentaacético. Al reaccionar con un anticuerpo, estos dianhídridos proporcionan más cargas negativas adicionales que las obtenidas con el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico.

De acuerdo con una realización particular, con estos compuestos que tienen dos grupos anhídrido de ácido carboxílico, la solución de anticuerpo se diluye durante su modificación con dianhídrido, para reducir la tasa de reticulación de proteínas que pueda afectar la especificidad del anticuerpo y su capacidad para unirse y desplazar a la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma. La concentración diluida de anticuerpo puede ser de 0,1 a 30 g/l.

De acuerdo con una realización particular, la concentración de anticuerpo policlonal utilizada para la modificación del anticuerpo policlonal está por debajo de 30 g/l, en particular es de 3 a 30 g/l.

De acuerdo con otra realización particular, la concentración de anticuerpo monoclonal utilizada para la modificación del anticuerpo monoclonal está por debajo de 10 g/l, en particular es de 0,1 a 10 g/l.

De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado se obtiene de acuerdo con las siguientes etapas:

- Proporcionar una solución de anticuerpo en una concentración como se define en una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, opcionalmente en un tampón apropiado, opcionalmente después de diluir dicha solución de anticuerpo para obtener una solución de anticuerpo que tiene una concentración de 0,1 a 30 g/l, y
- Añadir a dicha solución de anticuerpo un anhídrido de ácido carboxílico disuelto en un disolvente anhidro adecuado, en particular un disolvente anhidro seleccionado entre: dioxolano, dimetilformamida y dimetilsulfóxido, estando la concentración del anhídrido de ácido carboxílico en particular en un intervalo de concentración como se define en el presente documento, especialmente de 10 mM y 200 mM, en particular de 50 a 160 mM, realizándose la adición a un pH de 7,5 a 9, si es necesario mediante la adición apropiada de hidróxido de sodio, finalmente en agitación controlada, en particular a temperatura ambiente (es decir, a una temperatura de 20 a 25 °C), y
- Opcionalmente, dejar que la reacción se desarrolle durante 10 a 20 minutos, en particular 15 minutos, especialmente a temperatura ambiente como se define en el presente documento, y
- Recuperar el anticuerpo modificado obtenido.

De acuerdo con realizaciones particulares, la solución de anticuerpo proporcionada está en una concentración como se define en una cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, incluyendo en la sección de ejemplos. La cantidad de solución de anticuerpo proporcionada puede oscilar de 100 µl a 15 ml, y el experto en la materia puede determinarla adecuadamente en conformidad con la práctica común.

La adición de hidróxido de sodio puede realizarse convencionalmente de acuerdo con el conocimiento común del experto en la materia. Se proporcionan ejemplos en la sección experimental. El experto en la materia adaptará fácilmente el procedimiento de acuerdo con el pH a mantener, como se divulga en el presente documento.

La recuperación del anticuerpo modificado obtenido puede realizarse convencionalmente mediante diálisis.

De acuerdo con una realización particular, la adición de una solución de anhídrido e hidróxido de sodio a la solución de anticuerpo proporcionada se realiza de acuerdo con un esquema de gota a gota: la solución de anhídrido y el hidróxido de sodio se añaden alternativamente al medio de reacción que contiene el anticuerpo a modificar, dicho medio de reacción se mantiene en agitación, para mantener el pH del medio de reacción en el intervalo de 7,5 a 9. El uso de un dispositivo apropiado, tal como un instrumento de titulación pH-Stat, puede facilitar el procedimiento. La

temperatura es como se indica anteriormente.

De acuerdo con una realización particular, para modificar un anticuerpo policlonal se utiliza el esquema gota a gota. También se puede utilizar para modificar un anticuerpo monoclonal cuando el volumen de anticuerpo a modificar es importante.

De acuerdo con lo anterior, los anhídridos y los dianhídridos se disuelven en un disolvente anhidro adecuado, tal como dioxolano, dimetilformamida y dimetilsulfóxido, para evitar su reacción con grupos hidroxilo del agua.

De acuerdo con una realización particular, se disuelve con dioxolano una cantidad definida de anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico, y se añade gota a gota utilizando los medios y la practica convencionales en una solución de anticuerpo que tiene una concentración de 0,1 a 10 g/l si el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o una concentración de 3 a 30 g/l si el anticuerpo es un anticuerpo policlonal (alcalinizándose dicha solución de anticuerpo con hidróxido de sodio), en agitación controlada y pH de 7,5 a 9 a temperatura ambiente, como se define en el presente documento, mediante el uso de un instrumento de titulación pH-Stat u otro aparato (o aparatos) convencional bien conocido en la técnica. La recuperación del producto de reacción se puede realizar de acuerdo con el siguiente procedimiento: el producto de reacción obtenido de la etapa de adición gota a gota se puede dializar contra tampón fosfato 100 mM para eliminar el disolvente (por ejemplo, dioxolano) y el exceso de reactivos.

De acuerdo con los procedimientos divulgados anteriormente y en el presente documento, el anticuerpo modificado así obtenido, que posee cargas negativas adicionales, está entonces listo para su uso para el desplazamiento específico de una inmunoglobulina diana o fragmento de la misma de acuerdo con la presente divulgación, utilizando el procedimiento de electroforesis con inmunofijación descrito en el presente documento.

De acuerdo con una realización particular, la relación de la concentración del anticuerpo modificado específico para la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma y la concentración de la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma en la muestra analizada es de 0,1/1 a 20/1, preferentemente de 1/1 a 5/1.

Una relación de 0,1/1 significa que 0,1 g/l de anticuerpo modificado es suficiente para desplazar totalmente 1 g/l de una inmunoglobulina diana o un fragmento de la misma. Una relación de 20/1 significa que 20 g/l de anticuerpo modificado es suficiente para desplazar totalmente 1 g/l de una inmunoglobulina diana o un fragmento de la misma.

En concreto y de acuerdo con una realización particular, varias partes alícuota de la muestra biológica a analizar se depositan en carriles paralelos de la placa de gel, en la etapa a. definida anteriormente para el método de la invención, con al menos un carril cargado con al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b. definida anteriormente, opcionalmente, cargándose varios carriles con un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b.

De acuerdo con una realización particular, al menos un carril de la placa de gel es un carril de referencia que no se somete a la etapa d. definida anteriormente, pero en su lugar se pone en contacto con una solución fijadora en lugar de con un antisuero, siendo las etapas a. a c., y opcionalmente la e, las mismas.

De acuerdo con una realización particular, seis partes alícuota de la muestra biológica se depositan en carriles paralelos de la placa de gel en la etapa a., incluyendo un carril de referencia y cinco carriles que se ponen en contacto respectivamente en la etapa d. con antisueros específicos para IgG, IgA, IgM, IgK e IgL, cargándose al menos un carril con al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b.

De acuerdo con una realización particular, dicha partes alícuota se diluyen en un diluyente apropiado y convencional, antes de depositarse en sus respectivos carriles de la placa de gel, de acuerdo con práctica convencional conocida en la técnica. En particular, habitualmente se realiza una dilución 1/6 de la muestra biológica para la parte alícuota utilizada para el carril G, y habitualmente se realiza una dilución 1/3 de la muestra biológica para la parte (o partes) alícuota utilizada para los carriles ELP (referencia), A, M, K, L. La dilución de referencia es generalmente 1/3. Estas diluciones se indican solo a título informativo y no pueden restringir de forma limitante el método divulgado en el presente documento: el experto en la materia puede y sabe cómo adaptar fácilmente estas diluciones deliberadamente, en caso de sospecharse que una dilución mayor de la muestra puede ser beneficiosa para la interpretación de los resultados, en particular cuando se sabe que se puede sospechar o presentar un alto fondo policlonal.

De acuerdo con un aspecto particular, el método de preparación de los anticuerpos modificados se realiza para la preparación de un anticuerpo modificado que reconoce y, en particular, que se une a un anticuerpo terapéutico que puede tenerse como objetivo en la muestra biológica analizada. En consecuencia, el método de preparación del anticuerpo modificado hace posible, por consiguiente, la recuperación de un anticuerpo modificado que reconoce un anticuerpo seleccionado entre Adalimumab, Trastuzumab, Ofatumumab, Siltuximab, Rituximab, Bevacizumab, Infliximab, Cetuximab y Efalizumab, Natalizumab, Panitumumab, Tolicizumab, Clenoliximab, Etaracizumab, Visilizumab, Elotuzumab, Nimotuzumab, Ramicirumab, Elotuzumab, Daratumumab, Mapatumumab, Golimumab, Ustekinumab y anticuerpos funcionalmente equivalentes, es decir, anticuerpos que tienen la misma diana antigénica que los enumerados anteriormente

De acuerdo con una realización particular, la placa de gel se divide en varias secciones que permiten ejecutar varias electroforesis con inmunofijación al mismo tiempo.

5 De acuerdo con una realización particular, el método de la invención comprende además una etapa de comparación del perfil (o perfiles) electroforético obtenido realizando las etapas a. a d., y opcionalmente la e., con el perfil (o perfiles) electroforético obtenido en las mismas condiciones y con la misma muestra biológica, pero en ausencia de cualquier anticuerpo modificado como se define en la etapa b.

10 Por consiguiente, el método de la invención puede ejecutarse con un sistema de IF tal como el sistema Hydrasys® fabricado por SEBIA.

En este caso, el anticuerpo modificado puede aplicarse sobre el gel utilizando un aplicador de muestras o un cargador de muestras. Se puede utilizar un aplicador de membrana porosa para aplicar anticuerpo modificado en el gel. Pueden
15 emplearse para la aplicación de anticuerpos modificados en el gel otros dispositivos, tal como los aplicadores reutilizables y la película fina de plástico con ranuras que se utilizan habitualmente para la aplicación de muestras sobre la electroforesis en gel.

Preferentemente, cuando se utiliza el sistema de IF Hydrasys®, el aplicador de muestras y el aplicador de anticuerpo modificado deben tener la misma configuración y las mismas dimensiones para alinearse y coincidir con cada área de electroforesis (carriles de IFE). La solución de anticuerpo modificados se puede cargar en carriles de electroforesis paralelos del gel. El anticuerpo modificado se puede aplicar en todos los carriles de muestras del gel (por ejemplo, carriles ELP, G, A, M, K, L) o en carriles específicos dependiendo de la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma que se va a desplazar (G y K; G y L; A y K; A y L; M y K; M y L).

25 De acuerdo con otra realización particular, el anticuerpo modificado se aplica en un área del gel que está separada del área de depósito de muestras, estando en el mismo carril pero en una posición que es más catódica con respecto a la posición del área de depósito de muestras, en particular entre la extremidad catódica de la placa de gel y el área de depósito de muestras, para cada carril en cuestión. De acuerdo con una realización más particular, la distancia entre el punto de aplicación del anticuerpo modificado y el de la muestra es igual o menor que 5 mm.

De acuerdo con una realización particular, especialmente cuando se utiliza el cargador convencional utilizado con el sistema Hydrasys®, la distancia entre el punto de aplicación del anticuerpo modificado y el de la muestra es de 5 mm.

35 Sin embargo, de acuerdo con otra realización particular, el área de depósito del al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con el método descrito en el presente documento está a una distancia del área de depósito de muestras que es menor que 5 milímetros, en particular de 2 a 3 milímetros, más particularmente a una distancia de 2 o 3 milímetros.

40 De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado se aplica sobre el gel antes de la aplicación de la muestra. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo modificado se carga en el gel después de la aplicación de la muestra o durante la aplicación de la muestra.

De acuerdo con una realización ventajosa cuando se utiliza el sistema Hydrasys®, el anticuerpo modificado se aplica
45 sobre el gel durante la aplicación de la muestra, debido a que en esta situación no hay cambio en el programa de inmunofijación ya presente en dicho instrumento semiautomático.

De acuerdo con otro aspecto, también se ha descubierto que puede conseguirse una buena capacidad del anticuerpo modificado para unirse y desplazar una inmunoglobulina diana o fragmento de la misma cuando el área de depósito de muestras y el punto de aplicación del anticuerpo modificado están muy cerca uno del otro (el punto de aplicación de la muestra más cerca del lado anódico del gel y el punto de aplicación del anticuerpo modificado más cerca del
50 lado del cátodo del gel).

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización particular, el área de depósito del al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con el método descrito en el presente documento está a una distancia del área de depósito de muestras que es menor que 3 milímetros, en particular de 0 a 3 milímetros.

De hecho, de acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado se aplica en un área del gel que coincide con el área de depósito de muestras, para cada carril en cuestión. La distancia analizada en los párrafos anteriores es, por consiguiente, de 0 milímetros. En este caso, se entenderá que, de acuerdo con la invención, el anticuerpo modificado y el depósito de la muestra se depositan entonces en el gel por separado, aunque en cualquier orden. De acuerdo con una realización particular, el anticuerpo modificado se deposita antes del depósito de la muestra en ese punto. En otra realización, el anticuerpo modificado se deposita después del depósito de la muestra en ese punto

65 De acuerdo con una realización particular, el método de electroforesis con inmunofijación descrito en el presente documento se lleva a cabo en una solución tampón (o soluciones tampón) utilizado comúnmente en la técnica y para

la IFE, tal como tampón Tris/Veronal, a un pH (o a los pH) convencional, por ejemplo, utilizando un tampón Tris/Veronal a pH 9,2, durante un tiempo convencional para llevar a cabo una IFE de acuerdo con los protocolos habituales, tal como 15 minutos o menos, y a una temperatura convencional, tal como 20 °C. Estos parámetros se pueden ajustar fácilmente de acuerdo con la práctica o las recomendaciones del fabricante (o fabricantes) de dispositivos para IFE.

5 De acuerdo con una realización particular, la migración de las muestras y del anticuerpo modificado se lleva a cabo en 15 minutos o menos a 20 vatios.

10 De acuerdo con una realización particular, la migración de las muestras y del anticuerpo modificado se lleva a cabo a 20 °C.

De acuerdo con una realización particular, la migración de las muestras y del anticuerpo modificado se lleva a cabo en 15 minutos o menos, a 20 vatios a 20 °C.

15 De acuerdo con un aspecto particular, el tiempo de aplicación en el gel de los anticuerpos modificados de acuerdo con la presente divulgación y de la muestra (o muestras), antes del comienzo de la electroforesis (migración), puede durar aproximadamente 1 minuto, en particular es de 1 minuto.

20 De acuerdo con un aspecto particular, el tiempo de incubación en el gel del anticuerpo (o anticuerpos) de captura de acuerdo con la presente divulgación, puede durar aproximadamente 5 minutos, en particular es de 5 minutos.

El experto en la materia puede adaptar fácilmente los tiempos de incubación, buscando una mejor sensibilidad, de acuerdo con la práctica convencional en el campo.

25 De acuerdo con una realización particular, el método de la invención comprende además una etapa de tinción del gel tras la finalización de la electroforesis.

30 De acuerdo con una realización más particular, la tinción de los inmunocomplejos formados en la etapa c. y, opcionalmente, en la etapa d. descrita anteriormente con respecto al método de la invención, se puede lograr de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, con el reactivo (o reactivos) negro de amido, violeta ácido o rojo coomassie. La tinción también se puede lograr utilizando un marcador.

35 Un método como se describe en el presente documento también puede comprender adicionalmente una etapa de análisis y/o de interpretación de los resultados de la IFE, y/o de llegar a conclusiones sobre el estado de salud del paciente, cuya muestra biológica se ha sometido a un método como se describe en el presente documento.

40 La invención se refiere además a un método para la detección de una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) interferente o fragmento (o fragmentos) de la misma que se sospecha que está presente en la muestra biológica de un paciente, que comprende la etapa de realizar al menos un método de análisis por electroforesis con inmunofijación (IFE) como se describe en el presente documento en una muestra extraída de un paciente, en donde la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana predeterminada o fragmento (o fragmentos) de la misma que se tiene como objetivo en dicho método (o métodos) de IFE es (son) dicha inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) interferente sospechosa o fragmento (o fragmentos) de la misma.

45 De acuerdo con una realización particular, por "inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) interferente o fragmento (o fragmentos) de la misma", se entiende un componente (o componentes) monoclonal o un anticuerpo (o anticuerpos) terapéutico monoclonal como se define en el presente documento.

50 Además, se divulga un kit que puede utilizarse junto con un método (o métodos) o un kit (o kits) de inmunofijación conocido, especialmente cuando dicho método se ejecuta en un instrumento Hydrasys®, y posiblemente con el uso de un kit (o kits) existente apropiado para IFE, sin ningún cambio en el procedimiento de inmunofijación convencional con respecto a la preparación de las muestras y la elección del programa del instrumento.

55 En tal kit son especialmente necesarios, la presencia de al menos un anticuerpo modificado contra una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana predeterminada o fragmento (o fragmentos) de la misma, como se divulga en el presente documento, y la presencia de un aplicador adicional para la aplicación de anticuerpos modificados sobre el gel antes del procedimiento de electroforesis, en un punto de depósito como se describe en el presente documento.

60 Por lo tanto, la presente divulgación también divulga un kit adecuado para llevar a cabo un método de acuerdo con la presente divulgación, si es apropiado en combinación con un kit (o kits) conocido, comprendiendo o consistiendo dicho kit en:

- 65
- Un anticuerpo (o anticuerpos) modificado contra una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma como se define y/o divulga en el presente documento, y
 - Un aplicador (o aplicadores) para la aplicación de dicho anticuerpo (o anticuerpos) modificado sobre el gel, de

acuerdo con la descripción proporcionada en el presente documento para el punto (o puntos) de depósito.

Dicho kit puede utilizarse en combinación con un kit (o kits) conocido, el último de los cuales puede abarcar uno o varios de los siguientes elementos: un gel (o geles) de agarosa, un tampón (o tampones), un reactivo (o reactivos) de tinción y, opcionalmente, u diluyente (o diluyentes) para dicho reactivo (o reactivos) de tinción, una solución (o soluciones) de fijación, adecuados para permitir la formación de inmunocomplejos precipitados y/o detectables, como se define en el presente documento, papel (o papeles) de filtro para la absorción en la superficie del gel de la humedad y/o de un reactivo (o reactivos) o una solución (o soluciones) en exceso, y/o la absorción en el gel de una proteína (o proteínas) no precipitada y, opcionalmente, un reactivo (o reactivos) de antisueros como anticuerpos de captura y, opcionalmente, un diluyente (o diluyentes) apropiado, un peine (o peines) o cualquier otro aplicador (o aplicadores) adecuado para la aplicación de muestra o una plantilla (o plantillas).

En una realización particular, el anticuerpo (o anticuerpos) modificado es (son) un anticuerpo modificado que reconoce un anticuerpo seleccionado entre Adalimumab, Trastuzumab, Ofatumumab, Siltuximab, Rituximab, Bevacizumab, Infliximab, Cetuximab y Efalizumab, Natalizumab, Panitumumab, Tolicizumab, Clenoliximab, Etaracizumab, Visilizumab, Elotuzumab, Nimotuzumab, Ramcirumab, Elotuzumab, Daratumumab, Mapatumumab, Golimumab, Ustekinumab y anticuerpos funcionalmente equivalentes, es decir, anticuerpos que tienen la misma diana antigénica que los enumerados anteriormente. En una realización particular, el anticuerpo modificado (o anticuerpos modificados) presentes en el kit se proporciona (o proporcionan) como una solución lista para usar, tal como se divulga en el presente documento.

La interpretación de los resultados de los experimentos de IFE convencionales puede ser sencilla para los expertos en la materia, excepto en determinadas situaciones. De hecho, los métodos de IFE actuales no siempre evitan la presencia de patrones confusos.

En lo sucesivo en el presente documento se proporciona un breve resumen de las conclusiones que se pueden extraer de los resultados de la IFE, cuando no son ambiguos, así como un resumen de las dificultades que se pueden encontrar para la interpretación de resultados.

Ausencia de componente monoclonal

- Una muestra de suero normal muestra una tinción difusa ligera de inmunoglobulinas policlonales en todos los carriles.
- Una hipergammaglobulinemia se caracteriza por una zona gamma difusa intensamente teñida y por la ausencia de bandas restringidas. Sin embargo, este patrón no excluye la posibilidad de la presencia de una proteína (o proteínas) monoclonal discreta. La presente invención tiene como objetivo superar el problema relacionado con la presencia de esta proteína (o proteínas) monoclonal.

Presencia de un componente monoclonal

- La presencia de una proteína monoclonal (gammapatía) se caracteriza por una banda monoclonal detectada con uno de los antisueros anti-cadena pesada (gamma, alfa o mu) y con antisuero anti-cadena ligera kappa o lambda. La banda monoclonal detectada debe ubicarse a la misma distancia de migración que la banda monoclonal sospechosa vista en el carril de referencia (ELP).
- La ausencia de reacción con cualquiera de los antisueros anti-cadena pesada aplicados y la reacción con uno de los antisueros para cadena ligera podrían indicar una gammapatía de Ig D o Ig E muy rara. La siguiente etapa sería confirmar esta hipótesis realizando una IFE con antisueros anti-cadena pesada delta o épsilon. Este resultado también puede indicar una gammapatía de cadena ligera. La siguiente etapa sería confirmar esta hipótesis realizando una IFE con antisueros anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.
- No observar una reacción positiva con ninguno de los antisueros anti-cadena ligera aplicados, al tiempo que un antisuero anti-cadena pesada reacciona, podría indicar una gammapatía de cadena pesada muy rara (gamma, alfa, delta o mu). En estos casos, se recomendaría utilizar otro método para confirmar el resultado (por ejemplo, inmunosustracción por electroforesis capilar o inmunoprecipitación en un tubo aumentando el tiempo de incubación de la muestra con antisueros anti-cadena ligera). La presente invención supera este problema de tener que recurrir a otro método.

Presencia de dos o más componentes monoclonales

En algunos casos, proliferan varios clones de linfocitos B, según lo indicado por varias bandas monoclonales que pueden revelarse por inmunofijación:

- Una gammapatía biclonal se caracteriza por la presencia de dos bandas de cadena pesada (idénticas o distintas) y dos bandas de cadenas ligeras (idénticas o distintas). Ocasionalmente, estas bandas biclonales podrían comigrar y, por lo tanto, hacer difícil la interpretación. La presente invención define medios que tienen como objetivo superar este problema.
- Una gammapatía oligoclonal se caracteriza por la presencia de múltiples bandas, generalmente débiles, de uno o más tipos de cadenas pesadas y de uno o dos tipos de cadenas ligeras. Ocasionalmente, una de estas bandas puede

ser relativamente prominente. Sin embargo, la detección de una gammapatía oligoclonal en presencia de un fondo policlonal significativo puede ser dudosa. Debido a la dificultad de interpretar este tipo de patrones de IFE, por lo general se recomienda repetir la IFE en 3 a 6 meses. La presente invención tiene como objetivo superar este problema.

- 5 Para los procedimientos de inmunofijación también se recomienda utilizar un gel (o geles) de alta resolución, para obtener una mejor resolución en la zona gamma, donde la zona alargada de gammaglobulina permite la visualización de múltiples bandas, lo que lleva mucho tiempo.

Casos especiales

- 10 • Para algunas gammapatías de Ig A, el antisero anti-cadena ligera puede presentar una leve afinidad con la inmunoglobulina monoclonal correspondiente, y su detección es más difícil. En ese caso, se recomienda analizar la muestra con el procedimiento de inmunofijación de Bence Jones, en que la reacción del antisero se amplifica debido a un mayor tiempo de incubación. La presente invención tiene como objetivo superar este problema.
- 15 • Con fondo policlonal, se puede recomendar el uso de una dilución mayor de la muestra para los carriles de los antiseros, y especialmente para el carril de IgG. Pero en ocasiones el procedimiento de dilución no es satisfactorio, ya que la proteína monoclonal también podría diluirse. Entonces, la posible pérdida de bandas muy finas se presenta en el fondo policlonal, ya que policlonal no excluye la posibilidad de la presencia de proteína monoclonal. De hecho, la adaptación del factor de dilución aplicado a la muestra sometida a ensayo es una práctica común, realizada por el
- 20 usuario de la IFE experto, sobre la base de conjeturas. Sin embargo, incluso un usuario experto puede elegir un factor de dilución no satisfactorio, como se ha explicado anteriormente. La presente invención tiene como objetivo superar este problema.

- 25 A partir de lo anterior, se puede observar que, en varios casos, la interpretación de los resultados de la IFE realizada utilizando los métodos convencionales actuales puede ser difícil. Generalmente, la presencia del denominado componente interferente (o componentes interferentes) que puede comigrar en un gel de IFE hace que la interpretación sea más difícil. Como se ilustra en los ejemplos siguientes, la invención divulgada hace posible superar satisfactoriamente estas limitaciones.

- 30 Además, otras características de la invención serán evidentes al leer los ejemplos y las figuras, que ilustran los experimentos realizados por los inventores, como complemento de las características y definiciones proporcionadas en la presente descripción.

Leyenda de las figuras

- 35 Figura 1. (1A) Soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys® cargado con peines en las posiciones 3, 8 y 9. (1) muestra los aplicadores (peines) de muestras colocados en las posiciones 3 y 9, (2) muestra el aplicador (peine) de anticuerpo modificado colocado en la posición 8 (1B) Soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys® con peines bien alineados con los carriles del gel de agarosa de IF. (3) muestra el gel de agarosa, (4) muestra el lado
- 40 catódico del gel, (5) muestra el lado anódico del gel.

- Figura 2. Inmunodesplazamiento en gel de Adalimumab utilizando anticuerpo monoclonal modificado anti Adalimumab (con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico) seguido de inmunofijación. Resultado de IF 1: muestra de suero normal; aplicada en el gel en la posición de peine 3 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®. Resultado
- 45 de IF 2: muestra de suero normal enriquecida con Adalimumab 1 g/l aplicada en el gel en la posición de peine 3 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 3 = resultado de IF 4: muestra de suero normal enriquecida con Adalimumab 1 g/l (aplicada en el gel en la posición de peine 9 del soporte de aplicadores) que está inmunodesplazada en los carriles G y K, utilizando anticuerpo monoclonal modificado anti-Adalimumab, cargado en los pocillos 3, 6, 10 y 13 de un aplicador adicional adaptado al dispositivo Hydrasys® colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (6)
- 50 muestra el carril G con Adalimumab desplazado (Adalimumab de G), (7) muestra el carril K con Adalimumab desplazado (Adalimumab de K), (8) muestra el Adalimumab en los carriles G y K, (9) muestra los complejos entre el Adalimumab y el anti-Adalimumab modificado.

- Figura 3. Inmunodesplazamiento en gel de Trastuzumab utilizando anticuerpo monoclonal modificado anti-Trastuzumab (con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico) seguido de inmunofijación. Resultado de IF 1: muestra de suero normal; aplicada en el gel utilizando la posición 3 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®. Resultado de IF 2: muestra de suero normal enriquecida con Trastuzumab 0,25 g/l; aplicada en el gel con la posición
- 55 de peine 3. Resultado de IF 3 = resultado de IF 4: muestra de suero normal enriquecida con Trastuzumab 0,25 g/l (aplicada en el gel con la posición de peine 9) que está inmunodesplazada en los carriles G y K, utilizando anticuerpo monoclonal modificado anti-Trastuzumab, cargado en los pocillos 3, 6, 10 y 13 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (10) muestra el carril G con Trastuzumab desplazado (Trastuzumab de G), (11) muestra el carril K con Trastuzumab desplazado (Trastuzumab de K), (12) muestra el Trastuzumab en los carriles G y K, (13) muestra los complejos entre el Trastuzumab y el anti-Trastuzumab modificado.

- 65 Figura 4. (4A) Inmunodesplazamiento en gel de los componentes IgK e IgL del carril G de la muestra C utilizando anti IgK y anti IgL modificados (con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico), en el caso de una gammapatía oligoclonal con

un fondo policlonal significativo, seguido de inmunofijación. Resultado de IF 1 = resultado de IF 2: muestra C; aplicada dos veces en el gel utilizando la posición de aplicador 3 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 3: Muestra C (aplicada en el gel utilizando la posición de peine 9), en que el componente IgK está inmunodesplazado en el carril G (IgK de G), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 3 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 4: Muestra C (aplicada en el gel con la posición de peine 9), en que el componente IgL está inmunodesplazado en el carril G (IgL de G), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 10 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (14) muestra el carril G con el componente IgK desplazado (G-IgK), (15) muestra el carril G con el componente IgL desplazado (G-IgL), (16) muestra la Banda C1 (no visible en el carril G del resultado de IF 1), (17) muestra el complejo de IgK/anti IgK modificado, (18) muestra el complejo de IgL/anti IgL modificado.

(4B) Inmunodesplazamiento en gel de los componentes IgK e IgL del carril G de la muestra D, utilizando anti IgK y anti IgL modificados (con anhídrido 1,2,4,5-benceno tetracarboxílico o dianhídrido piromelítico), en el caso de una gammapatía oligoclonal con un fondo policlonal significativo, seguido de inmunofijación. Resultado de IF 1= resultado de IF 2: muestras D; aplicada dos veces en el gel utilizando la posición de aplicador 3 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 3: Muestra D (aplicada en el gel utilizando la posición de peine 9), en que el componente IgK está inmunodesplazado en el carril G (IgK de G), utilizando anti IgK modificado cargado en el pocillo 3 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 4: Muestra D (aplicada en el gel con la posición de peine 9), en que el componente IgL está inmunodesplazado en el carril G (IgL de G), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 10 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (19) muestra el carril G con el componente IgK desplazado (G-IgK), (20) muestra el carril G con el componente IgL desplazado (G-IgL), (21) muestra la Banda D1 (no visible en el carril G del resultado de IF 1), (22) muestra el complejo de IgK/anti IgK modificado, (23) muestra el complejo de IgL/anti IgL modificado.

Figura 5. Inmunodesplazamiento en gel de IgK e IgL en el carril A utilizando anti IgK y anti IgL modificados (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico), seguido de inmunofijación en el caso de la muestra E, que es una gammapatía de IgA sin ninguna cadena ligera correspondiente. Resultado de IF 1: muestra E; aplicada en el lado izquierdo del gel (fila inferior) utilizando la posición de aplicador 3 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 2: Muestra E; aplicada en el lado derecho del gel (fila inferior) utilizando la posición de aplicador 3 del soporte de aplicadores, en que el componente IgK está inmunodesplazado en el carril A (IgK de A), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 11 (para estar alineado con el carril A) del aplicador adicional colocado en la posición 2 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 4: Muestra E (aplicada en el gel con la posición de aplicador 9), en que el componente IgL está inmunodesplazado en el carril A (IgL de A), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 11 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (24) muestra el carril A con el componente IgK desplazado (IgK de A), (25) muestra el carril A con el componente IgL desplazado (IgL de A), (26) muestra el complejo de IgA/anti IgL modificado.

Figura 6. Inmunodesplazamiento en gel de IgG e IgL, respectivamente en los carriles L y G, utilizando anti IgG modificado y anti IgL modificado (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico), seguido de inmunofijación en el caso de la muestra F, una gammapatía biclonal con comigración de bandas (GK +GL). Resultado de IF 1= resultado de IF 2: muestra F; aplicada dos veces en el gel utilizando la posición de aplicador 3 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 3: Muestra F (aplicada en el gel utilizando la posición de peine 9), en que la banda F1 se inmunodesplaza en el carril L utilizando anti IgG modificado (IgG de L) cargado en el pocillo 7 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. Resultado de IF 4: Muestra F (aplicada en el gel con la posición de peine 9), en que el componente IgL está inmunodesplazado en el carril G (IgL de G), utilizando anti IgL modificado cargado en el pocillo 10 del aplicador adicional colocado en la posición 8 del soporte de aplicadores. (27) muestra el carril L con el componente IgG desplazado (IgG de L), (28) muestra el carril G con el componente IgL desplazado (G-IgL), (29) muestra la Banda F1, (30) muestra el complejo de IgL/anti IgG modificado, (31) muestra el complejo de IgG/anti IgL modificado.

MATERIALES Y MÉTODOS - GENERALIDADES

El principio de la técnica de "inmunodesplazamiento en gel" seguida de inmunofijación de acuerdo con la presente invención se ha implementado en el sistema de electroforesis Hydrasys® (SEBIA) de última tecnología, un instrumento semiautomatizado de parámetros múltiples, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se hace referencia con respecto a las características de este dispositivo al Manual de instrucciones disponible de Ref. 1201 - versión 2.2x 2015/03, a disposición de los interesados o proporcionado con los aparatos comercializados hasta el momento.

La técnica de inmunodesplazamiento en gel e inmunofijación de la presente invención se llevó a cabo en el Hydrasys®, realizándose el programa de inmunofijación de principio a fin con el kit Hydragel IF. El kit Hydragel IF es un kit comercializado que comprende geles de agarosa, tiras tamponadas, colorantes violeta ácido o negro de amido, diluyente de muestras, aplicadores para la aplicación de muestras, papeles de filtro, peines de papel de filtro (plantilla convencional referencia PN 1255), segmentos para antisueros (máscara dinámica referencia PN 1260). Los antisueros anti-G, A, M, K, L, Klibre, Llibre, se proporcionan por separado pero son convencionales en el campo.

La carga de muestras en el gel de inmunofijación de agarosa simultáneamente con anticuerpo modificado contra la

inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma se logró utilizando un peine de membrana porosa para muestras diluidas y un peine adicional para el anticuerpo modificado.

El peine de muestras se colgó en una posición distinta a la del anticuerpo modificado. En la Figura 1A y la Figura 1B, los aplicadores de muestras se ubican en las posiciones 3 y 9, y el aplicador de anticuerpo modificado se coloca en la posición 8 del soporte de aplicadores de muestras, para desplazar la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma contenida en las muestras aplicadas en el gel con la posición de peine 9.

La distancia entre la posición 8 y 9 era de 5 mm y la posición 8 estaba cerca del lado catódico y la posición 9 estaba cerca del lado anódico del gel.

La migración de las muestras y del anticuerpo modificado se llevó a cabo en menos de 15 minutos, a 20 W a 20 °C.

Cada carril del gel se incubó a continuación con anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) mediante el uso de la Máscara Dinámica o la Máscara convencional específicas comercializada por Sebia y conocidas en la técnica (referencias anteriores).

El gel se lavó automáticamente, se tiñó con violeta ácido, se decoloró y se secó.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DISEÑADO LLEVADO A CABO EN EL DISPOSITIVO HYDRASYS®

La Figura 1 (1A y 1B) muestra el soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys® con la posibilidad de colgar y aplicar simultáneamente 13 (1, 2, 3....13) aplicadores de muestras distintos sobre el gel. El hueco entre cada uno de los aplicadores dispuestos en el dispositivo es de 5 mm.

Este dispositivo puede permitir entonces la aplicación simultánea del anticuerpo modificado y de las muestras en el gel. Este equipo también permite que el área de aplicación de muestras y el punto de aplicación del anticuerpo modificado se alineen bien en el gel durante el procedimiento de electroforesis.

Dependiendo del formato de gel, el usuario puede escoger realizar el inmunodesplazamiento de la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma en muestras de una única fila o en muestras de todas las filas del gel. El usuario también puede escoger realizar el inmunodesplazamiento en el carril de IF específico G, A, M, K o L.

En la Figura 1, se ilustra la disposición de los aplicadores en el soporte de aplicadores: esta disposición es tal que el inmunodesplazamiento se realiza solo con muestras aplicadas en el gel con la posición de aplicador 9, utilizando un anticuerpo modificado cargado en el gel con el aplicador en la posición 8. Las muestras depositadas con la posición de aplicador 3 (fila inferior) no se inmunodesplazaron con el anticuerpo modificado y se utilizaron como referencia.

La concentración de anticuerpo modificado aplicado en el gel puede ser mayor o menor que la de la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma contenida en la muestra. De acuerdo con una realización particular, la relación de anticuerpo modificado y la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma en términos de concentración puede ser de 0,1/1 a 20/1. De acuerdo con una realización más particular, especialmente preferente, la relación de anticuerpo modificado y la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma en términos de concentración es de 1/1 a 5/1.

Al aplicar un campo eléctrico en el gel para el procedimiento de electroforesis, el anticuerpo modificado aplicado en el gel en un punto que es más catódico con respecto al punto de depósito de muestras, migra más rápido debido a sus cargas negativas adicionales, entonces, cruza los componentes presentes en la muestra (o muestras) depositada y se une y desplaza específicamente a la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) que se tiene como objetivo o fragmento de la misma fuera de la zona de interés, especialmente fuera de la zona gamma.

Dependiendo de la densidad de carga (y movilidad electroforética) del anticuerpo modificado y de la de la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma, la posición del inmunocomplejo resultante (inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma/anticuerpo modificado) se encuentra fuera de la zona de interés como se define en el presente documento, en particular se puede ubicar desde la zona beta hasta la zona de la albúmina, o desde la zona alfa, incluida la zona alfa1 o alfa2, hasta la zona de la albúmina.

Dado que el anticuerpo modificado injertado con cargas negativas adicionales mediante reacción con anhídrido de ácido carboxílico como se divulga en el presente documento ha perdido su capacidad de precipitación, el inmunocomplejo (o inmunocomplejos) resultante ya no precipitará en el gel y no permanecerá en el gel sin su precipitación mediante el uso de antiseros no modificados dirigidos contra al menos uno de los componentes de dicho inmunocomplejo (o inmunocomplejos).

A continuación, después de la separación de las proteínas y del inmunodesplazamiento de la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma con el anticuerpo modificado, los antiseros anti-humano (no modificados) utilizados habitualmente para la IFE (caracterizado por su capacidad de precipitación), que comprenden anticuerpos policlonales contra clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL, IgKlibre, IgLlibre)

se aplican en carriles paralelos (G, A, M, K, L) en el gel. El gel y estos distintos antisueros se incuban a continuación durante un tiempo que permite la formación de otro inmunocomplejo entre las proteínas de la muestra y los anticuerpos de captura.

- 5 El inmunocomplejo formado entre la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma y el anticuerpo modificado generalmente puede reconocerse y precipitarse mediante antisueros anti-humano utilizados convencionalmente en IFE, dado que la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma es generalmente también una proteína humana o humanizada.

- 10 Todos los inmunocomplejos se visualizan a continuación, después de teñir el gel.

Se puede utilizar cualquier reactivo convencional que permita la tinción del gel (negro de amido, violeta ácido, rojo coomassie).

- 15 La aparición de una banda específica en la región gamma es, por lo tanto, indicativa de la presencia de una proteína o componente monoclonal correspondiente a un tipo de inmunoglobulina particular (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL, IgKlibre, IgLlibre) y la presencia de una banda adicional fuera de la zona gamma, preferentemente entre la zona alfa-1 y la de albúmina, es indicativa del complejo formado entre la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma y el anticuerpo modificado.

- 20 Para un inmunocomplejo dado, se ha descubierto que la señal de la banda es proporcional a la concentración de la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana o fragmento de la misma presente en la muestra y se visualiza si la concentración de la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) o del fragmento de la misma es mayor a 0,1 g/l, que es el límite de detección del método de IF Hydragel.

25 Ejemplos

EJEMPLO 1

- 30 Inmunodesplazamiento en gel e inmunofijación de una muestra de suero normal enriquecida con Adalimumab (Creative Biolabs). El adalimumab es un anticuerpo monoclonal (IgGK) humano implicado en trastornos autoinmunitarios como la artritis, reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn.

35 Procedimiento para la modificación del anticuerpo monoclonal humano anti-Adalimumab (un anticuerpo anti-idiotipo de AbD Serotec).

Proporción de 200 µl de anticuerpo monoclonal humano anti-Adalimumab de AbD Serotec (0,5 g/l en solución de PBS)

Se preparó una solución de anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico 0,05 M en dioxolano.

- 40 Los 200 µl de solución de anticuerpo monoclonal anti-Adalimumab se mezclaron con 4,5 µl de hidróxido de sodio 1 N y 24 µl de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

- 45 La solución dializada de anti-Adalimumab modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel de Adalimumab contenido en una muestra de suero.

Inmunodesplazamiento en gel de una muestra que contiene adalimumab seguido de inmunofijación

- 50 El inmunodesplazamiento en gel de la muestra que contenía Adalimumab seguido de inmunofijación se llevó a cabo en el sistema de electroforesis Hydrasys® utilizando el programa de inmunofijación y el kit de IF Hydragel 4 (posibilidad de 4 muestras por gel).

- 55 Un aplicador poroso de membrana cargado con 2 muestras (Figura 2, resultado de IF 1: muestra de suero normal; y Figura 2, resultado de IF 2: suero normal enriquecido con Adalimumab 0, 25 g/l), se colocó en la posición 3 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 60 Se colocó otro peine con membrana porosa cargado en todos los pocillos con la misma muestra de suero enriquecida con Adalimumab 0,25 g/l en la posición 9 del soporte de aplicadores.

- 65 Un tercer peine cargado con anti Adalimumab modificado humano en los pocillos 3 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 2), 6 (alineado con el carril K de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 2), 10 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 2), 13 (alineado con el carril K de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 2) se colocó en la posición 8 del soporte de aplicadores, para desplazar al Adalimumab en los carriles G y Kappa en la fila superior (resultado 3 y 4 de la Figura 2)

A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

- 5 Después de la aplicación de las muestras y del anti Adalimumab modificado sobre el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

10 Durante la migración, el anti Adalimumab modificado se une a y desplaza específicamente las moléculas de Adalimumab contenidas en los carriles G y Kappa de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores.

15 Cada carril del gel se incubó a continuación con un anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas.

El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

La Figura 2, resultado de IF 1, es el resultado de una muestra de suero normal.

- 20 La Figura 2, resultado de IF 2, es el resultado de la IFE de una muestra normal enriquecida con adalimumab, en que la banda correspondiente es perceptible en los carriles ELP, G y Kappa.

25 La Figura 2, resultados de IF 3 y 4 son resultados de la IFE obtenidos con la muestra de suero normal enriquecida, después del inmunodesplazamiento específico de adalimumab en el gel en los carriles G y kappa utilizando anti adalimumab modificado; mientras que las bandas que aparecen entre las zonas alfa 1 y alfa 2 en los carriles G y Kappa (resultados de IF 3 y 4), son indicativas del complejo inmunitario formado entre Adalimumab y el anti Adalimumab modificado durante la etapa de migración.

30 EJEMPLO 2

Inmunodesplazamiento en gel e inmunofijación de una muestra de suero normal enriquecida con Trastuzumab (Creative Biolabs). Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en el tratamiento del cáncer de mama.

- 35 Procedimiento para la modificación del anticuerpo monoclonal humano anti-Trastuzumab (un anticuerpo anti-idiotipo de AbD Serotec).

Proporción de 200 µl de anticuerpo monoclonal humano anti Trastuzumab de AbD Serotec (0,5 g/l en solución de PBS)

- 40 Se preparó una solución de anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico 0,05 M en dioxolano

Los 200 µl de solución de anticuerpo monoclonal anti Trastuzumab se mezclaron con 4,5 µl de hidróxido de sodio 1 N y 24 µl de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

- 45 El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

La solución dializada de anti Trastuzumab modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel de Trastuzumab contenido en una muestra de suero.

- 50 Inmunodesplazamiento en gel de una muestra que contiene Trastuzumab seguido de inmunofijación

55 El inmunodesplazamiento en gel de Trastuzumab seguido de inmunofijación se llevó a cabo en el sistema de electroforesis Hydrasys® utilizando el programa de inmunofijación y el kit de IF Hydragel 4 (posibilidad de 4 muestras por gel).

Un aplicador poroso de membrana cargado con 2 muestras (Figura 3, resultado de IF 1: muestra de suero normal; y Figura 3, resultado de IF 2: suero normal enriquecido con Trastuzumab 1 g/l), se colocó en la posición 3 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 60 Se colocó otro peine con membrana porosa cargado en todos los pocillos con la misma muestra de suero enriquecida con Adalimumab 1 g/l en la posición 9 del soporte de aplicadores.

Un tercer peine cargado con anti trastuzumab modificado humano en los pocillos

- 65 3 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 3),

6 (alineado con el carril K de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 3),

10 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 3),

13 (alineado con el carril K de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 3),

se colocó en la posición 8 del soporte de aplicadores, para desplazar al Trastuzumab en los carriles G y Kappa en la fila superior (resultado 3 y 4 de la Figura 3).

A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

Después de la aplicación de las muestras y del anti Trastuzumab modificado en el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

Durante la migración, el anti Trastuzumab modificado se une a y desplaza específicamente las moléculas de Trastuzumab contenidas en los carriles G y Kappa de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores.

Cada carril del gel se incubó a continuación con un antisero específico anti humano (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas. Sin embargo, se puede utilizar cualquier tipo de aplicador.

El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

La Figura 3, resultado de IF 1, es el resultado de una muestra de suero normal.

La Figura 3, resultado de IF 2 es el resultado de la IFE de una muestra normal enriquecida con Trastuzumab, en que la banda correspondiente es perceptible en los carriles ELP, G y Kappa.

La Figura 3, resultados de IF 3 y 4 son resultados de la IFE obtenidos con la muestra de suero normal enriquecida, después del inmunodesplazamiento específico de Trastuzumab en el gel en los carriles G y kappa utilizando anti Trastuzumab modificado; mientras que las bandas que aparecen entre las zonas alfa 1 y alfa 2 en los carriles G y Kappa (resultados de IF 3 y 4), son indicativas del complejo inmunitario formado entre Trastuzumab y el anti Trastuzumab modificado durante la etapa de migración.

La Figura 3 muestra los resultados del inmunodesplazamiento en gel de Trastuzumab utilizando anti Trastuzumab humano modificado (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico) seguido de inmunofijación.

Trastuzumab (Creative Biolabs) es un anticuerpo monoclonal humanizado utilizado en el tratamiento del cáncer de mama. Dado que el Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, aparece en la IFE como una banda monoclonal en los carriles G y K, y podría señalarse erróneamente una como proteína monoclonal endógena:

La Figura 3, resultado de IF 1 [muestra normal] y la Figura 3, resultado de IF 2 [muestra normal enriquecida con Trastuzumab 0,25 g/l, en que se puede observar una banda en los carriles G y K.

La Figura 3, resultado de IF 3 y la Figura 3, resultado de IF 4, ilustran el inmunodesplazamiento en gel de Trastuzumab en los carriles G y K, utilizando anticuerpo monoclonal modificado anti trastuzumab, en que la muestra es una muestra normal previamente enriquecida con Trastuzumab 0,25 g/l. La desaparición de la banda en la zona gamma de los carriles G y K es perceptible y se puede distinguir claramente el complejo de Trastuzumab/anti trastuzumab modificado que aparece en los mismos carriles (G y K), entre las zonas alfa1 y alfa 2.

De la misma manera, Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado (IgGK) implicado en el cáncer, degeneración macular senil, también se inmunodisplazó utilizando un anti Bevacizumab monoclonal modificado (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico) y la zona gamma estaba totalmente libre de esta interferencia.

La presente invención podría entonces utilizarse junto con la inmunofijación para resolver todas las interferencias relacionadas con anticuerpos monoclonales terapéuticos, siempre que uno tenga el anticuerpo monoclonal contra dicho fármaco.

EJEMPLO 3

Inmunodesplazamiento en gel e inmunofijación de una muestra de suero normal enriquecida con Bevacizumab (Creative Biolabs). Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgGK) implicado en el cáncer,

degeneración macular senil.

El procedimiento para la modificación del anticuerpo monoclonal humano anti-Bevacizumab (un anticuerpo anti-idiotipo de Creative Biolabs) fue el mismo que para los anti-idiotipos anteriores de los Ejemplos 1 y 2.

El inmunodesplazamiento en gel de Bevacizumab seguido de inmunofijación también se llevó a cabo de la misma manera que con los fármacos de anticuerpo monoclonal interferentes anteriores.

Resultados no mostrados, indicaron la presencia de Bevacizumab en el carril ELP y su desplazamiento en los carriles G y K cuando se aplicó monoclonal anti Bevacizumab humano en los mismos carriles.

EJEMPLO 4

Caso de pacientes con gammapatía oligoclonal caracterizada por: Múltiples bandas débiles de uno o más tipos de cadenas pesadas y por uno o dos tipos de cadenas ligeras, con alto fondo policlonal.

Ejemplo 4A

Inmunodesplazamiento en gel de la clase IgK e IgL en el carril G, utilizando anti IgK modificado y anti IgL modificado (modificados con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico), seguido de inmunofijación, muy útil para la interpretación en el caso de gammapatía oligoclonal con bandas débiles en alto fondo policlonal.

Procedimiento para la modificación de anticuerpos policlonales específicos para IgKappa e IgLambda humanas (de Dako Dinamarca) con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico.

Suministro de 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Kappa humana o 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda humana (10 g/l cada uno, en tampón fosfato pH 7,4)

Se preparó una solución de anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico 100 M en dioxolano

Los 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda o Ig Kappa humanas se mezclaron con 300 µl de hidróxido de sodio 5 N y 2 ml de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

La solución dializada de policlonal anti Ig Kappa humana modificado o anti Ig Lambda humana modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel de Ig Kappa o Ig Lambda.

Inmunodesplazamiento en gel de IgK e IgL seguido de inmunofijación en el caso de gammapatía oligoclonal (Muestra C)

Se colocaron dos peines con membrana porosa cargados con una muestra de oligoclonal diluido conocido (muestra C) en todos los pocillos, en las posiciones 3 y 9 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

Un peine adicional con membrana porosa cargado con anticuerpo modificado específico para Ig Kappa y anticuerpo modificado específico para Ig Lambda, respectivamente en el carril 3 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 4A) y en el carril 10 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 4A) se colocó en la posición 8 del mismo soporte de aplicadores.

A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

Después de la aplicación de las muestras y de los antisueros modificados en el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

Durante la migración, los anti Ig Kappa y anti Ig Lambda modificados se unen y desplazan específicamente a la Ig kappa y la Ig Lambda en el carril G de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores (resultado de IF 3 y 4, respectivamente).

Cada carril del gel se incubó a continuación con un anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas.

El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

La Figura 4A, resultado de IF 1 y la Figura 4A, resultado de IF 2 en la fila inferior del gel son los resultados repetidos

de la muestra C sin el procedimiento de inmunodesplazamiento.

La Figura 4A, resultado de IF 3 es el inmunodesplazamiento de IgK de la muestra C utilizando anti IgK modificado en el carril G (componente IgK de G), en que ahora se puede percibir una banda en el carril G (banda C1) que estaba oculta bajo el fondo policlonal. Esta banda es visible en los carriles G y L, entonces el analista diría GL.

La Figura 4A, resultado de IF 4 es el inmunodesplazamiento de IgL de la muestra C utilizando anti IgL modificado en el carril G (IgL de G), en que se puede apreciar que la banda designada como banda C1 (en el resultado de IF 3) ha desaparecido del carril G (IgL de G), lo que es la confirmación de que la banda C1 es GL.

En todos los casos, la banda que aparece en la zona alfa 1 en el carril G es indicativa del inmunocomplejo formado entre anti Ig kappa modificado e Ig Kappa o anti Ig Lambda modificado e Ig Lambda, durante la etapa de migración.

Ejemplo 4B

Inmunodesplazamiento en gel de la clase IgK e IgL en el carril G, utilizando anti IgK modificado y anti IgL modificado (modificados con dianhídrido piromelítico (anhídrido 1,2,4,5-benceno tetracarboxílico)), seguido de inmunofijación, muy útil para la interpretación en el caso de gammopatía oligoclonal con bandas débiles en alto fondo policlonal.

Procedimiento para la modificación de anticuerpos policlonales específicos para IgKappa e IgLambda humanas (de Dako Dinamarca) utilizando un dianhídrido, dianhídrido piromelítico (anhídrido 1,2,4,5-benceno tetracarboxílico).

Suministro de 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Kappa humana o 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda humana (10 g/l cada uno, en tampón fosfato pH 7,4)

Se preparó una solución de dianhídrido piromelítico 114 mM en dioxolano

Los 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda o Ig Kappa humanas se mezclaron con 300 µl de hidróxido de sodio 5 N y 2 ml de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

La solución dializada de policlonal anti Ig Kappa humana modificado o anti Ig Lambda humana modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel de Ig Kappa o Ig Lambda.

Inmunodesplazamiento en gel de IgK e IgL seguido de inmunofijación en el caso de gammopatía oligoclonal (Muestra D)

Se colocaron dos peines con membrana porosa cargados con una muestra de oligoclonal diluido conocido (muestra D) en todos los pocillos, en las posiciones 3 y 9 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

Un peine adicional con membrana porosa cargado con anticuerpo modificado específico para Ig Kappa y anticuerpo modificado específico para Ig Lambda, respectivamente en el carril 3 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 3 del gel, Figura 4B) y en el carril 10 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 4B) se colocó en la posición 8 del mismo soporte de aplicadores.

A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

Después de la aplicación de las muestras y de los antisueros modificados en el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

Durante la migración, los anti Ig Kappa y anti Ig Lambda modificados se unen y desplazan específicamente a la Ig kappa y la Ig Lambda en el carril G de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores (resultado de IF 3 y 4, respectivamente, en la Figura 4B).

Cada carril del gel se incubó a continuación con un anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas.

El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

La Figura 4B, resultado de IF 1 y la Figura 4B, resultado de IF 2 en la fila inferior del gel son los resultados repetidos de la muestra D sin el procedimiento de inmunodesplazamiento en gel.

La Figura 4B, resultado de IF 3, muestra inmunodesplazamiento de IgK en el carril G (componente IgK de G) utilizando

anti IgK modificado, en que ahora se puede percibir una banda en el carril G (banda D 1) que estaba oculta bajo el fondo policlonal. Esta banda ahora es visible en los carriles G y L, y entonces el analista diría GL.

La Figura 4B, resultado de IF 4 es el inmunodesplazamiento de IgL de la muestra D utilizando anti IgL modificado en el carril G (IgL de G), en que se puede apreciar que la banda designada como banda D1 (en el resultado de IF 3) ha desaparecido del carril G (IgL de G), lo que es la confirmación de que la banda D1 es GL.

En todos los casos, la banda que aparece en la zona alfa 1 en el carril G es indicativa del inmunocomplejo formado entre anti Ig kappa modificado e Ig Kappa o anti Ig Lambda modificado e Ig Lambda, durante la etapa de migración.

Ejemplos 4A y 4B - Interpretación

Otro uso del inmunodesplazamiento en gel junto con inmunofijación es ayudar al analista a resolver determinadas limitaciones de la IFE, más particularmente cuando la IFE da resultados dudosos: caso de pacientes con gammopatía oligoclonal caracterizada por: Múltiples bandas débiles de uno o más tipos de cadenas pesadas y por uno o dos tipos de cadenas ligeras, con alto fondo policlonal.

En esta circunstancia a menudo es difícil para el analista proporcionar información precisa al médico.

Dado que la tinción del fondo policlonal en cada carril de la cadena pesada (G, A, M) es la suma de la de sus correspondientes carriles de la cadena ligera (G = GK + G; A = AK + AL; M = MK + ML), se pueden utilizar antisueros policlonales anti cadena ligera modificados (de IgK modificado o de IgL modificado) como se describe anteriormente (en el caso de fármacos terapéuticos), para desplazar específicamente los componentes IgK o IgL del carril de la cadena pesada (G o A, o M).

Por ejemplo, si múltiples bandas débiles están subyacentes en un fondo policlonal más oscuro de los carriles G, K y L, se pueden modificar antisueros policlonales anti cadena ligera humana (IgK e IgL) con un anhídrido carboxílico o dianhídrido carboxílico para el inmunodesplazamiento de componentes IgL o componentes IgK del carril G, para aclarar los resultados en el carril G.

Después, a estos inmunodesplazamientos de IgK e IgL del carril G les sigue la inmunofijación utilizando antisueros anti humano no modificados, habitualmente utilizados para IFE (antisueros anti humano para IgG, IgA, IgM, IgK, IgL). En ese caso, el anti IgG anti-humano se incubaba con el gel en 3 carriles distintos de la muestra: el carril G; el carril IgL de G = GK (G con componentes de IgL desplazados utilizando anti IgL humana modificado); y el carril IgK de G = GL (G con componentes de IgK desplazados utilizando anti IgK humana modificado).

Entonces, mediante la comparación de los carriles G; IgL de G, IgK de G con los carriles K y L, se pueden reconocer fácilmente las bandas pertenecientes a G y K, y las bandas pertenecientes a G y L, ayudando así al analista en la identificación y clasificación de bandas.

La Figura 4A muestra el inmunodesplazamiento en gel utilizando anti IgK modificado y anti IgL modificado (con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico) seguido de un procedimiento de inmunofijación para aclarar los resultados de IFE de la muestra C, caracterizados por múltiples bandas débiles en un fondo policlonal.

La Figura 4B es otro ejemplo de inmunodesplazamiento en gel seguido de IFE realizado en la muestra D, caracterizada por múltiples bandas débiles presentes en el fondo policlonal, en que se produjeron IgK modificada e IgL modificada utilizando dianhídrido piromelítico como reactivo químico.

EJEMPLO 5

Inmunodesplazamiento en gel seguido de inmunofijación para resolver casos de gammopatías de Ig A sin ninguna cadena ligera correspondiente: ¿Gammopatía de cadena pesada o no?

Inmunodesplazamiento en gel de la clase IgK e IgL en el carril A, utilizando anti IgK modificado y anti IgL modificado (modificados con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico), seguido de inmunofijación, muy útil para la identificación de la cadena ligera correspondiente en IgA.

Procedimiento para la modificación de anticuerpos policlonales específicos para IgKappa e IgLambda humanas (de Dako Dinamarca) con anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico.

Suministro de 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Kappa humana o 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda humana (10 g/l cada uno en tampón fosfato pH 7,4)

Se preparó una solución de anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico 100 M en dioxolano

Los 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda o Ig Kappa humanas se mezclaron con 300 µl de

hidróxido de sodio 5 N y 2 ml de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

- 5 La solución dializada de policlonal anti Ig Kappa humana modificado o anti Ig Lambda humana modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel de Ig Kappa o Ig Lambda.

Inmunodesplazamiento en gel de IgK e IgL en el carril A seguido de inmunofijación en el caso de gammapatías de IgA sin ninguna cadena ligera correspondiente.

- 10 Se colocó un peine con membrana porosa cargado con la muestra diluida E en todos los pocillos, en la posición 3 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 15 Se colocó un segundo peine cargado de los pocillos 9 a 14 con la muestra E diluida en la posición 9 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 20 Un primer peine adicional con membrana porosa cargado con anticuerpo anti Ig Kappa modificado en el pocillo 11 (alineado con el carril A en el resultado de IF 2, Figura 5) se colocó en la posición 2 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- Un segundo peine adicional con membrana porosa cargado con anticuerpo anti Ig Lambda modificado en el pocillo 11 (alineado con el carril A en el resultado de IF 4, Figura 5) se colocó en la posición 8 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 25 A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

- 30 Después de la aplicación de las muestras y de los antisueros modificados en el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

- 35 Durante la migración, el anti Ig Kappa modificado (aplicado en la posición 2 del soporte de aplicadores) se une y desplaza específicamente la Ig kappa en el carril A de la muestra depositada en la posición 3 (resultado de IF 2, figura 5); y el anti Ig Lambda modificado (aplicado en la posición 8 del soporte de aplicadores) se une y desplaza específicamente la Ig Lambda en el carril A de la muestra depositada en la posición 9 (resultado de IF 4, figura 5)

- Cada carril del gel se incubó a continuación con un anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas.

- 40 El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

La Figura 5, resultado de IF 1, muestra los resultados de IFE de la muestra E, que presentaron una banda en el carril A sin la cadena ligera correspondiente (K o L).

- 45 La Figura 5, resultado de IF 2, muestra otros resultados de IFE de la muestra E después del inmunodesplazamiento en gel de IgK en el carril A, utilizando anti IgK modificado (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico), en que no hay reacción entre la banda en el carril A y el anti IgK modificado.

- 50 La Figura 5, resultado de IF 4, muestra otros resultados de IFE de la muestra E después del inmunodesplazamiento en gel de IgL en el carril A, utilizando anti IgL modificado (con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico), en que la banda del carril A se desplaza con anti IgL modificado. La reacción del anti IgL modificado con esta banda en el carril A significa que la cadena ligera correspondiente es IgL, entonces la muestra E se caracteriza como AL.

- 55 Otro caso de limitación de la IF en que puede ser útil el inmunodesplazamiento en gel de una inmunoglobulina diana o un fragmento de la misma seguido de inmunofijación es el caso en que hay una banda en el carril A que no tenga una cadena ligera (K o L) asociada.

- 60 Aparte del caso de la enfermedad de la cadena pesada de IgA, que es muy rara, esta situación a menudo se produce debido a la estructura cuaternaria de la molécula de IgA, en que los epítomos para las cadenas ligeras pueden ser secuestrados por el plegamiento de la molécula en el gel.

Entonces, los inventores pensaron que el acceso a los epítomos de la cadena ligera en la molécula de inmunoglobulina IgA sería más fácil durante la electroforesis, mientras las moléculas de IgA se mueven en el gel.

- 65 En estos casos, el procedimiento de inmunodesplazamiento en gel de IgK e IgL de IgA utilizando antisuero modificado anti cadena ligera (IgL e IgK) seguido de inmunofijación puede ser muy útil para identificar la cadena ligera

correspondiente.

EJEMPLO 6

- 5 El inmunodesplazamiento en gel de IgG en el carril L seguido de inmunofijación, muy útil en el caso de la gammopatía biclonal GK + GL, en que las dos bandas idénticas de cadena pesada y las dos bandas distintas de las cadenas ligeras se ubican en la misma posición en el patrón de electroforesis, y en que se sospecha que una de las cadenas ligeras (en el carril L) es una cadena ligera libre.

10 Procedimiento para modificar anticuerpos policlonales específicos para IgG e IgLambda humanas (de Dako Dinamarca) con anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico.

Suministro de 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig G humana o 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda humana (10 g/l cada uno en tampón fosfato pH 7,4)

- 15 Se preparó una solución de anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico 100 M en dioxolano.

Los 10 ml de anticuerpo policlonal específico para Ig Lambda o Ig G humanas se mezclaron con 300 µl de hidróxido de sodio 5 N y 2 ml de solución de anhídrido durante 15 min a temperatura ambiente.

- 20 El producto de reacción se dializó luego contra tampón fosfato, 100 mM pH 7,4 durante una noche.

La solución dializada de policlonal anti Ig G humana modificado y anti Ig Lambda humana modificado estaba entonces lista para el uso para el inmunodesplazamiento en gel en el carril G y el carril L.

25 Inmunodesplazamiento en gel de IgG e IgL respectivamente en los carriles G y lambda seguido de inmunofijación en el caso de gammopatía biclonal con comigración de bandas (Muestra F)

- 30 Se colocaron dos peines con membrana porosa cargados con una muestra F diluida conocida en todos los pocillos, en las posiciones 3 y 9 del soporte de aplicadores adaptado al dispositivo Hydrasys®.

- 35 Un peine adicional con membrana porosa cargado con anticuerpo específico para IgG modificado en el pocillo 7 (alineado con el carril L de la fila superior del resultado de IF 3, Figura 6) y anticuerpo específico para Ig Lambda modificado en el carril 10 (alineado con el carril G de la fila superior del resultado de IF 4 del gel, Figura 6) se colocó en la posición 8 del mismo soporte de aplicadores.

A continuación, se inició el programa de inmunofijación de Hydrasys® para permitir que todos estos peines estuvieran simultáneamente en contacto con el gel de inmunofijación de agarosa dedicado a 4 muestras (4IF) durante 1 minuto.

- 40 Después de la aplicación de las muestras y de los antisueros modificados en el gel, la migración comenzó automáticamente y se llevó a cabo en menos de 15 minutos a 20 W a 20 °C.

- 45 Durante la migración, el anti IgG modificado se une y desplaza específicamente a IgL en el carril L de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores (Figura 6, resultado de IF 3); mientras que el anti IgL modificado se une y desplaza específicamente a IgL en el carril G de las muestras depositadas en la posición 9 del soporte de aplicadores (Figura 6, resultado de IF 4).

- 50 Cada carril del gel se incubó a continuación con un anti humano específico (anticuerpos policlonales para clases y tipos de inmunoglobulina específicos (IgG, IgA, IgM, IgK, IgL) después del proceso de inmunofijación de Hydragel, mediante el uso de la Plantilla Dinámica o la Plantilla Convencional de Sebia específicas.

El gel se tiñó automáticamente con violeta ácido y se decoloró antes del secado de la etapa final.

- 55 La Figura 6, resultado 1 y resultado 2 de IF, muestra resultados de IFE repetidos de la muestra F, que presentó una banda ligera en el carril L (banda F1) que comigró con la banda en el carril G y el carril K. En este caso, el analista se preguntará si esta banda (F1) es GL o una cadena de ligera libre lambda.

- 60 En la Figura 6, el resultado de IF 3 muestra otro resultado de IFE con la muestra F, después del inmunodesplazamiento en gel de la molécula de IgL en el carril L utilizando policlonal anti IgG modificado. El desplazamiento de la banda F1 en el carril L utilizando policlonal anti IgG modificado es indicativo de la presencia de GL en esta muestra. Entonces, la muestra F se caracteriza como GK y GL.

- 65 En la Figura 6, el resultado de IF 4 muestra otro resultado de IFE con la muestra F, después del inmunodesplazamiento en gel de la molécula de IgL en el carril G utilizando policlonal anti IgL modificado.

El desplazamiento de la banda F1 en el carril L utilizando policlonal anti IgG modificado es indicativo de la presencia

de GL en esta muestra. Entonces, la muestra G se caracteriza como GK y GL.

Otro caso de limitación de la IFE en que puede ser útil el inmunodesplazamiento en gel de una inmunoglobulina diana o un fragmento de la misma seguido de inmunofijación es el caso de una gamapatía biclonal, caracterizada por la presencia de dos bandas idénticas de cadena pesada y dos bandas distintas de cadenas ligeras ubicadas en la misma posición en el patrón de electroforesis, y en que se puede sospechar que una de las cadenas ligeras es una cadena ligera libre.

En ese caso, el inmunodesplazamiento en gel de presuntas bandas de cadenas ligeras (K o L) utilizando antisuero anti cadenas pesadas modificado (con anhídrido o dianhídrido carboxílico), seguido de inmunofijación, puede ser útil para eliminar la duda. De hecho, si la banda de la que se sospecha es una cadena ligera libre, no puede reaccionar con el antisuero anti cadenas pesadas modificado. Si hay una reacción entre dicha banda y uno de los antisueros modificados anti cadenas pesadas (IgG, IgA, IgM), entonces la banda en cuestión está unida a esta cadena pesada, y no es una cadena ligera libre.

REFERENCIAS

(1) Manual de instrucciones Sebia Ref. 1201 - versión 2.2x 2015/03

(2) Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; 23:1073-8.

(3) Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Medicine* 2013;11:88.

(4) Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:309-35.

(5) Reichert JM. Antibodies to watch in 2010. *MAbs* 2010; 2:84-100.

(6) Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 2009; 100:1566-72.

(7) Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:343-57.

(8) Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:711-5.

(9) Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 59:389-96.

(10) Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, *et al.* International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20:1467-1473.

(11) McCudden CR, Voorhees PM, Hainsworth SA, Whinna HC, Chapman JF, Hammett-Stabler CA, *et al.* Interference of monoclonal antibody therapies with serum protein electrophoresis tests. *Clin Chem* 2010; 56:1897-9.

(12) Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:309-35.

(13) Janneke Ruinemans-Koerts, Cyriel Verkroost, Yvonne Schmidt-Hieltjes, Cees Wiegers, Joyce Curvers, Marc Thelen y Matthijs van Luin. Interference of therapeutic monoclonal immunoglobulins in the investigation of M-proteins *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(11): 235-237.

(14) Documento US 5. 567.282

(15) Documento US 8. 609.435

(16) Documento US 8. 859.211

(17) Alper C A y Johnson A M *Vox. Sang.* 17: 445 (1969),

(18) Cawley L P *et al.*, *Clin. Chem.* 22: 1262 (1976),

(19) Ritchie R F y Smith R *Clin. Chem.* 22: 497, 1735, 1982 (1976).

REIVINDICACIONES

1. Un método para el análisis por electroforesis con inmunofijación (IFE) de una muestra biológica que comprende una o más proteínas, en particular para el análisis por IFE de una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) que pertenece a una clase seleccionada entre IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, o un fragmento de la misma que puede estar presente en dicha muestra biológica, que comprende las etapas de:
 - a. depositar al menos una parte alícuota de la muestra biológica en un área de depósito de una placa de gel electroforética, estando dicha área de depósito de muestras en una posición de la placa de gel que permita la migración electroforética del contenido proteico de la muestra depositada hacia el lado anódico de la placa de gel, y
 - b. depositar al menos un anticuerpo que está modificado para portar cargas eléctricas negativas adicionales, teniendo dicho anticuerpo modificado especificidad antigénica para una inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica y teniendo la capacidad de formar un inmunocomplejo con dicha inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma, en donde el al menos un anticuerpo modificado se deposita en un área de depósito de la placa de gel electroforética que coincide con el área de depósito de muestras de la etapa a. o está separada del área de depósito de la etapa a., estando en el mismo carril pero en una posición que es más catódica con respecto a la posición del área de depósito de muestras de la etapa a., en particular entre la extremidad catódica de la placa de gel y el área de depósito de muestras de la etapa a., en donde las etapas a. y b. pueden realizarse en cualquier orden o al mismo tiempo cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras están separadas o, cuando el área de depósito de anticuerpos modificados y el área de depósito de muestras coinciden, el depósito de un anticuerpo de acuerdo con la etapa b. se lleva a cabo antes o después del depósito de una parte alícuota de la muestra biológica de acuerdo con la etapa a., y
 - c. someter a electroforesis la placa de gel para obtener un perfil de separación de proteínas de la muestra biológica depositada en la etapa a., desplazando específicamente el al menos un anticuerpo modificado depositado en la etapa b. la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma que puede estar presente en la muestra biológica fuera de la zona gamma y/o el perfil de proteínas durante la migración electroforética, y
 - d. aplicar al menos un anticuerpo de captura en la zona (o zonas) apropiada de la placa de gel sometida a electroforesis, en donde dicho anticuerpo de captura tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular, o tiene especificidad para la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma, o tiene especificidad para un isotipo de anticuerpo particular y/o la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma como se encuentra en un inmunocomplejo entre la inmunoglobulina diana o fragmento de la misma y el al menos un anticuerpo modificado, y permitir su reacción para hacer posible la formación de inmunocomplejos precipitados y/o detectables, y
 - e. opcionalmente, tefir los inmunocomplejos formados en la etapa c. y opcionalmente la etapa d.
2. El método de la reivindicación 1, en el que varias partes alícuota de la muestra biológica se depositan en carriles paralelos de la placa de gel en la etapa a., cargándose al menos un carril con al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b., opcionalmente, cargándose varios carriles con al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que al menos un carril en la placa de gel es un carril de referencia que no se somete a la etapa d., pero en su lugar se pone en contacto con una solución fijadora en lugar de con un anticuerpo (o anticuerpos) de captura, siendo las etapas a. a c., y opcionalmente la e, las mismas.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde seis partes alícuota de la muestra biológica se depositan en carriles paralelos de la placa de gel en la etapa a., incluyendo un carril de referencia y cinco carriles que se ponen en contacto respectivamente en la etapa d. con anticuerpos de captura específicos para IgG, IgA, IgM, IgK e IgL, cargándose al menos un carril con al menos un anticuerpo modificado de acuerdo con la etapa b.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente una etapa de comparación del perfil (o perfiles) electroforético obtenido realizando las etapas a. a d., y opcionalmente la e., con el perfil (o perfiles) electroforético obtenido en las mismas condiciones y con la misma muestra biológica, pero en ausencia de cualquier anticuerpo modificado como se define en la etapa b.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma se selecciona entre: un anticuerpo monoclonal terapéutico o un fragmento del mismo, una inmunoglobulina monoclonal endógena o un fragmento de la misma, un antisuero policlonal endógeno, y mezclas de los mismos.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es un anticuerpo monoclonal terapéutico seleccionado entre: Adalimumab, Trastuzumab, Ofatumumab, Siltuximab, Rituximab, Bevacizumab, Infiximab, Cetuximab, Efalizumab, Natalizumab, Panitumumab, Tolicizumab, Clenoliximab, Etaracizumab, Visilizumab, Elotuzumab, Nimotuzumab, Ramcirumab, Elotuzumab, Daratumumab, Mapatumumab,

Golimumab, Ustekinumab, un fragmento de los mismos, anticuerpos funcionalmente equivalentes de los mismos y mezclas de los mismos.

- 5 8. El método de la reivindicación 6, en el que la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma es una inmunoglobulina monoclonal o fragmento de la misma seleccionada entre: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, cadena kappa, cadena lambda, cadena kappa libre y cadena lambda libre, o un suero policlonal que tiene un isotipo seleccionado entre: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, cadena kappa, cadena lambda, cadena kappa libre y cadena lambda libre.
- 10 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo que se modifica es un anticuerpo monoclonal humano o animal, o un antisuero policlonal humano o animal, en particular un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para una inmunoglobulina que pertenece a una clase isotípica seleccionada entre: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, o específico para una inmunoglobulina que pertenece a un tipo isotípico seleccionado entre: kappa y lambda, o específico para una cadena ligera libre seleccionada entre: kappa libre y lambda libre.
- 15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la relación de la concentración del anticuerpo modificado específico para la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma con respecto a la concentración de la inmunoglobulina diana predeterminada o fragmento de la misma en la muestra analizada es de 0,1/1 a 20/1, preferentemente de 1/1 a 5/1.
- 20 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo modificado es un producto de reacción de un anticuerpo con un anhídrido de ácido carboxílico, en particular un anhídrido de ácido que es anhídrido 1,2,4-benzenotricarboxílico o un dianhídrido seleccionado entre: dianhídrido piromelítico (anhídrido 1,2,4,5 benceno tetracarboxílico), dianhídrido benzofenona-3,3',4,4'-tetracarboxílico, dianhídrido dietilentriaminopentaacético.
- 25 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el anticuerpo modificado se obtiene de acuerdo con las siguientes etapas:
 - Proporcionar una solución de anticuerpo, especialmente una cantidad apropiada de una solución de anticuerpo, en una concentración de 0,1 a 30 g/l, opcionalmente en un tampón apropiado, y
 - 30 - Añadir a dicha solución de anticuerpo un anhídrido de ácido carboxílico disuelto en un disolvente anhidro adecuado, en particular un disolvente anhidro seleccionado entre: dioxolano, dimetilformamida y dimetilsulfóxido, especialmente una cantidad apropiada de anhídrido de ácido carboxílico, teniendo dicho anhídrido de ácido carboxílico una concentración de 10 mM a 200 mM, en particular de 50 a 160 mM, y realizándose la adición a un pH de 7,5 a 9, y
 - 35 - Recuperar el anticuerpo modificado obtenido.
- 40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el área de depósito del al menos un anticuerpo modificado está a una distancia del área de depósito de muestras que es igual o menor que 5 milímetros, en particular de 2 a 3 milímetros, más particularmente a una distancia de 2 o 3 milímetros.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la muestra biológica se selecciona entre: una muestra de suero, orina y líquido cefalorraquídeo.
- 50 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende adicionalmente una etapa de análisis y/o de interpretación de los resultados de la IFE, y/o de llegar a conclusiones sobre el estado de salud del paciente, cuya muestra biológica se ha sometido al método.
16. Un método para la detección de una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) interferente o fragmento (o fragmentos) de la misma que se sospecha que está presente en la muestra biológica de un paciente, que comprende la etapa de realizar un método para el análisis por electroforesis con inmunofijación (IFE) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en una muestra extraída de dicho paciente, en donde la inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) diana predeterminada o fragmento (o fragmentos) de la misma que se tiene como objetivo en dicho método de IFE es (son) dicha inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) interferente sospechosa o fragmento (o fragmentos) de la misma.

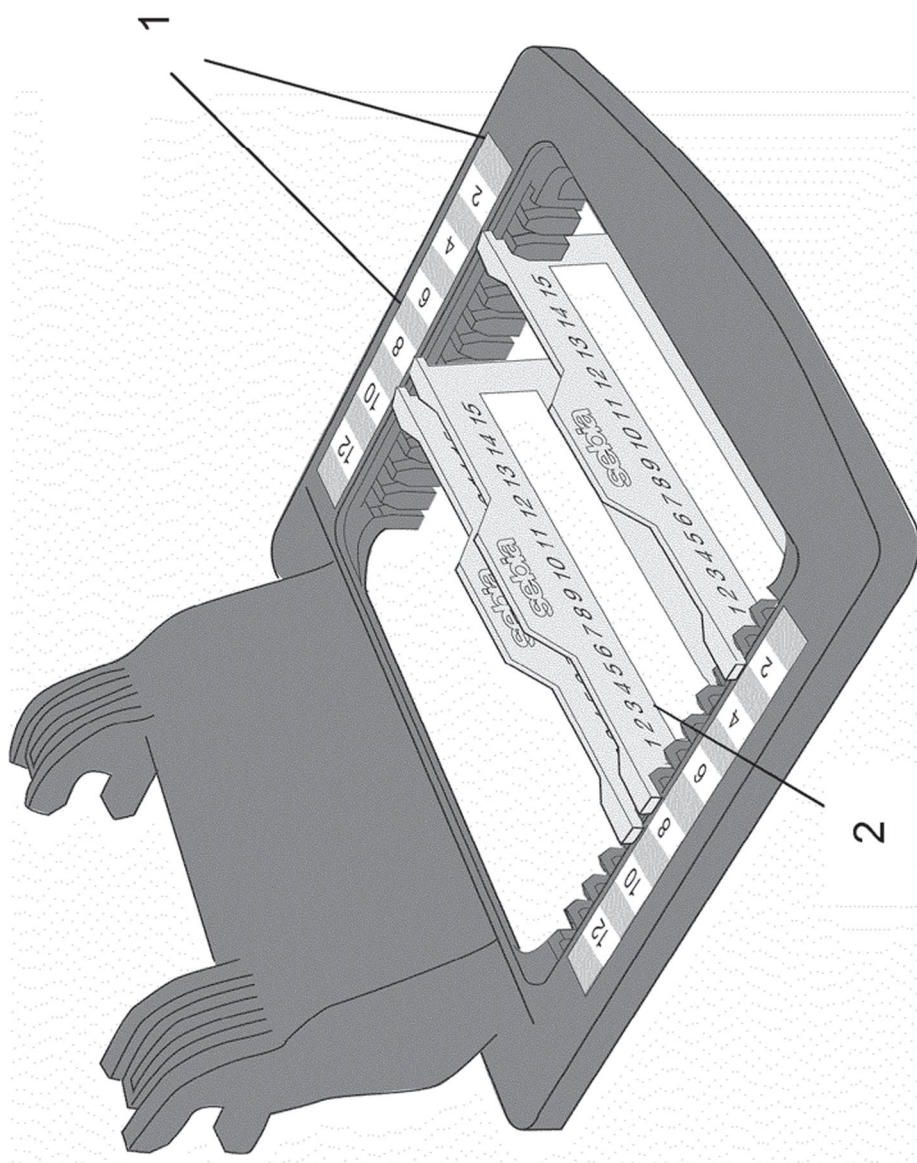


Fig. 1A

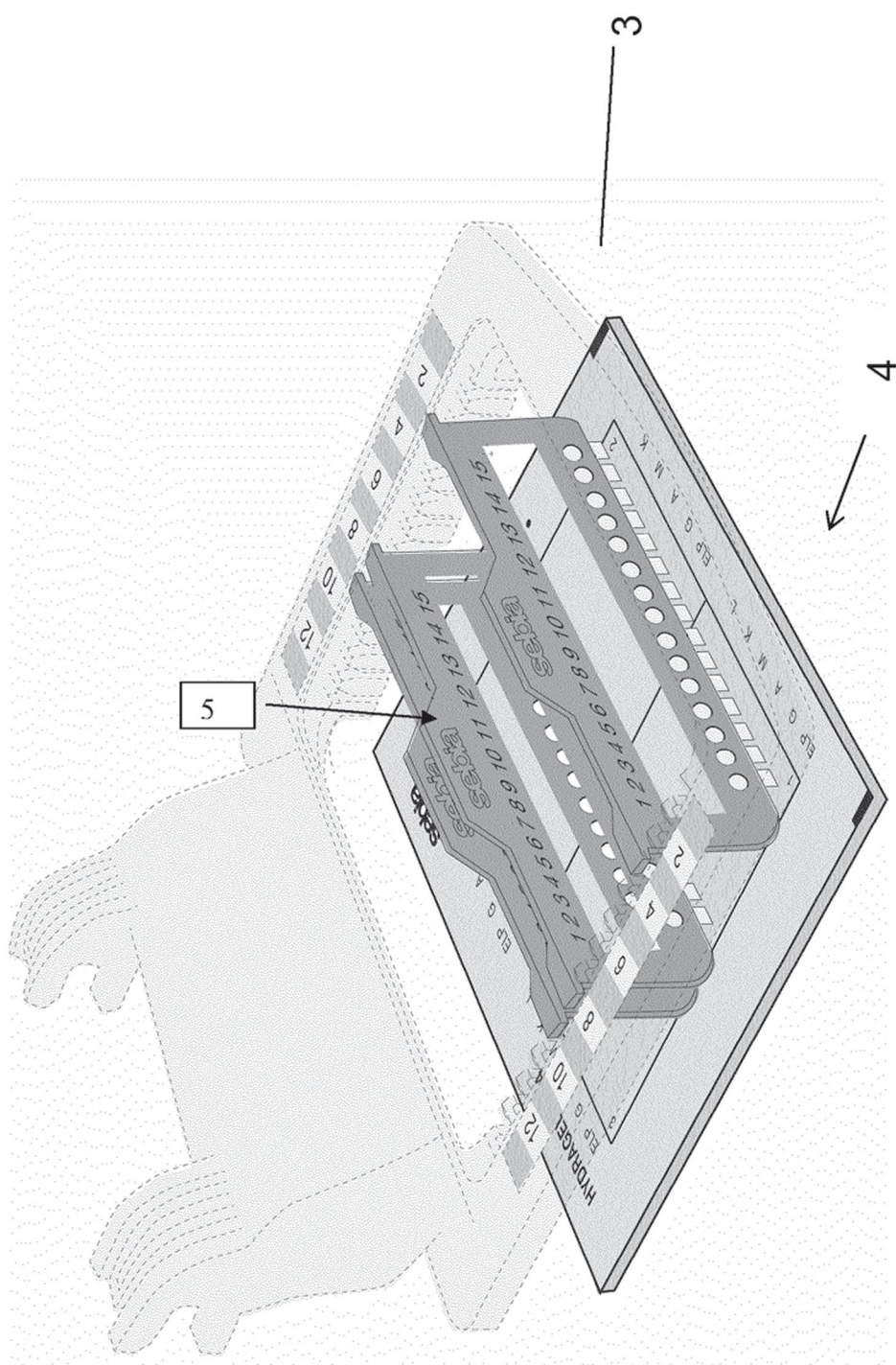


Fig. 1B

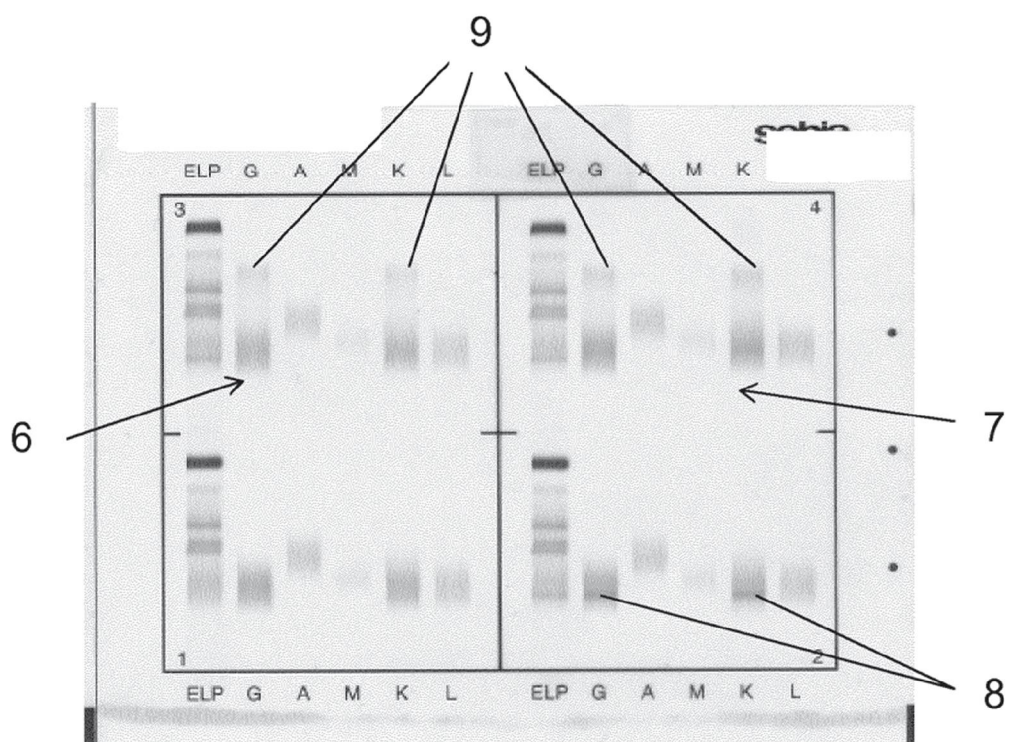


Fig. 2

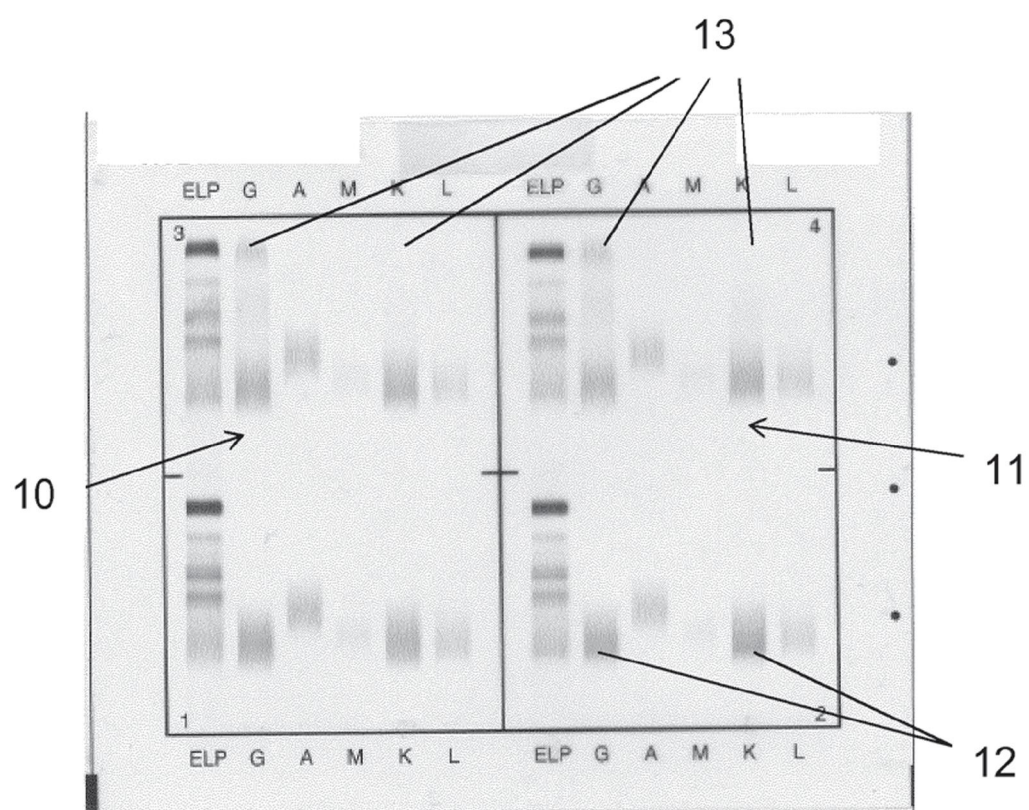


Fig. 3

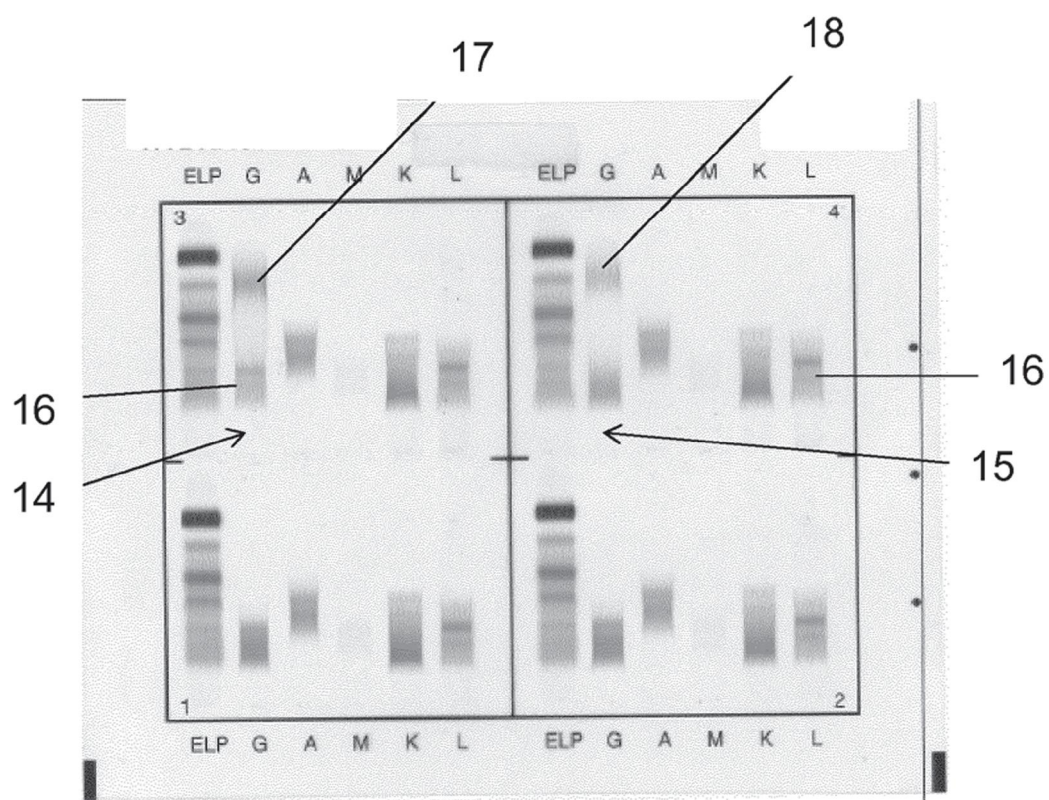


Fig. 4A

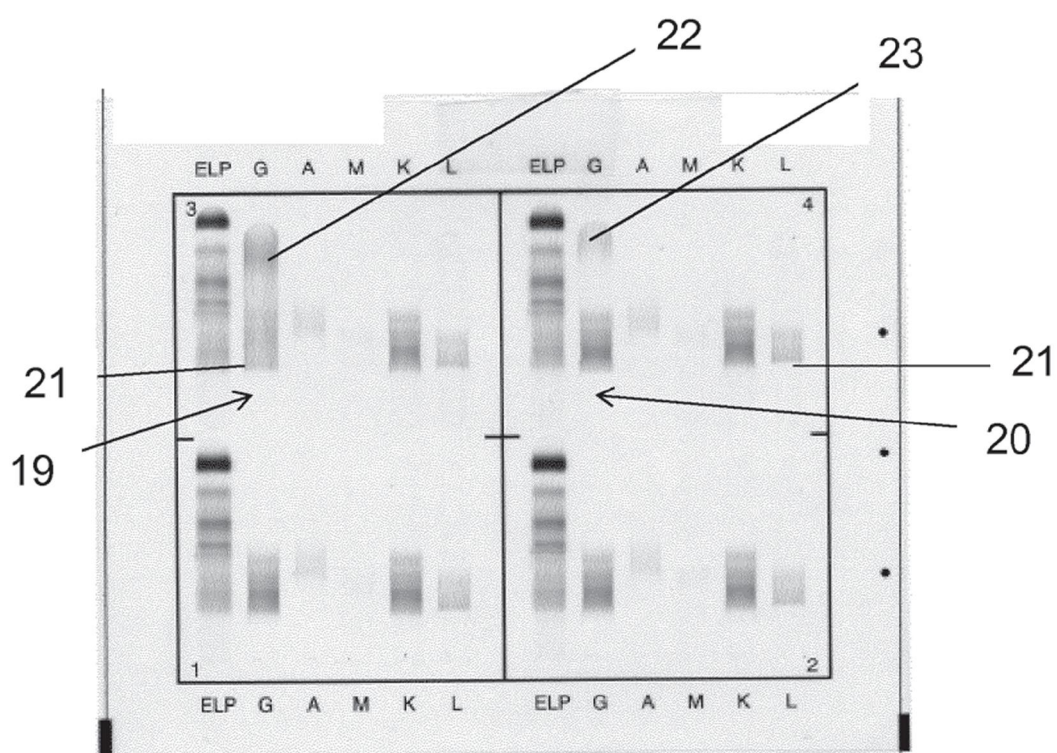


Fig. 4B

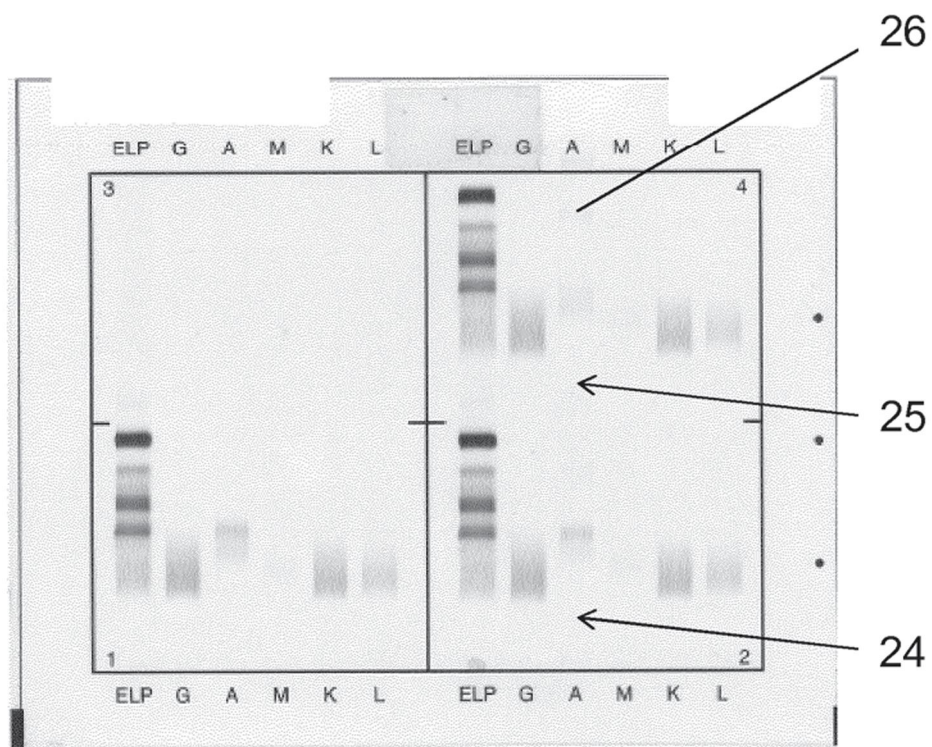


Fig. 5

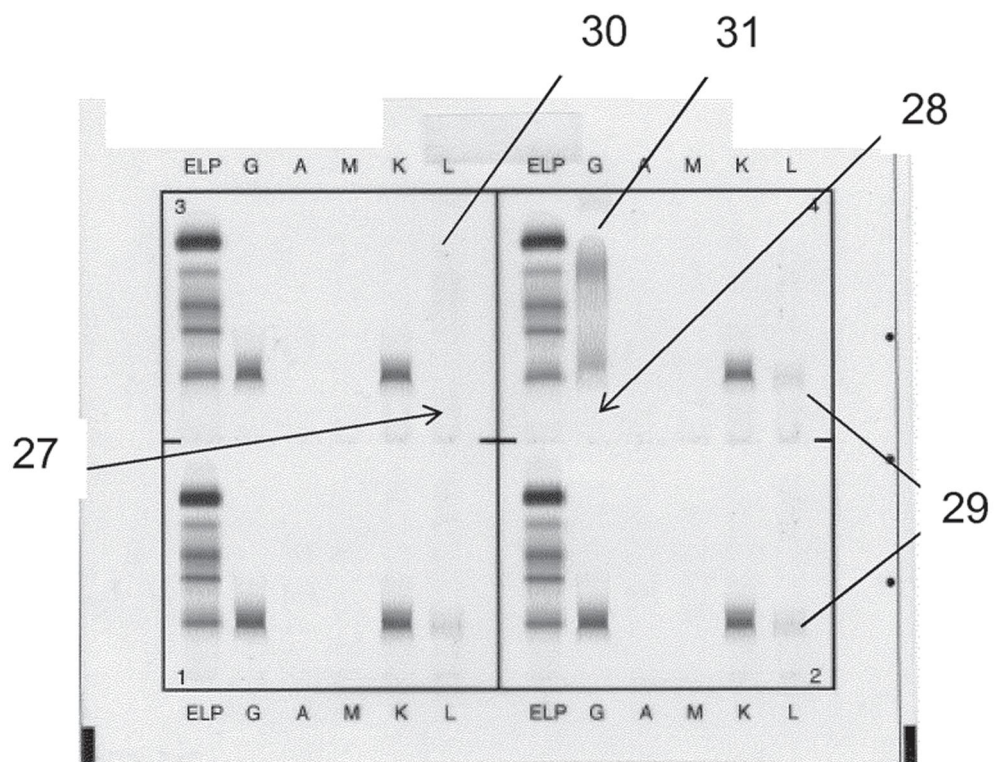


Fig. 6