



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 804**

51 Int. Cl.:

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 30/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03792041 .0**

96 Fecha de presentación : **22.08.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1540304**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Empobrecimiento de proteínas de plasma.**

30 Prioridad: **23.08.2002 AU 2002951240**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2009

73 Titular/es: **HealthLinx Limited**
576 Swan Street
Richmond, VIC 3121, AU

72 Inventor/es: **Rice, Gregory, E.;**
Baker, Mark, S. y
Quinn, Michael

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 322 804 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

Empobrecimiento de proteínas de plasma.

5 Esta invención se refiere a métodos de análisis y, en particular, se refiere a métodos para el fraccionamiento preliminar de muestras en las que está presente una baja abundancia de moléculas de interés, por ejemplo de proteínas, de polisacáridos o de ácidos grasos, junto con moléculas más abundantes de bajo interés o sin interés. En particular, la invención se refiere a métodos para el empobrecimiento de proteínas con elevada abundancia a partir de muestras biológicas empleándose un soporte de afinidad copulado con un anticuerpo de gallina IgY. El método es aplicable, de
10 manera particular, a muestras de fluidos biológicos humanos tales como el suero, el plasma, las lágrimas, la saliva, el fluido cerebroespinal, los lavados uterinos, el fluido amniótico, el fluido cérvico-vaginal o la orina. Se considera que el método de la invención es especialmente útil para las aplicaciones proteómicas que intervienen en el descubrimiento de biomarcadores.

15 Fundamento de la invención

Como consecuencia de haberse terminado con éxito la secuencia completa del genoma humano en el proyecto del genoma humano (Human Genome Project) y de los éxitos correspondientes con otros genomas tales como el de ratón y el de rata, existe una urgente necesidad en el sector de determinar la función de las proteínas que codifican estos
20 genomas, y de determinar cuales de estas proteínas son expresadas durante varios estados fisiológicos y patológicos.

La proteómica es un área de investigación que trata de definir la función y los perfiles de expresión relativa de subconjuntos de proteínas codificadas por un genoma dado en un tiempo dado en una ubicación celular dada. La proteómica separa, identifica y caracteriza las proteínas expresadas, retenidas, secretadas o liberadas por una célula o
25 tejido con el fin de establecer su o sus funciones y su relación potencial con el inicio, el tipo, el estadio y la progresión de las patologías, así como la respuesta a la terapia y/o la recaída.

La proteómica puede ser empleada para comparar muestras tisulares procedentes de poblaciones enfermas y sanas, con objeto de identificar proteínas cuya expresión está cambiada por la patología. Las proteínas que están significativa-
30 tivamente alteradas en su expresión, en su localización o en su modificación postraducción (PTM) en pacientes con unja patología, en comparación con aquellas correspondientes a un grupo de individuos sanos, pueden representar dianas proteicas para fármacos o para descubrir marcadores biológicos, por ejemplo, biomarcadores de punto final y/o biomarcadores indirectos. Una aplicación de la proteómica consiste en la busca de marcadores biológicos del inicio, de la progresión y del tratamiento de una patología en elementos de la sangre, tal como el suero o el plasma.

35 Las proteínas del suero son herramientas de diagnóstico útiles y la alteración de la expresión de algunas proteínas del suero es un signo inicial de una fisiología alterada, que puede ser indicativa de una patología. En los laboratorios de diagnóstico rutinario, la identificación de las proteínas en suero específicas, con baja abundancia, asociadas con una patología, está relacionada con métodos de inmunoensayo (RIA o ELISA) pesados que requieren mucho tiempo y con radiomarcaje o con enlace enzimático costosos que únicamente tienen la habilidad de evaluar al mismo tiempo un solo componente proteico. Como consecuencia de la naturaleza heterogénea de la mayoría de los desórdenes fisiológicos, se considera, en general, que un solo marcador no es capaz de hacer una predicción suficiente de una patología de tal manera, que existe la necesidad de más de uno candidato biomarcador para reforzar los ensayos de diagnóstico o de pronóstico ya disponibles. Se ha sugerido que puede ser identificado un panel de marcadores múltiples de diagnóstico/pronóstico en el suero mediante la utilización de enfoques proteómicos que tengan la capacidad de
45 perfilar múltiples biomarcadores (Daly and Ozols, 2002).

Una primera herramienta, empleada en los métodos proteómicos para la separación de proteínas y para el análisis de proteínas consiste en la electroforesis de gel bidimensional (2DE). Después de la separación por medio de la 2DE, las proteínas son caracterizadas e identificadas, de manera usual, mediante el empleo de la interferometría de desorción láser asistida por una matriz (MALDI), la identificación de las huellas moleculares de la masa peptídica o de otras formas de la espectrometría de masas avanzada, por ejemplo la espectroscopía de masa con electrospray (MS) o espectrometría de tiempo-de-vuelo (TOF)/TOF MS, o espectrometría reforzada en superficie (SELDI-TOF MS), espectrometría de masa de tiempo-de-vuelo con ionización por desorción láser copulada con la investigación de bases
55 de datos proteicos y genómicos.

Infelizmente, es muy difícil el análisis mediante gel por medio de la 2DE de las proteínas en muestras de fluidos biológicos, tales como suero y plasma. Esto se debe a la cantidad limitada de proteína disponible para ser resuelta por medio de un gel, y a la gran variación en la concentración de las proteínas en muchas muestras. Esta variación de concentración se denomina frecuentemente como “rango dinámico”. Estos factores dan como resultado datos obtenidos mediante la 2DE a partir de muestras complejas, tales como el suero y el plasma no fraccionados, que están dominados por la presencia de proteínas, que se encuentran en gran abundancia en la sangre, por ejemplo la albúmina del suero humano, la inmunoglobulina G (IgG), la haptoglobina, el fibrinógeno, la transferrina, la α_1 -antitripsina, la α_2 -macro-
60 globulina, la IgA y la IgM. Seis de estas proteínas (la albúmina, la IgG, la IgA, la α_1 -antitripsina, la transferrina y la haptoglobina) constituyen entre el 85 y el 90% de la masa proteica en el suero sanguíneo. En general, se considera que se encuentran en una abundancia elevada las proteínas con una concentración mayor que 1 mg/ml, y dichas proteínas pueden representar entre el 2 y el 60% de la proteína total presente.

De este modo, la aplicación de las tecnologías proteómicas actuales está limitada debido a la presencia de proteínas en elevada abundancia “domésticas” tales como la albúmina y las inmunoglobulinas, que constituyen aproximadamente entre el 60 y el 97% de la proteína total en suero (Georgiou *et al*, 2001). Tales proteínas impiden la detección de cientos de proteínas con baja abundancia, algunas de las cuales pueden ser potencialmente relevantes para un estado patológico particular. Por otra parte, el modelo ampliamente extendido de albúmina y de inmunoglobulina en el gel 2-DE puede obscurecer, del mismo modo, a las proteínas con un PI similar y con un peso molecular similar. Teóricamente, cuando se elimina la albúmina y la inmunoglobulina, que constituyen conjuntamente entre el 60 y el 97% de la proteína total en suero, podría analizarse entre 3 y 5 veces más proteína. Si las tecnologías proteómicas deben ser empleadas de manera rutinaria para fines de diagnóstico, se requerirá un procedimiento rápido, económico y simple para eliminar las proteínas en elevada abundancia.

De manera particular, la presencia de estas proteínas abundantes limita severamente la utilidad de los métodos empleados en análisis a gran escala de las proteínas presentes en mezclas complejas de proteínas, tal como una electroforesis monodimensional (IDE), una 2DE, una cromatografía líquida multidimensional y un espectro de masas (MS). Estos métodos se utilizan frecuentemente en la investigación de proteínas con baja abundancia tales como las citocinas, las proteínas de transducción de señal, mediadores hormonales y biomarcadores de cáncer. El problema de rango dinámico está ilustrado en la figura 1, que muestra los resultados de una 2DE de una muestra de plasma humano, no fraccionada. Esto ilustra el problema que se plantea en el caso de las proteínas muy abundantes, tal como la albúmina, que está comprendida en más de un 80% de la proteína total presente en el plasma; véase el círculo en la figura 1. Puesto que la cantidad total de proteína que puede ser cargada sobre un gel está limitada de manera que debe ser aproximadamente menor que 120 mg, la cantidad máxima de proteínas “no-albúmina” que puede ser cargada está limitada a 36 mg aproximadamente, limitando de este modo la aptitud que tiene esta técnica para visualizar y para identificar proteínas biomarcadores con baja abundancia que se suponen que son relevantes desde el punto de vista clínico. Puede ser difícil, sino imposible, detectar las proteínas raras. De manera similar, se presentan problemas de rango dinámico, aún cuando de una manera menos extrema, con el análisis por medio de la 2DE de otros tipos de muestras biológicas, tales como la orina, los extractos tisulares y los lisados celulares.

La publicación WO 02/055654 se refiere a la eliminación de las moléculas con alta abundancia a partir de muestras que son analizadas a continuación mediante el empleo de electroforesis de gel bidimensional. El método descrito en la publicación WO 02/055654 está relacionado con una etapa de purificación por inmovilización mediante el empleo de anticuerpos animales.

Los autores Losso *et al* (Food and Agriculture Immunology, 1998, 10:47-56) describen el empleo de anticuerpos de yema de huevo dirigidos contra albúmina de suero bovino (BSA) e inmovilizados sobre gel de quitosano para el aislamiento por inmovilización y eliminación de BSA a partir de leche de vaca sin afectar al perfil proteico de la leche.

Un enfoque, para resolver este problema, consiste en desarrollar métodos para eliminar la albúmina y otras proteínas con elevada abundancia a partir de muestras de la sangre tales como el suero y el plasma como paso previo al análisis, de este modo se aumenta la sensibilidad del análisis y se refuerza la posibilidad de identificar marcadores biológicos en proteína con baja abundancia. En particular, un método para la eliminación de 50 a 100 de las proteínas más abundantes del plasma como paso previo al análisis sería altamente ventajoso, con el fin de permitir la utilización de carga de muestras de masa relativamente elevada.

Resumen de la invención

Hemos encontrado ahora, de manera sorprendente, que puede ser empleado un procedimiento simple de inmovilización, combinado con la utilización de soportes de captura por afinidad en fase sólida, existentes, para la eliminación rápida de proteínas con elevada abundancia a partir de muestra biológicas, dando como resultado una mejora importante en la separación de proteínas con baja abundancia mediante la 2DE.

Debe entenderse claramente que mientras que la invención está ilustrada, de manera específica, con referencia a las proteínas, podría ser empleado un procedimiento similar para la separación de cualquier molécula con baja abundancia a partir de una muestra compleja. Además de las proteínas con baja abundancia, el procedimiento puede ser utilizado así mismo para separar polisacáridos con baja abundancia o ácidos grasos a partir de una muestra compleja.

Según un primer aspecto, la invención proporciona un método para el empobrecimiento de una molécula proteica con elevada abundancia a partir de una muestra biológica, cuyas etapas comprenden

- a) el sometimiento de la muestra al empobrecimiento por afinidad mediante el empleo de un soporte de afinidad con elevada afinidad para una molécula con elevada abundancia, y
- b) el inmunoempobrecimiento mediante el empleo de un soporte de afinidad copulado con un anticuerpo IgY de gallina dirigido contra el suero completo o el plasma completo o contra cualquier fracción del mismo.

Aún cuando es posible llevar a cabo las etapas en cualquier orden, hemos encontrado que cuando se lleva a cabo la etapa (a) antes que la etapa (b) se requiere mucha menor cantidad de anticuerpo para la eliminación substancialmente completa de las moléculas con elevada abundancia. Por lo tanto es preferente este orden.

ES 2 322 804 T3

De manera preferente la molécula con elevada abundancia es una proteína. De una manera más preferente, la proteína es albúmina.

5 De manera preferente, la muestra biológica es un fluido biológico, tal como suero, plasma, linfa, fluido cerebrospinal, fluido amniótico, fluido cérvicovaginal, fluido uterino o fluido seminal. De manera alternativa, la muestra puede ser medio acondicionado procedente de un cultivo celular o tisular, o puede ser un extracto tisular o celular, de manera especial un extracto de un tejido altamente vascularizado.

10 La muestra biológica puede ser obtenida a partir de una especie mamífera, con inclusión de los seres humanos, a partir de animales de compañía tales como perros y gatos, de animales domésticos tales como caballos, vacas y corderos, o de animales de zoológico tales como primates no humanos, felinos, caninos, bovinos y los ungulados. De manera preferente, se obtiene la muestra a partir de un ser humano.

15 El mamífero puede ser de cualquier sexo, puede ser de cualquiera edad y puede estar o bien sano o puede sufrir cualquier tipo de condición patológica, con inclusión, pero sin carácter limitativo, de infecciones, de cánceres o de condiciones degenerativas crónicas. En otras palabras, el procedimiento de la invención es aplicable a cualquier situación en la que sea deseable llevar a cabo análisis con objeto de detectar una molécula con baja abundancia, o para identificar si existe un cambio en el modelo de expresión de dicha molécula en un mamífero.

20 El soporte de afinidad utilizado en la etapa (a) puede ser cualquier soporte que sea conocido por tener una elevada afinidad a las albúminas, las inmunoglobulinas o para otras proteínas con elevada abundancia. De manera típica, el soporte es una resina para cromatografía de afinidad al tinte, en la cual se copula un soporte sólido con un tinte tal como un compuesto de clorotriazina, con inclusión, pero sin carácter limitativo, de los soportes de afinidad Cibacron blue F3GA tal como el Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories), o la Blue Sepharose (Amersham Biosciences). Otros ligandos del tinte que podrían ser empleados también de manera alternativa para eliminar las proteínas de la sangre abundantes incluyen Procion Red HE3B, Reactive Blue MRB, Reactive Green H4G, Reactive Green HE4BD, Reactive Green HE4BD, Reactive Yellow M8G, y Reactive Brown M4R, pudiendo ser copulados todos ellos con soportes tales como la Sepharose 4B y la 6B. Los tintes adecuados para ser utilizados en la cromatografía de afinidad han sido tratados en una reseña de Scawen (1991). Alternativamente, el soporte puede ser copulado con una proteína tal como una proteína A, una proteína G o fusiones de proteína A/G. Las técnicas de cromatografía de afinidad son perfectamente conocidas en el ramo y han sido reseñadas en Hage (1999) y Larsson (1987).

30 El empobrecimiento por afinidad en la etapa (a) puede comprender el empleo de perlas magnéticas tales como agarosa (Dynabead M-280) a manera de soporte de la matriz en fase sólida para un ligando de afinidad para la separación magnética de las moléculas con alta abundancia a partir de las moléculas con baja abundancia.

35 De manera similar, puede ser utilizado en la etapa (b) cualquier soporte en fase sólida que pueda ser copulado con una inmunoglobulina para formar un soporte de afinidad; éstos incluyen, pero sin carácter limitativo, los geles de agarosa tales como Sepharose 4B o Sepharose 6B (Pharmacia), la agarosa reticulada o las perlas basadas en acrilamida y las perlas basadas en celulosa.

40 El anticuerpo utilizado en la etapa (b) puede ser un anticuerpo policlonal de primera generación dirigido contra el suero completo o contra el plasma completo, o contra cualquiera fracción de estas mezclas proteínicas complejas, y puede ser cultivado, de manera adecuada, mediante el empleo de un programa de inmunización que comprende múltiples inyecciones de refuerzo.

45 En caso necesario, la molécula con alta abundancia puede estar conjugada con una proteína de soporte con objeto de incrementar la inmunogenicidad.

50 De manera más preferente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal de segunda generación, dirigido contra plasma o suero que haya sido sometido ya, al menos, a una rutina de empobrecimiento por afinidad y a un inmunoempobrecimiento con IgY dirigido contra homólogos de plasma o de suero. El anticuerpo puede ser producido y purificado mediante la utilización de cualquier método convencional. Los métodos adecuados para la preparación de la IgY están descritos en las patentes norteamericanas No. 5367054, No. 5420253, No. 4550019 y No. 4056737.

55 Debe entenderse claramente que el procedimiento puede ser llevado a cabo como paso previo a cualquier tecnología de separación. Las tecnologías de separación adecuadas incluyen, pero sin carácter limitativo, la electroforesis de gel monodimensional (1DE), la 2DE, la electroforesis capilar, la espectrometría de masas, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la cromatografía de gases, la cromatografía líquida (LC), la LC multidimensional, o la LC/MS.

60 De este modo, según un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la separación o para el análisis de una molécula con baja abundancia en una muestra biológica, que comprende la etapa de efectuar el empobrecimiento de la molécula con alta abundancia a partir de la muestra con el método del primer aspecto de la invención y, a continuación, se somete a la muestra, tratada de este modo, a un método de separación, tal como una cromatografía, una electroforesis o una espectrometría de masas. Son preferentes los procedimientos de separación, que han sido descritos precedentemente.

Breve descripción de las Figuras

La figura 1 muestra los resultados de la 2DE de una muestra de plasma humano. El círculo indica manchas que representan albúmina.

5

La figura 2A es una ilustración esquemática de un procedimiento para la obtención de anticuerpos policlonales de primera generación y de segunda generación en gallinas.

10

La figura 2B es una ilustración esquemática de los procedimientos para la afinidad y el inmunoempobrecimiento de proteínas procedentes de plasma humano.

15

La figura 3 es una transferencia de Western de una 2DE de una muestra de plasma humano completo. La transferencia se investigó con anticuerpo de gallina agrupado de primera rutina y de segunda rutina dirigido contra plasma humano, y demuestra el rango de los antígenos de proteína abundante frente al cual se han aumentado las respuestas de anticuerpo en las gallinas inmunizadas.

20

La figura 4 muestra los resultados de la 2DE de una muestra de plasma humano sometida a focalización isoelectrica 4-7 IPG y 10% de SDS-PAGE acrilamida (Criterion gel Bio-Rad), y visualizada por medio de SYPRO Ruby®. La figura 4A es una representación de las proteínas que están presentes en el plasma humano no fraccionado. La figura 4B es una representación de las proteínas que están presentes después del tratamiento del plasma humano con Affi-gel Blue. La figura 4C es una representación de las proteínas que están presentes después del tratamiento del plasma humano con Affi-gel Blue y a continuación con plasma antihumano (AHP)-Sepharose 4B.

25

La figura 5 es una representación esquemática de un dispositivo en cartucho de conformidad con la invención para el procesamiento rápido de muestras de fluidos biológicos.

30

La figura 6 es un perfil de la 2-DE de (a) suero no tratado, (b) Affi-Gel Blue y (c) suero humano tratado con el estuche Aurum. El suero humano se trató con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum durante 16 horas como paso previo al análisis mediante la 2-DE. Se cargaron 15 μ g de proteína sobre cada gel. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

35

La figura 7 es una descripción del perfil de referencia de todas las manchas de proteína identificadas por medio de la 2-DE. (a) Manchas de proteína reforzadas 5 veces después del tratamiento con Affi-Gel Blue (en verde) y (b) reforzadas 5 veces después del tratamiento con el estuche Aurum (en verde).

40

La figura 8 es una descripción del perfil de referencia de todas las manchas de proteína identificadas por medio de la 2-DE. (a) Perfil de proteínas únicamente para el tratamiento Affi-Gel Blue en comparación con el suero no tratado (en rojo), (b) perfil de proteínas únicamente para el tratamiento con el estuche Aurum comparado con el suero no tratado (en rojo). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

45

La figura 9 muestra la eliminación, en función del tiempo, de la albúmina después del tratamiento del suero humano con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum. (a) La muestra de suero se trató con el estuche Aurum durante 0 minutos (suero no tratado), durante 15 minutos, durante 1 hora, durante 5 horas y durante 16 horas. (b) La muestra de suero fue tratada con Affi-Gel Blue durante 0 minutos (suero no tratado), durante 1 hora y durante 16 horas. Se cargaron 15 μ g de proteína sobre cada gel.

Descripción detallada de la invención

50

Las formas singulares “uno”, “una” y “el”, “la”, tal como se utilizan en este caso, incluyen las correspondientes referencias en plural, a meno que el contexto dicte claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, una referencia a “una proteína” incluye una pluralidad de tales proteínas, y una referencia a “una molécula” es una referencia a dos o varias moléculas. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por un técnico ordinario en la materia, a la que pertenece la invención. Aún cuando puedan ser utilizados materiales y procedimientos de cualquier tipo, similares o equivalentes a los que han sido descritos aquí, para llevar a cabo o para ensayar la presente invención, los materiales y los procedimientos preferidos son descritos ahora.

60

En las reivindicaciones, que siguen, y en la descripción precedente de la invención, excepto cuando el contexto lo requiera de otro modo como consecuencia del lenguaje expreso o de la implicación necesaria, el término “comprenden” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende” es utilizado en un sentido inclusive, es decir para especificar la presencia de las características indicadas pero no presupone la presencia o la adición de otras características en diversas realizaciones de la invención.

65

Para los fines de esta descripción, el término “empobrecimiento por afinidad” significa la eliminación de componentes a partir de una mezcla compleja basada en características químicas o inmunológicas por medio de agentes específicos.

ES 2 322 804 T3

El término “soporte de afinidad” se refiere a una matriz o soporte con los que están enlazados o copulados agentes específicos y que es utilizado para llevar a cabo el empobrecimiento de componentes a partir de mezclas complejas.

5 El término “inmunoempobrecimiento” significa la utilización de anticuerpos dirigidos contra componentes específicos de una mezcla compleja para eliminar aquellos componentes a partir de la mezcla.

El término “inmunoafinidad” se refiere a la asociación entre un anticuerpo y su correspondiente antígeno o epitopo.

10 El término “alta afinidad” se refiere a la fuerza del enlace entre un anticuerpo y su correspondiente antígeno o epitopo, y el técnico en la materia será capaz, de manera sencilla, de determinar si un anticuerpo dado se enlaza de una manera suficientemente fuerte con una proteína con elevada abundancia como para ser adecuado para los fines de la invención. En general los anticuerpos secundarios tienen una mayor afinidad que los anticuerpos primarios, de tal manera que es esperable que los anticuerpos, obtenidos por una serie de dos o de varias inmunizaciones, tengan una mayor afinidad que los que han sido obtenidos tras una sola inmunización.

15 Los términos “proteína con alta abundancia”, “molécula con alta abundancia” o “proteína altamente abundante” se refieren a una proteína que está presente en una concentración mayor que 1 mg/ml en la muestra biológica.

20 Las abreviaturas que han sido utilizadas en este caso, son las siguientes:

AHP	anticuerpo de plasma antihumano
25 BPB	azul de bromofenol
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamino]-2-hidroxil-1-propano
DTT	ditiotreitól
30 EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
IgY	inmunoglobulina Y
35 PEG	polietilenglicol
TBP	tributilfosfina
40 2DE	electroforesis bidimensional

En una realización preferente de la invención, hemos encontrado que el empobrecimiento de la albúmina mediante el empleo de soporte de afinidad basado en Cibacron Blue, reduce en gran medida el número de manchas de proteína detectables mediante tinción con SYPRO Ruby[®] de geles para la 2DE. Mediante la utilización de esta etapa en conjunción con una segunda etapa de inmunoempobrecimiento con un soporte de inmunoafinidad copulado con una IgY, reduce todavía más el número de manchas, así como también permite la detección de las manchas que previamente no eran detectables.

El equivalente aviar de la IgG, que usualmente se denomina como la IgY, es significativamente diferente en cuanto a sus propiedades químicas y físicas con respecto a la IgG. En particular, además de que tiene una composición y una secuencia diferente de aminoácidos, el IgY tiene una movilidad electroforética mucho mayor, un pH isoeléctrico mucho menor, y un mayor peso molecular que la IgG y tiene una estabilidad química substancialmente diferente. Bajo ciertas condiciones la IgY requiere estabilización mediante tensioactivos no iónicos, mientras que la IgG es estable en ausencia de tensioactivos. Los detergentes iónicos pueden inhibir la reacción de la IgG con algunos antígenos, pero estos antígenos tienen poco efecto sobre la habilidad de la IgY para enlazar antígenos. La IgY es monómera en NaCl 0,15 M (condiciones de baja salinidad), y es dímera en NaCl 1,5M (condiciones de alta salinidad), mientras que la IgG es monómera tanto en condiciones de baja salinidad como en condiciones de alta salinidad. Las propiedades de la IgY están descritas en detalle en la patente norteamericana US No. 4550019. Las diferencias estructurales entre las dos moléculas indican que la región bisagra, que está presente en la IgG entre las partes Fab, está ausente en la IgY. Esta región bisagra hace que la IgG sea menos estable que la IgY, y por consiguiente la IgG es ligeramente menos adecuada que la IgY para ser utilizada en los procedimientos de extracción en fase sólida.

65 La yema de los huevos, puestos por gallinas inmunizadas, es una fuente abundante de anticuerpos policlonales (pAb). Los anticuerpos específicos producidos en gallinas ofrecen diversas ventajas importantes sobre los anticuerpos producidos en otros mamíferos, tales como los que han sido citados precedentemente.

Como consecuencia de la distancia filogenética entre las aves y los mamíferos, existe una gran probabilidad de producción de un elevado porcentaje de anticuerpo específico dirigidos contra antígenos de mamíferos mediante la inmunización de las gallinas que mediante la inmunización de otros animales. A veces las proteínas de mamíferos altamente conservadas fallan a la hora de obtener una respuesta inmune humoral en animales, tales como los conejos, que son utilizados de manera tradicional para generar anticuerpo policlonal. Puesto que la IgY de gallina no interviene en una reacción cruzada con la IgG de los mamíferos, y no enlaza receptores Fc bacterianos o de mamíferos, se reduce el enlace inespecífico y de este modo se elimina la necesidad de las inmunoabsorciones de especies cruzadas.

Para el fraccionamiento previo de suero o de plasma, como paso previo a la 2DE y a la representación consecuente de la proteoma con baja abundancia, fueron utilizados dos soportes de afinidad. El Affi-gel Blue ha sido usado previamente para eliminar albúmina y ciertas proteínas diferentes, a partir de muestras de suero. Sin embargo, de conformidad con nuestros conocimientos no se ha sugerido hasta el presente que el Affi-gel Blue pudiese ser adecuado para la preparación de muestras para el análisis por medio de la 2DE. El Affi-gel Blue y los soportes similares, tal como el HiTrap Blue P (Amersham Biosciences), son soportes de agarosa copulados con el tinte Cibacron Blue F3G-A, que tiene una elevada afinidad no solamente para la albúmina, sino también para el interferón, para un amplio rango de enzimas que requieren nucleótidos, la α_2 -macroglobulina, los factores de coagulación y las proteínas que enlazan con el ácido nucleico. Por consiguiente no solamente provoca el empobrecimiento de la albúmina sino también de la α_2 -macroglobulina y de los factores de coagulación a partir del plasma.

En una técnica conocida como "cromatografía de afinidad a ligando de tinte" se utiliza una variedad de ligandos basados en tintes sintéticos, tales como compuestos de triazina o de trifenilmetano. Los ligandos específicos, utilizados en este procedimiento incluyen Cibacron Blue F3G-A, Procion Blue MX-3G o MX-R, Procion Red HE-3B, y azul de timol o rojo fenol (Hage, 1998; Hermanson *et al*, 1992). Aún cuando todos estos compuestos son sintéticos y no se presentan en la naturaleza, están clasificados como ligandos de afinidad puesto que interaccionan con y enlazan con una gran cantidad de biomoléculas tales como las proteínas y los enzimas por simulación de la estructura de sus sustratos, cofactores o agentes de enlace. Por ejemplo, el Cibacron Blue F3G-A está constituido por un anillo de clorotriazina que tiene varios substituyentes, uno de los cuales es una antraquinona que interactúa con enzimas que tienen un punto de enlace para NAD⁺, NADP⁺ o ATP.

Estos ligandos de tintes pueden ser obtenidos en grandes cantidades y han demostrado un elevado grado de selectividad y de reproductibilidad. Estas propiedades han hecho que sean adecuados para purificaciones a gran escala de dehidrogenasas, cinasas, albúmina, α -fetoproteína, enzimas CoA-dependientes, hidrolasas, IgG, lipoproteínas, nucleasas, polimerasas, sintetasas y transferasas (Hage, 1998; Hermanson *et al*, 1992; Jones, 1991; Scawen, 1991).

La invención se describirá ahora en detalle haciéndose referencia únicamente a los ejemplos y dibujos siguientes no limitativos.

Ejemplo 1

Producción de anticuerpos policlonales para el plasma humano

Se produjeron anticuerpos policlonales de primera generación para el plasma humano en gallinas hembra. El procedimiento está resumido en la figura 2. Las gallinas (cruces, con una edad de 14 semanas, de White Leghorn/Rhode Island Red) se inmunizaron de conformidad con las recomendaciones de la vigésimo primera reunión del Centro Europeo para la Validación de Procedimientos Alternativos (21st European Centre for the Validation of Alternative Methods) (ECVAM), utilizándose 1 mg de proteínas de plasma/ave (12,5 μ l de 80 mg/ml) suspendidos en solución salina (87,5 μ l)/adyuvante incompleto de Freund (100 μ l). Se inyectaron 100 μ l de las proteínas de plasma total por vía subcutánea a través del músculo pectoral mayor, empleándose una aguja de calibre 25 en cuatro puntos (por ejemplo 50 μ l por punto).

Las aves recibieron tres inyecciones de refuerzo como se ha descrito precedentemente, al cabo de 4, de 8 y de 12 semanas. Se recogieron los huevos antes de efectuar la inmunización y se almacenó la yema a -20°C. Los huevos fueron recogidos diariamente durante el programa de inmunización, hasta 30 días desde la última inyección de refuerzo y las yemas se extrajeron como se ha descrito en el ejemplo 2.

Ejemplo 2

Extracción de la IgY

Se separaron las yemas de huevo (10 por tanda) y a continuación se suspendieron en 2 volúmenes de tampón de fosfato 100 mM (pH 7,6) en un vaso de precipitados de vidrio. Se añadió un volumen idéntico de cloroformo y a continuación se agitó durante 5 minutos a la temperatura ambiente. La emulsión resultante se transfirió, a continuación, a tubos de vidrio de 100 ml de centrifuga y se centrifugaron a 2.000 g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se recogió y se determinó su volumen. Se disolvió PEG 6000 (Sigma Chemical Company, St Louis, USA) en el sobrenadante

ES 2 322 804 T3

a una concentración final del 12% p/v, se incubó durante 10 minutos a la temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 2.000 g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante se descargó y el pellet se volvió a suspender en tampón de fosfato 100 mM, pH 7,6 (volumen 1/6 de la yema original) y se almacenó a -20°C en forma de alícuotas de 1 ml.

5 Se recogieron las yemas de huevo durante cuatro semanas después de la inmunización final, se agruparon y se extrajeron como se ha descrito precedentemente.

10 Se determinaron las características de enlace de los anticuerpos extraídos mediante análisis con ayuda de la 2DE Western Blot como se ha descrito más adelante. A continuación se copularon los anticuerpos con Sepharose 4B de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3

15 *Copulación de la IgY con Sepharose 4B*

Se disolvió PEG 6000 en 2 ml de solución de IgY (17,3 mg de proteína/ml), se incubaron durante 10 minutos a la temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 2.000 g durante 1 hora. El pellet se volvió a suspender en tampón de copulación (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, que contiene NaCl 0,5 M) hasta una concentración final de 7,5 mg de proteína/ml.

20 Se suspendió Sepharose 4B (Pharmacia; 1 g) activada con CNBr en 20 ml de HCl 1 mM. La suspensión se lavó a continuación con 200 ml de HCl 1 mM sobre un filtro de vidrio sinterizado. El gel lavado se volvió a suspender en la solución de la IgY, y se mezcló en un mezclador giratorio durante 18 horas a 4°C. A continuación se lavó el gel con 5 volúmenes de tampón de copulación y se incubó en tampón 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, durante 2 horas a 4°C. El gel se lavó 3 veces alternativamente con 5 volúmenes de tampón 0,1 M acetato, pH 4,0, que contiene 0,5 M NaCl, y a continuación con 0,1 M Tris HCl, pH 8,0, que contiene 0,5 M NaCl. El gel de Sepharose 4B (AHP-Sepharose) anticuerpo de plasma antihumano se almacenó a continuación a 4°C en solución salina tamponada con 0,01 M fosfato, pH 7,4, que contenía un 0,05% de azida de sodio como agente para la conservación.

Ejemplo 4

35 *Preparación de plasma sometido a empobrecimiento por afinidad y a inmunoempobrecimiento*

Se sometió plasma procedente de seres humanos varones normales al empobrecimiento por afinidad mediante la utilización de Affi-gel Blue y al inmunoempobrecimiento empleándose AHP-Sepharose. Se suspendió Affi-gel Blue (suspensión de 5 ml de gel por ml de plasma) en columnas de polipropileno selladas de 10 ml (Econo-Columns; Bio-Rad) y se eluyeron con 2 volúmenes de tampón fosfato 20 mM (pH 7,1). Se mezcló plasma (500 µl) con un volumen idéntico de tampón de fosfato 20 mM (pH 7,1) y se mezcló en un mezclador giratorio durante 4 horas a 4°C. A continuación se añadió esta solución a la columna de Affi-gel Blue. La columna se taponó y se mezcló en el mezclador giratorio durante 18 horas a 4°C. Se retiraron el sello de punta de la y el tapón, y se recogió la corriente de salida. Se determinó el contenido en proteína y se almacenó la alícuota a -80°C para los análisis subsiguientes.

45 El plasma residual tratado con Affi-gel Blue se sometió a continuación a un inmunoempobrecimiento con AHP-Sepharose de la manera siguiente. Se lavó AHP-Sepharose (100 µl) con 4 volúmenes de tampón de fosfato 100 mM (pH 7,1) empleándose un filtro de vidrio sinterizado. El gel lavado se volvió a suspender en plasma tratado con Affi-gel Blue (100 µl) en un tubo para microcentrifuga de 2 ml y se mezcló en un mezclador giratorio durante 18 horas a 4°C. La suspensión se centrifugó a 13.200 g durante 5 minutos a la temperatura ambiente y se recogió el sobrenadante, se determinó su contenido en proteína y la alícuota se almacenó a -80°C para análisis subsiguientes.

55 A continuación se utilizó el plasma sometido a empobrecimiento por afinidad y sometido a inmunoempobrecimiento como antígeno para obtener anticuerpos de segunda generación en gallinas, empleándose el mismo programa de inmunización que en el ejemplo 1. Los anticuerpos cultivados fueron evaluados individualmente y se agruparon para la evaluación de sus efectos sobre la eliminación de proteínas a partir de plasma no tratado y a partir de plasma tratado con Affi-gel Blue, respectivamente. El procedimiento para la preparación del anticuerpo está resumido en la figura 2.

Ejemplo 5

65 *Eliminación de proteínas con alta abundancia a partir de muestras de suero humano*

Se trataron muestras de suero humano con Affi-gel Blue mediante el siguiente procedimiento para la eliminación primaria de la albúmina. Para las muestras de suero, se recogió sangre entera (2 ml) mediante punción en vena en tubos de recolección lisos, en los que se permitió que la sangre se coagulase a la temperatura ambiente durante 30

ES 2 322 804 T3

minutos y a continuación se procesó. A continuación se centrifugaron las muestras a 2.000 g durante 10 minutos, después de lo cual se recogió el suero. Para muestras de plasma, se recogió sangre entera de la misma manera en tubos anticoagulantes de EDTA. Se retiró una alícuota (100 μ l) para la determinación de la proteína total. Las muestras de suero y de plasma se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

5

Las muestras se descongelaron hasta la temperatura ambiente y se incubaron con 5 volúmenes de Affi-gel Blue durante 16 horas a 4°C en una plataforma giratoria. A continuación se centrifugaron las muestras a 2.000 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante, se retiró una alícuota (100 μ l) para la determinación de la proteína total y para el análisis por medio de la 2DE, y la parte remanente de la muestra se sometió a incubación bien con anticuerpo de plasma antihumano de primera generación o de segunda generación copulado con Sepharose 4B, durante 4 horas a 4°C. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 20 minutos a 2.000 g a 4°C. Se recogió el sobrenadante, se retiró una alícuota (50 μ l) para la determinación de la proteína total, y la parte remanente se almacenó a -80°C hasta que se sometió al análisis por medio de la 2DE.

15

Ejemplo 6

Electroforesis bidimensional

20

Separación de primera dimensión

Se diluyeron 2 μ l de suero en 48 μ l de tampón de la preparación de la muestra (62,5 mM Tris HCl, 2% de SDS, 25% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol y 2,3% de DTT, pH 7,8) y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Se mezclaron 15 μ g (aproximadamente 7 μ l) de la proteína del suero con tampón de solubilización para la focalización isoelectrica (7M urea, m2 tiourea, 100 mM DTT, 4% de CHAPS, 0,5% de anfolitos de soporte, pH 4-7, 0,01% de BPB y 40 mM Tris) hasta un volumen final de 200 μ l y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Esta mezcla se aplicó entonces a una tira Ready (11 cm, pH 4-7, Bio-Rad) y se rehidrató activamente a 50 V y a 20°C, durante 16 horas. Las proteínas del suero se sometieron a focalización por vía isoelectrica a 250 V durante 15 minutos y a continuación a 8.000 V durante 150 minutos, y a continuación se mantuvo a 8.000 V durante un total de 35.000 Vh/gel, es decir con un total de 42.000 Vh por gel. Las tiras Ready se almacenaron entonces a -80°C hasta la realización del procedimiento de segunda dimensión.

30

Separación de segunda dimensión

35

Se equilibraron tiras Ready procedentes de la separación de primera dimensión en 6 ml de tampón equilibrado (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 30% de glicerol, 2% de SDS, 0,01% de BPB, 5 mM TBP). Se enjuagaron las tiras en tampón en circulación de Tris-glicina SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% p/v de SDS, pH 8,3) y a continuación se aplicaron sobre la parte superior de un Ready Gel (10% o entre 8 y 16% de acrilamida, Criterion Gel; Bio-Rad). Se dispuso una capa de agarosa de bajo punto de fusión (0,5% de tampón en circulación que contiene BPB) sobre la parte superior de la tira. Se insertaron en la agarosa dos mechas, a las que se habían aplicado marcadores del peso molecular. Los geles se sometieron a electroforesis a 10 mA/gel durante 1 hora, a 20 mA/gel durante 2 horas y a continuación a 30 mA/gel durante 30 minutos. Los geles se fijaron en metanol/ácido acético (40%/10% en agua desionizada MilliQ durante 1 hora a la temperatura ambiente y a continuación se incubaron en Sypro Ruby® (Bio-Rad) durante 16 horas a la temperatura ambiente sobre una plataforma oscilatoria. Se destintaron los geles durante 1 hora en metanol/ácido acético (10%/7% en dH₂O). Los geles fueron revelados con el empleo de un revelador Bio-Rad FX con resolución de 100 nM.

40

45

La figura 4 muestra una comparación entre el número de especies de proteínas identificables por medio de la 2DE que pueden ser detectadas cuando se utiliza agrupadamente

50

- a) antisuero de gallina de plasma antihumano de primera rutina y de segunda rutina, en control, plasma humano no tratado,
- 55 b) plasma sometido al empobrecimiento por afinidad y al inmunoempobrecimiento, empleándose anticuerpo policlonal de primera generación, y
- c) plasma sometido al empobrecimiento por afinidad y al inmunoempobrecimiento, empleándose anticuerpo policlonal de segunda generación.

60

Los análisis de las manchas de proteína en la figura 4 están resumidos en la tabla 1. Ésta muestra que el método de esta invención conduce a la eliminación de la mayoría de las manchas de proteína que están presentes en el plasma de control no tratado, no diluido (plasma puro), mientras que revela una proporción muy elevada de proteínas que no habían sido detectadas previamente.

65

TABLA 1

5 Comparación de las manchas de proteína identificadas mediante análisis de revelado
 10 de la representación por medio de la 2DE de suero no tratado (puro), de suero tratado
 con Affi-gel blue (AGB) y de suero tratado con AHP- Sepharose.

15 COMPARACIÓN DE LAS MANCHAS DE PROTEÍNA	Puro (no tratado)	Tratado con AGB	Tratado con AHP Sepharose
20 Número total de manchas de proteína representadas	248	152	157
25 Número de manchas común a ambas representaciones de la proteína neta y de la proteína post tratada	NA	127	130
30 Número de manchas identificadas solamente después del tratamiento	NA	25	27
35 Número de manchas de proteína aumentado en 5 veces o en una proporción mayor después del tratamiento comparado con el puro	NA	9	9
40 Número de manchas de proteína disminuido en 5 veces o en una proporción mayor después del tratamiento comparado con el puro	NA	28	16
45 Mancha única de tratamiento específico (AGB frente a AHP)	NA	14	15
50 Número de manchas de proteína que, en AGB, eran ≥ 2 veces mayores que en AHP Sepharose	NA	12	-
55 Número de manchas de proteína que, en AGB, eran < 2 veces menores que en AHP Sepharose	NA	20	-
60			
65 NA: no aplicable			

Ejemplo 7

Dispositivo para el rápido procesamiento de las muestras

5 El procedimiento y el producto de la invención para la preparación de muestras de suero o bien de muestras de plasma destinadas a la representación de un proteoma con baja abundancia puede ser empleado en la forma de un cartucho de tipo Luer sellado, que es adecuado para ser utilizado junto con jeringuillas de plástico. Se dispone una resina de anticuerpo de plasma antihumano (0,5 ml) entre dos bandas (0,5 ml cada una) de resina Affi-gel Blue, o de otra resina que enlace la proteína, en un cartucho de 1,5 ml. Se conecta una jeringuilla de 2,5 ml, que contiene 1 ml de suero con un extremo del cartucho y se conecta una jeringuilla vacía de 2,5 ml en el otro extremo del cartucho. Este dispositivo está ilustrado en la figura 6. Se hace refluir 5 veces la muestra de suero a través del cartucho, y a continuación se recoge y se almacena para el análisis por medio de la 2DE. El cartucho y la jeringuilla pueden ser suministrados en un estuche.

15

Ejemplo 8

Comparación del empobrecimiento con Affi-Gel Blue o con proteína A

20 Se sometieron muestras de suero humano normal a empobrecimiento por afinidad con Affi-Gel Blue o bien con Affigel proteína A más Affi-Gel Blue como paso previo a la realización del análisis por medio de la 2DE.

Se recogió sangre humana a partir de voluntarios sanos (n = 6) en el Royal Women's Hospital, Melbourne, bajo la condición de una declaración de información del participante y con consentimiento informado. Se recogió sangre entera (10 ml) mediante punción en vena en tubos de recogida lisos para suero (se permitió que la sangre se coagulase a la temperatura ambiente durante 30 minutos). Las muestras se centrifugaron a 2.000 g durante 10 minutos después de lo cual se recogió el suero. Se retiró una alícuota (100 μ l) para la determinación de la proteína total. El suero se almacenó a -80°C hasta su análisis.

30 Se determinó el contenido total en proteína mediante la utilización de un estuche comercial para el ensayo de proteínas con patrones BSA de conformidad con las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL, USA).

Se descongelaron las muestras de suero hasta la temperatura ambiente y se sometieron a incubación con 5 volúmenes de Affi-Gel Blue y se incubaron durante 1 hora o durante 16 horas a 4°C sobre una plataforma giratoria. Se centrifugaron las muestras a 2.000 g durante 10 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se retiraron alícuotas (100 μ l) para la determinación de la proteína total tras corrección por factores de dilución.

Affi-Gel Blue más Affi-Gel proteína A

40 Se trataron muestras de suero humano con los componentes de un miniestuche Aurum para la proteína del suero (Bio-Rad Laboratories, USA). Este estuche utiliza columnas de spin que contienen una mezcla de Affi-Gel Blue y Affi-Gel proteína A para enlazar y eliminar de manera selectiva la albúmina y la inmunoglobulina. Se lavó dos veces la matriz Aurum (Bio-Rad Laboratories, USA) en microcolumna de Bio-Spin con 1 ml de tampón enlazante (tampón de fosfato 20 mM, pH 7,0) por centrifugación durante 20 segundos a 1.000 x g. Se añadieron 16 μ l de suero a 180 μ l de tampón enlazante y se mezclaron en torbellino. Se añadieron 200 μ l de la matriz Aurum. Tras incubación a la temperatura ambiente durante 15 minutos, durante 1 hora, durante 5 horas o durante 16 horas, la columna se centrifugó durante 20 segundos a 1.000 x g para recoger el eluato. La columna se lavó con 200 μ l de tampón enlazante y se combinó con el primer eluato para formar la muestra de suero empobrecida. Se determinó la concentración en proteína total del eluato combinado una vez tomados en consideración los factores de dilución. El eluato se almacenó a -80°C hasta su análisis ulterior.

Electroforesis bidimensional

55

Separación de primera dimensión: se diluyeron 50 μ l de suero puro en tampón para la preparación de muestras y se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Se sometieron 15 μ g de la proteína de suero tratada o de tampón de solubilización de la proteína de suero puro diluido a una separación de primera dimensión como se ha descrito en el ejemplo 6. A continuación, se almacenaron tiras Ready a -80°C hasta el procedimiento de segunda dimensión.

60

Separación de segunda dimensión: se sometieron tiras Ready procedentes de la separación de primera dimensión, a una separación de segunda dimensión, como se ha descrito en el ejemplo 7, con excepción de que se utilizó un 10% de Tris-HCl Precast Criterion Gels (Bio-Rad Laboratories, USA). Los geles fueron analizados empleándose un programa informático PDQuest versión 6. El programa informático identificó manchas de proteína procedentes de las imágenes digitalizadas del gel. Cada muestra de suero se repitió tres veces y se evaluó la variabilidad entre los experimentos sobre tres geles diferentes.

65

ES 2 322 804 T3

Los rendimientos en proteína de suero obtenidos empleándose muestras no tratadas y tratadas con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum están reunidos en la tabla 2. Ambos métodos de tratamiento eliminaron entre el 96 y el 98% de la proteína total en suero en 16 horas, pero con una carga idéntica de proteína (-15 μg), no se observó ningún cambio significativo en el número total de manchas de proteína detectables mediante el análisis por medio de la 2-DE.

TABLA 2

Concentración de proteína en suero y el número de manchas de proteína obtenidos antes y después del tratamiento con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum						
Tratamiento	Proteína total (mg/ml)			Número total de manchas		
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 1	Gel 2	Gel 3
No tratada	58,9	60,6	70,9	163	174	190
Media	63,46 \pm 3,8			175 \pm 7		
Affi-Gel Blue	2,05	2,26	2,7	210	222	232
Media	2,34 \pm 0,33			220 \pm 5		
Estuche Aurum	0,8	0,83	1,26	142	151	160
Media	0,96 \pm 0,26			151 \pm 5		
Los valores son la media \pm error estándar de la medición (SEM) de tres geles diferentes realizados en tres días diferentes.						

Como se ha representado en la figura 6, un análisis de gel 2-DE tintado con SYPRO Ruby de muestras de suero revela un perfil típico de suero en la 2-DE (figura 6a). La mancha de albúmina de 68 kDa aproximadamente estaba presente en la muestra de control no tratada, pero estaba ausente en las muestras de suero tratadas durante 16 horas con Affi-Gel Blue y con el estuche Aurum (figuras 6a, b y c).

La eliminación de la albúmina dio como resultado un reforzamiento significativo de la intensidad de la tinción de varias manchas de proteína, como se ha reunido en la tabla 3 y se ha ilustrado en las figuras 7a y 7b.

TABLA 3

Recuentos del aumento de las manchas de proteína en suero tratado con Affi-Gel Blue en comparación con suero no tratado.	
Aumento de las manchas	Número de recuentos manchas
Dos veces	53 ± 6
Cinco veces	31 ± 5
Diez veces	12 ± 3
Veinte veces	6 ± 1
Los valores son la media ± SEM de seis muestras diferentes de suero.	

El tratamiento con Affi-Gel Blue dio como resultado el reforzamiento en 2 veces de 53 manchas de proteína, en 5 veces de 31 manchas de proteína, en 10 veces de 13 manchas de proteína y en 20 veces de 6 manchas de proteína (figura 7a). De manera paralela, el tratamiento durante 16 horas con el estuche Aurum dio como resultado un reforzamiento de 2 veces, de 5 veces, de 10 veces y de 20 veces de 30 manchas de proteína, de 13 manchas de proteína, de 8 manchas de proteína y de 5 manchas de proteína respectivamente como se ha mostrado en la tabla 4 y en la figura 7b.

TABLA 4

Recuentos del aumento de las manchas de proteína en suero tratado con el estuche Aurum en comparación con suero no tratado.	
Aumento de las manchas	Número de recuentos manchas
Dos veces	30 ± 6
Cinco veces	13 ± 4
Diez veces	8 ± 4
Veinte veces	5 ± 2
Los valores son la media ± SEM de seis muestras diferentes de suero.	

El modelo de la visualización reforzada de las manchas de proteína con ambos métodos de tratamiento fue similar, pero se reveló un mayor número de proteínas cuando se siguió el tratamiento con Affi-Gel Blue.

ES 2 322 804 T3

Otros análisis mostraron que únicamente se encontraron 28 manchas de proteína después del tratamiento con Affi-Gel Blue, y no se visualizaron en el suero no tratado (figura 8a). En contraste, únicamente se encontraron 2 manchas de proteína después del tratamiento con el estuche Aurum, lo cual es consistente con la pérdida de mayor proteína con este método de tratamiento (figura 8b).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum de suero humano da como resultado la eliminación de proteínas con elevada abundancia, tal como la albúmina, con lo que no solamente se aumenta la detección de las proteínas con baja abundancia, sino que también permite la detección de algunas proteínas que no serían detectables de otra manera, que hubiesen permanecido oscurecidas en presencia de albúmina.

Se investigaron las variaciones individuales en el perfil de las proteínas de muestras del mismo suero preparadas en tres días diferentes y repetidas tres veces para eliminar factores de error que podrían deberse a la manipulación de las muestras. Se detectó una variación no substancial en el perfil de las manchas de proteína procedentes de la misma muestra repetida en días diferentes (tabla 2).

Ejemplo 9

20 *Eliminación de la albúmina a lo largo del tiempo*

Para determinar si la eliminación de albúmina con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum elimina manchas de proteína diferentes de la albúmina a medida que aumenta el tiempo, se llevó a cabo un estudio a lo largo del tiempo. Se trataron muestras de suero humano con Affi-Gel Blue durante 1 hora y durante 16 horas y con el estuche Aurum durante 15 minutos, durante 1 hora, durante 5 horas y durante 16 horas respectivamente. Se analizaron 15 μg de estas muestras tras resolución con ayuda del análisis por medio de la 2-DE. En el transcurso de 15 minutos del tratamiento con el estuche Aurum se produjo una pérdida del 98% de la proteína total en suero, con una disminución acompañante en la tinción de la albúmina y un aumento en dos veces del número de manchas de proteína. Con el tratamiento durante 1 hora con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum, se alcanzó un empobrecimiento significativo de la albúmina, con una pérdida no significativa del perfil de proteína o del número de manchas de proteína. Sin embargo, el tratamiento con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum durante 16 horas dio como resultado el empobrecimiento de la albúmina, con una pérdida del 35%, aproximadamente, del número total de manchas de proteína en comparación con el tratamiento durante 1 hora. Estos resultados están reunidos en las tablas 5 y 6, y están ilustrados en la figura 9.

TABLA 5

Concentración de proteína en suero a lo largo del tiempo y número de manchas de proteína después del tratamiento con el estuche Aurum			
Tratamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	Reducción de la concentración de proteína (%)	Número de manchas
No tratado	62,3	0	174
15 minutos	1,45	98	365
1 hora	1,02	99	337
5 horas	1,02	99	287
16 horas	0,92	99	221

TABLA 6

Concentración de proteína en suero a lo largo del tiempo y número de manchas de proteína después del tratamiento con Affi-Gel Blue			
Tratamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	Reducción de la concentración de proteína (%)	Número de manchas
No tratado	62,3	0	174
1 hora	2,65	96	330
16 horas	2,20	96	220

Estas observaciones sugieren que, aún cuando la exposición durante 16 horas del suero humano a Affi-Gel Blue o al estuche Aurum puede dar como resultado un empobrecimiento significativo de albúmina y, como consecuencia, un aumento de algunas proteínas con baja abundancia, esta exposición está asociada así mismo con una eliminación no específica de proteína del suero distinta de la albúmina.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con Affi-Gel Blue y con el estuche Aurum da como resultado la eliminación de la albúmina altamente abundante y, de manera simultánea, el reforzamiento en la detección de otras proteínas. Ambos métodos de tratamiento durante 16 horas eliminaron entre el 96 y el 98% del contenido total en proteína del suero, pero no hubo diferencias significativas en el número total de manchas de proteína analizadas tras el análisis por medio de la 2-DE. Por lo tanto, hemos demostrado también que el tratamiento con Affi-Gel Blue y con el estuche Aurum elimina albúmina con elevada abundancia y que refuerza varias veces la intensidad de la tinción de diferentes manchas. De manera adicional, con una carga idéntica de proteína se detectaron, respectivamente, 28 y 2 manchas únicas mediante el tratamiento con Affi-Gel Blue y con el estuche Aurum en comparación con el suero puro. Estas manchas permanecen oscuras en las muestras de suero puro no tratadas.

El tratamiento con el estuche Aurum da como resultado un mayor empobrecimiento de la proteína, puesto que su componente de proteína A elimina así mismo las inmunoglobulinas. El modelo de suero de la IgG (cadena pesada) se encuentra aparentemente por encima del rango pI comprendido entre 6,5 y 8,3. Puesto que este rango queda comprendido dentro de los límites del rango pI empleado en este estudio, fue evidente en los geles un modelo menos definido de la cadena pesada de la IgG. Un tratamiento durante 16 horas con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum dio como resultado la eliminación de proteínas diferentes de la albúmina. La albúmina es enlazada con elevada afinidad por el Affi-Gel Blue y por el estuche Aurum pero también pueden ser enlazadas otras proteínas con la estructura anular plana del tinte Cibracon Blue 3G, mediante una combinación compleja de interacciones electrostáticas, hidrófobas y mediante puente de hidrógeno. Por lo tanto, no es sorprendente una eliminación no específica de una proteína diferente de la albúmina al cabo de un tratamiento de 16 horas con Affi-Gel Blue o con el estuche Aurum. Sin embargo, cuando se utiliza esta etapa de empobrecimiento de la proteína durante 1 hora solamente, puede conseguirse un empobrecimiento significativo de la albúmina con una eliminación mínima de proteína no específica. Mientras que tanto el Affi-Gel Blue así como el estuche Aurum son reactivos efectivos para el empobrecimiento de albúmina altamente abundante, puede conseguirse mayor sensibilidad en el perfilado de la proteína sin una pérdida significativa de biomarcador de suero potencial únicamente si las muestras son expuestas a los reactivos durante un período de una 1 hora. Este enfoque puede generar un modelo de perfiles de proteína independiente de la identidad de las proteínas individuales, y puede ser empleado como un discriminador en un estado patológico particular.

Es evidente que puede combinarse una etapa de absorción de proteína A, mediante el empleo del estuche Aurum u otro soporte de afinidad a proteína A, con la etapa de inmunoempobrecimiento aquí descrita, como una alternativa al Affi-Gel blue.

Nuestros datos sugieren que mediante la utilización del procedimiento de conformidad con la invención para el procesamiento de muestras como paso previo a la 2-DE o de otros métodos de análisis de proteínas, puede incrementarse la probabilidad para el descubrimiento de nuevos biomarcadores de elevada sensibilidad y de elevada especificidad.

Referencias

- Daly** M. B. y **Ozols** R. F., *Cancer Cell*, 2002, 1, 111-112.
- 5 **Georgiou** H. M., **Rice** G. E., y **Baker** M. S., *Proteomics*, 2001, 1, 1503-1506.
- Hage** D. S., (1998a) Cromatografía de afinidad -Affinity Chromatography-. In Katz E Eksteen R Shoemakers P Miller N eds. *Handbook of HPLC* 1998:483-498 (Marcel Dekker, New York).
- 10 **Hage** D. S., (1998b) Un estudio de los recientes avances en las aplicaciones analíticas de la cromatografía de inmu-
noafinidad - A survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *J Chromatogr*
1998; 715:3-28.
- Hage**, D. S. *Clinical Chemistry* 1999; 45:593-615.
- 15 **Hermanson** G. T, **Mallia** A. K, **Smith** P. K., Técnicas de ligando de afinidad inmovilizado -Immobilized affinity
ligand techniques-. *New York: Academic Press*, 1992:454 pp..
- Jones** K., Un revisión de la cromatografía biotecnológica y de afinidad a gran escala -A review of biotechnology
and large scale affinity Chromatography-. *Chromatographia* 1991; 32:469-480.
- 20 **Larsson** P. O., Cromatografía líquida de afinidad de alta resolución -High-performance liquid affinity
Chromatography-. *Methods Enzymol* 1987; 104:212-223.
- 25 **Scawen** M D., Cromatografía de afinidad a tinte- Dye affinity Chromatography-. *Anal Proc* 1991; 28:143-144.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para el empobrecimiento de moléculas con alta abundancia a partir de una muestra biológica, cuyas etapas comprenden
- a) el sometimiento de la muestra al empobrecimiento por afinidad mediante el empleo de un soporte de afinidad con elevada afinidad para una molécula con elevada abundancia, y
- 10 b) el inmunoempobrecimiento mediante el empleo de un soporte de afinidad copulado con un anticuerpo IgY de gallina dirigido contra el suero completo o el plasma completo o contra cualquier fracción del mismo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo IgY de gallina, empleado en la etapa (b), es un anticuerpo policlonal de primera generación.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo IgY de gallina, empleado en la etapa (b), es un anticuerpo policlonal de segunda generación o de una generación superior, dirigido contra el plasma o contra el suero, que ha sido sometido ya, al menos, a una rutina de empobrecimiento por afinidad y/o a un inmunoempobrecimiento con un soporte de afinidad copulado con la IgY dirigido contra plasma o suero homólogo.
- 20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa (a) se lleva a cabo antes que la etapa (b).
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la molécula con alta abundancia es una proteína.
- 25 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la molécula con alta abundancia es albúmina o inmunoglobulina.
- 30 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra biológica es un fluido biológico.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra biológica es un medio acondicionado procedente de un cultivo celular o tisular, o es un extracto tisular o celular.
- 35 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra biológica es sangre entera, suero o plasma.
- 40 10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que soporte de afinidad empleado en la etapa (a) es una resina de cromatografía de afinidad a tinte.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el tinte es un compuesto de clorotriazina.
- 45 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el soporte de afinidad es un soporte de afinidad Cibacron blue F3GA.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el soporte de afinidad, utilizado en la etapa (a), es una perla magnética y la separación magnética se lleva a cabo con ayuda de medios magnéticos.
- 50 14. Un procedimiento para la separación o para el análisis de una molécula con baja abundancia en una muestra biológica, que comprende la etapa del empobrecimiento de, al menos, una molécula con alta abundancia a partir de la muestra con ayuda de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, como paso previo a que la muestra sea sometida a una o a varias separaciones o etapas analíticas para la separación o para el análisis de la molécula con baja abundancia.
- 55 15. Un procedimiento de identificación de la expresión de una molécula con baja abundancia en un mamífero, que comprende la etapa del empobrecimiento de, al menos, una molécula con alta abundancia a partir de una muestra biológica procedente del mamífero, con ayuda de un método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, como paso previo a que la muestra sea sometida a una o varias etapas de análisis para detectar la expresión de la molécula con baja abundancia.
- 60 16. Un procedimiento según la reivindicación 15, que detecta un cambio en la expresión de la molécula con baja abundancia.
- 65

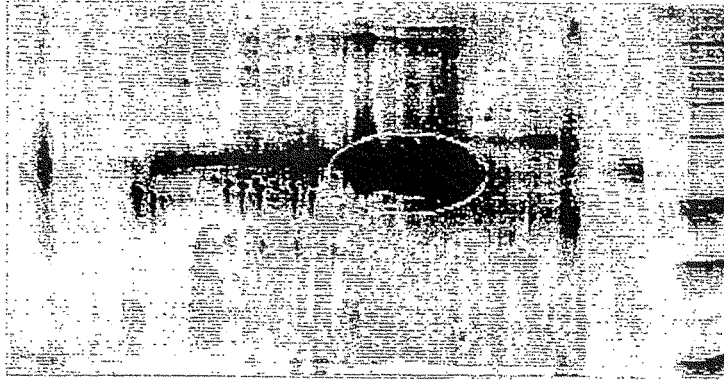


Figura 1

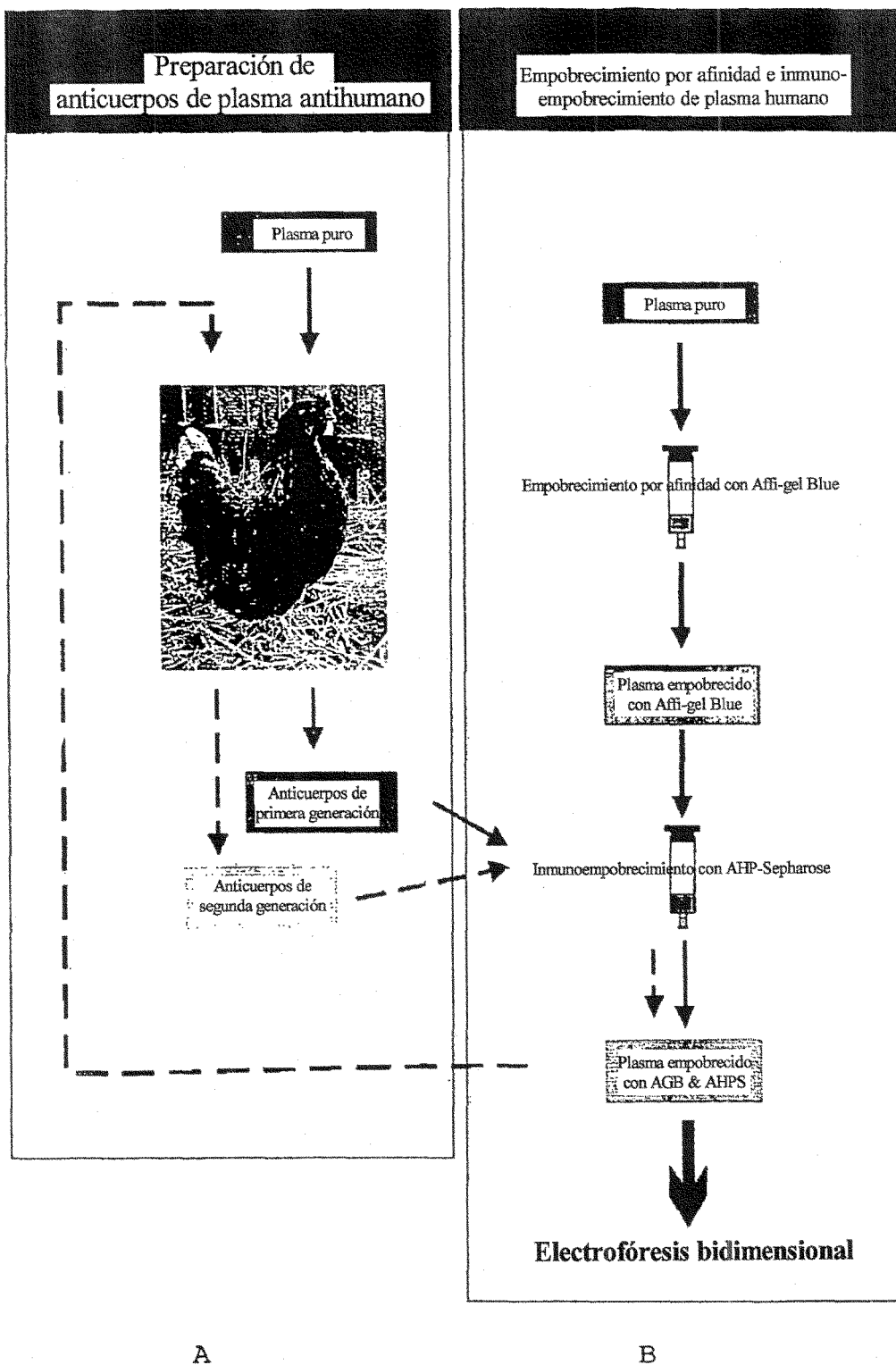
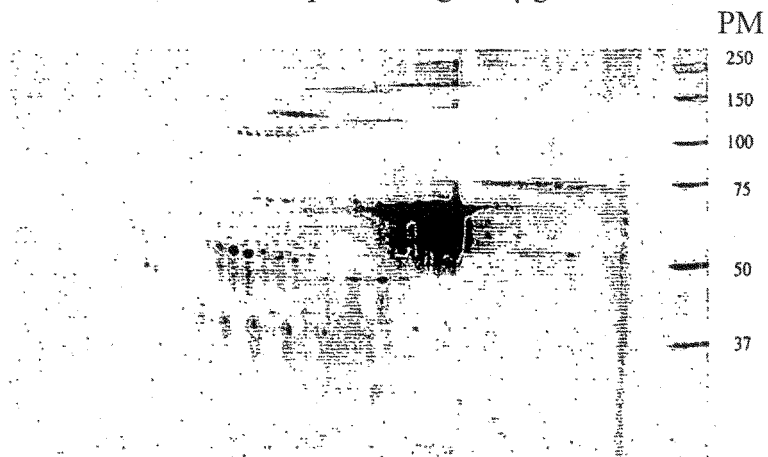


Figura 2



Figura 3

Suero normal puro – carga 15 μ g



pI 4-7

Figura 4A

Suero normal tratado con Affi-Gel Blue Gel – carga 25 μ g

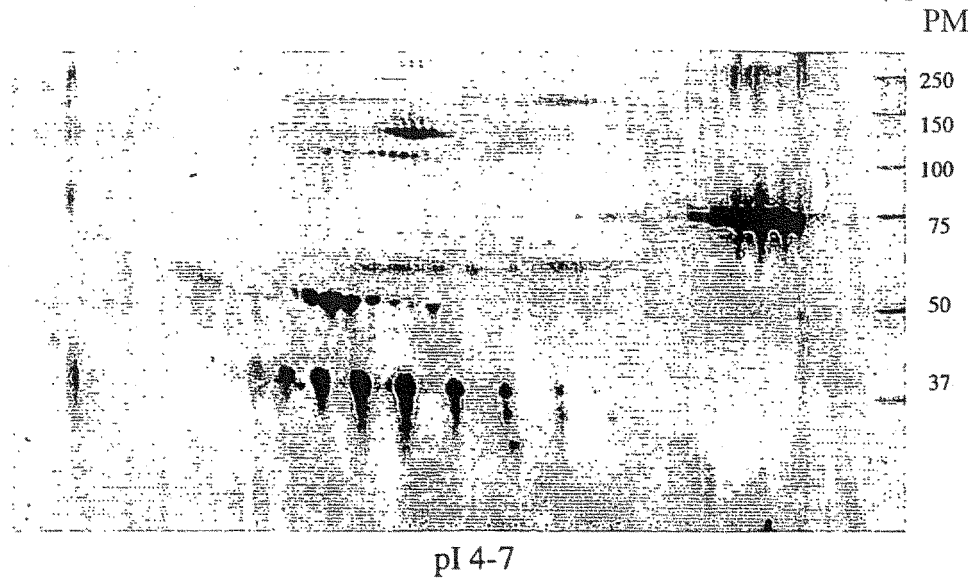


Figura 4B

Suero normal tratado con AGB & Sepharose-IgY – carga 25 μ g

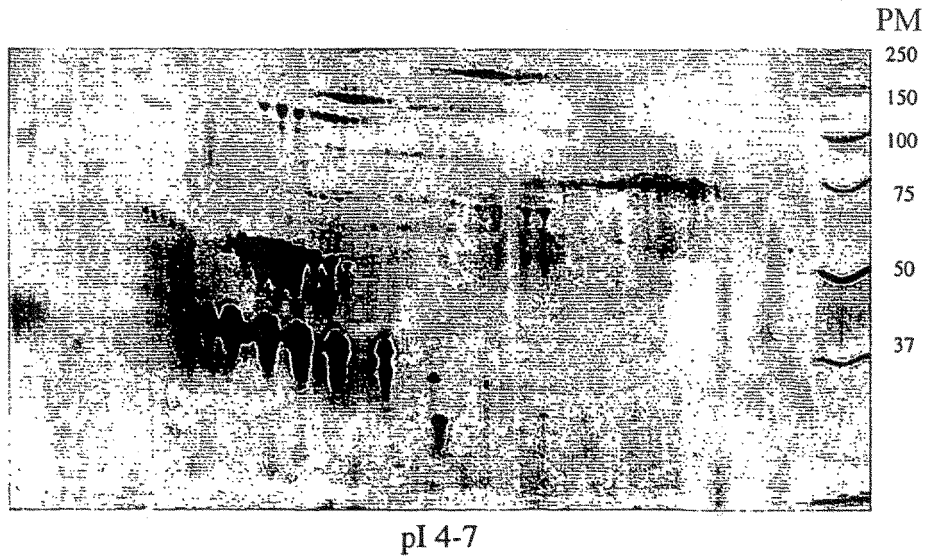


Figura 4C

Muestra refluida en un cartucho AGB-AHPAS-ABG de 0,5 ml

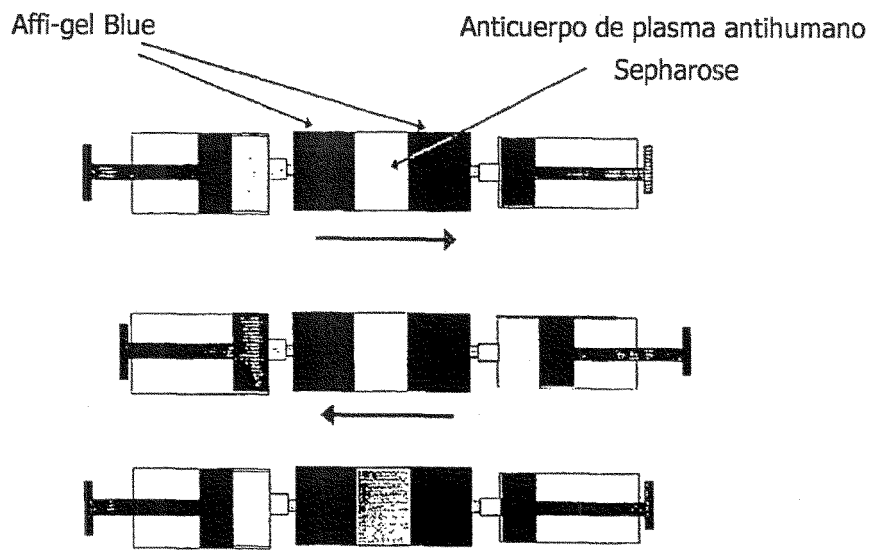


Figura 5

Figura 6

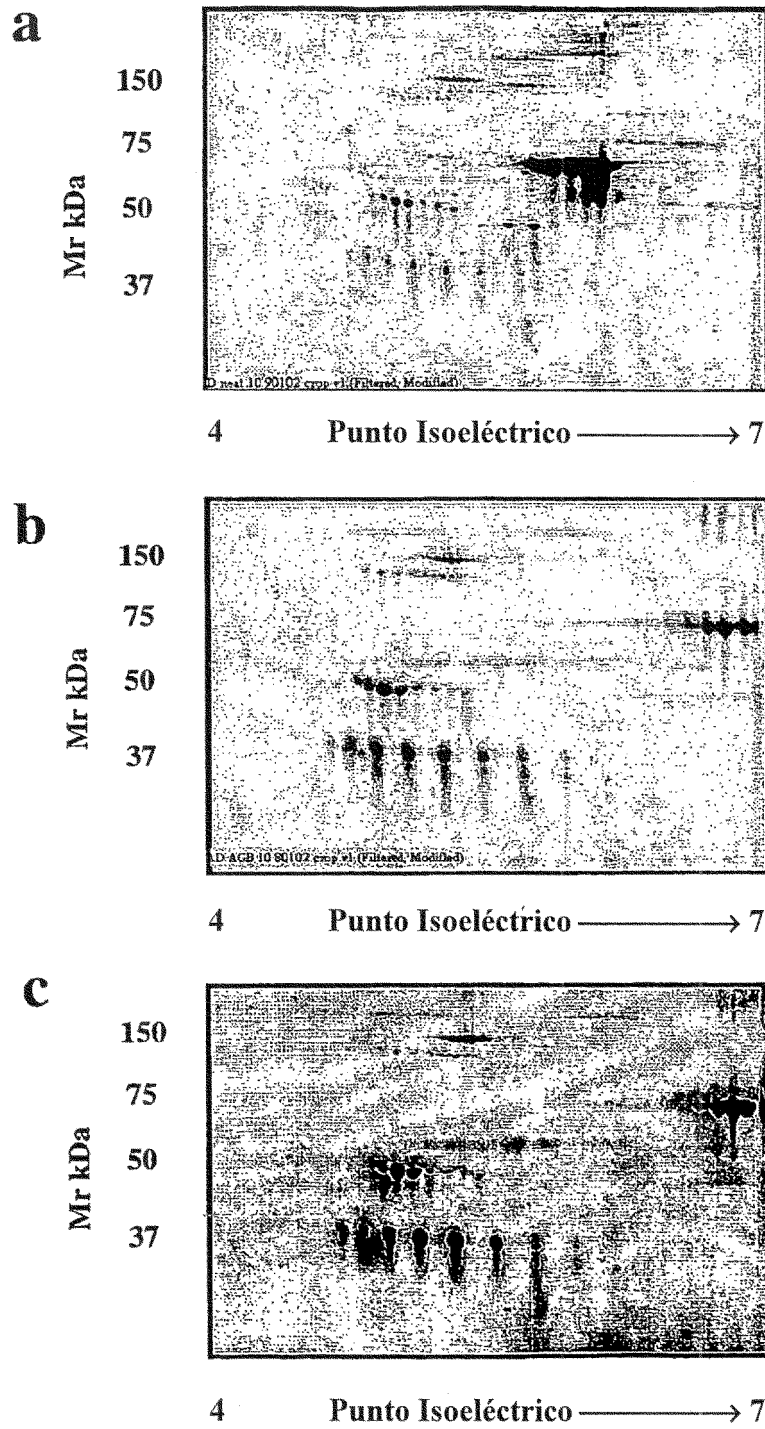


Figura 7

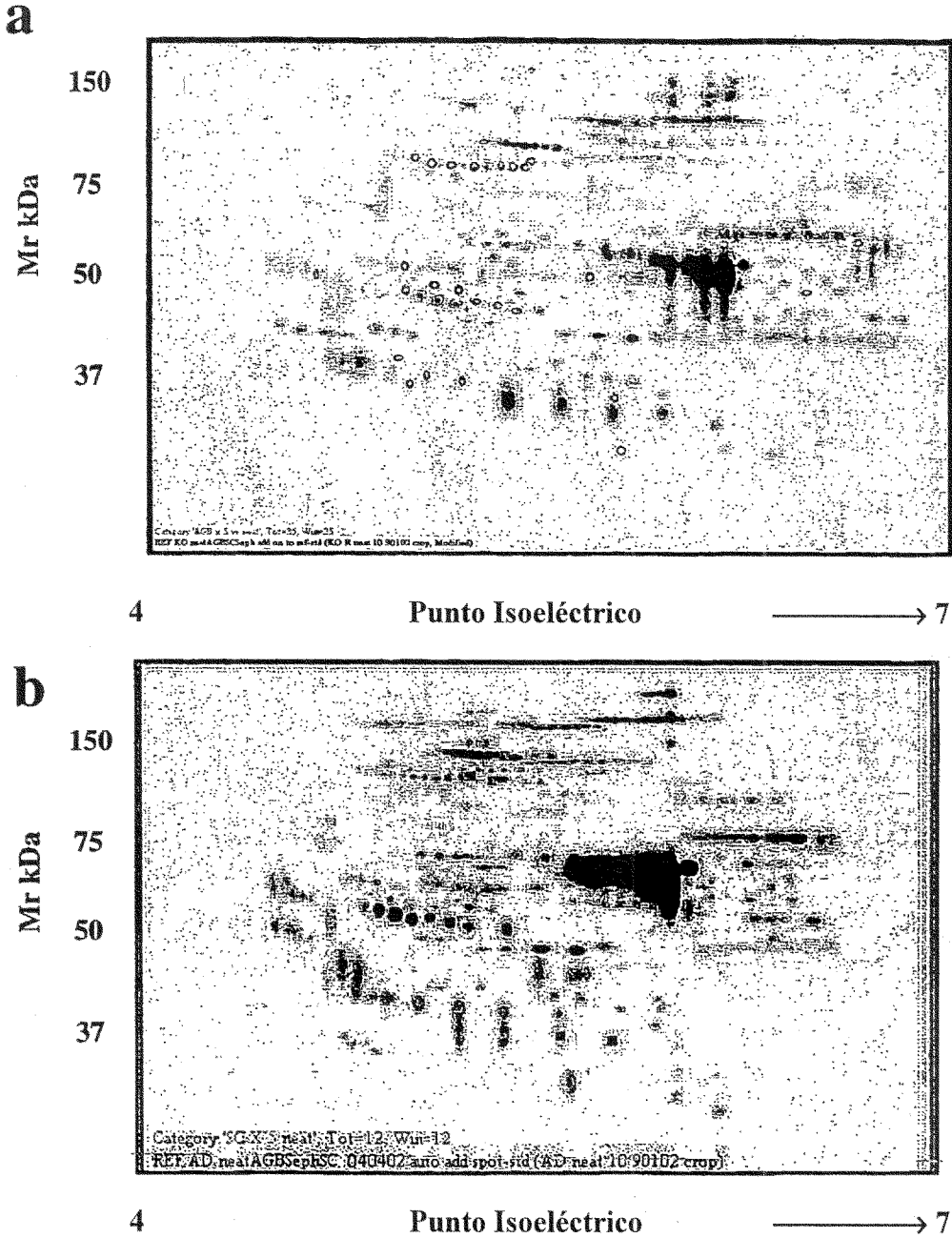
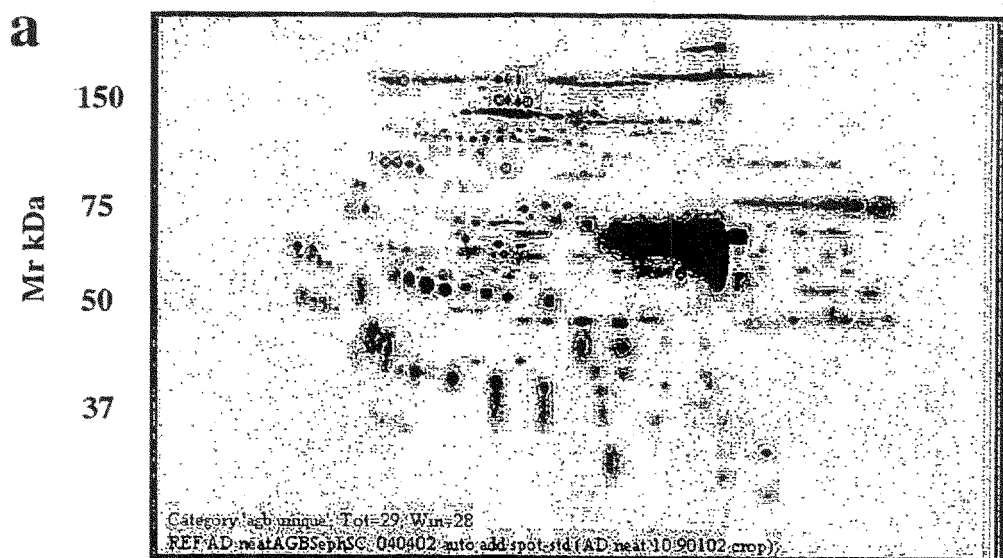
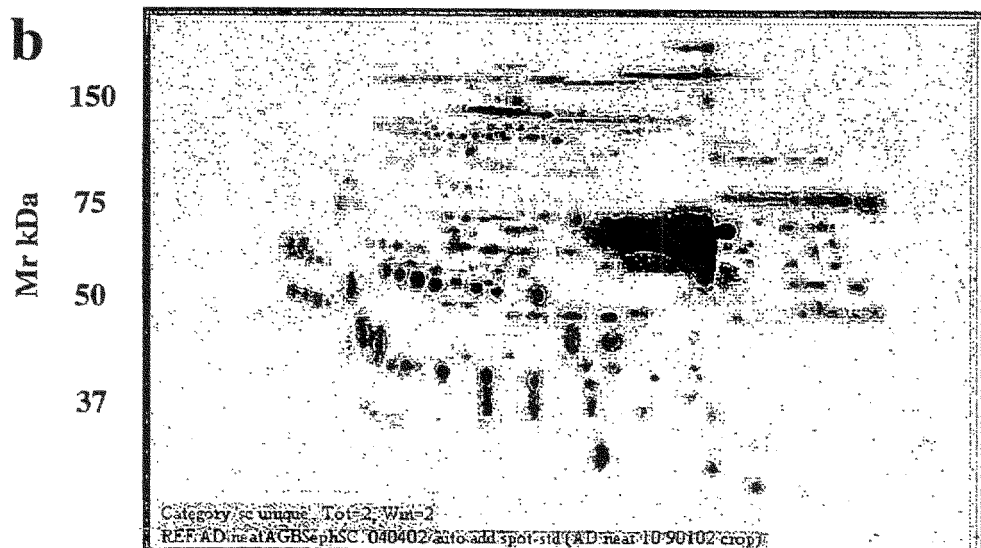


Figura 8



4 Punto Isoeléctrico —————> 7



4 Punto Isoeléctrico —————> 7

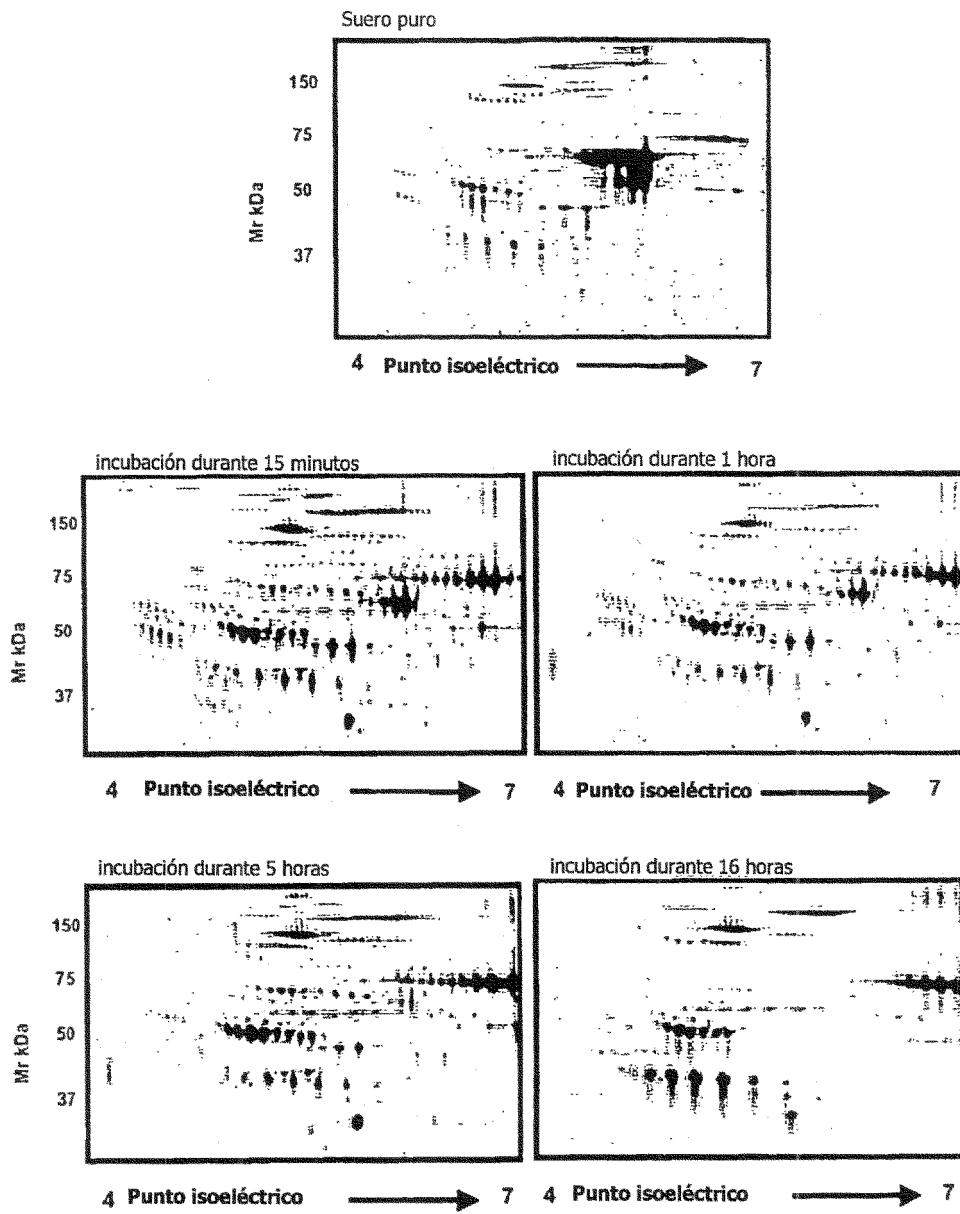


Figura 9a

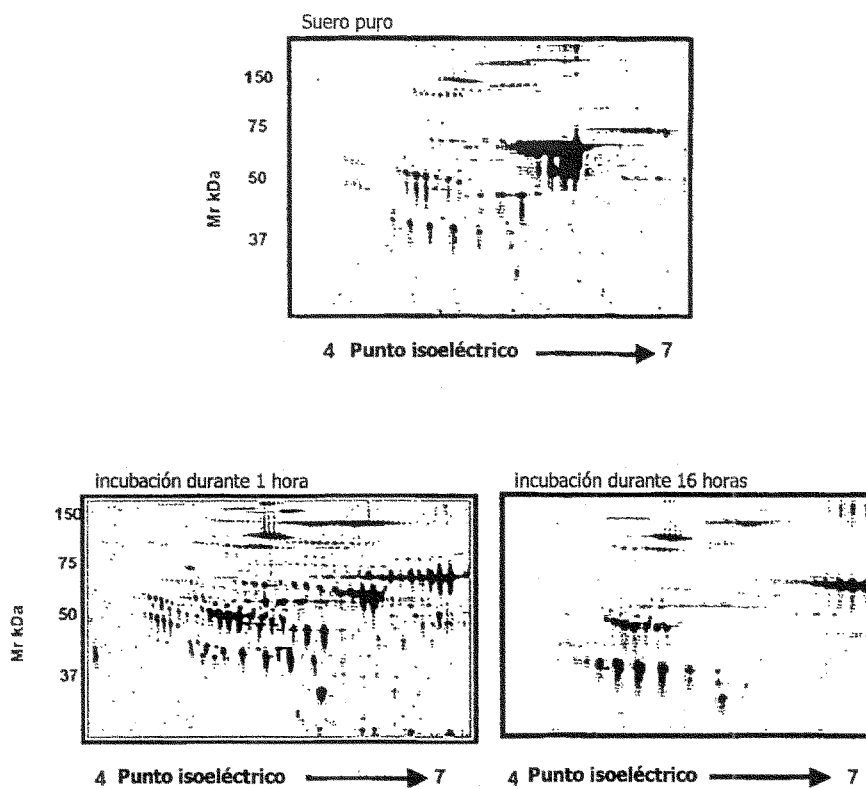


Figura 9b