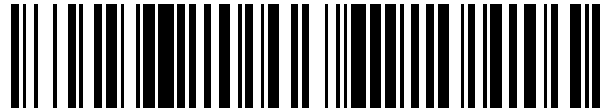


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 758**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2008** **E 08168195 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2184606**

54 Título: **Electroforesis con inmunodesplazamiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2015

73 Titular/es:

HELENA LABORATORIES (UK) LTD. (100.0%)
Queensway South Team Valley Trading Estate
Gateshead Tyne and Wear NE11 0SD, GB

72 Inventor/es:

CHAFFEY, BEN;
BAXTER, JOANNE;
WALTHAM, KEVIN y
ASKEW, BEVERLEY

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 546 758 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

Electroforesis con inmunodesplazamiento

- 5 La invención se refiere a un método para el análisis de una muestra por electroforesis, haciendo uso de una pareja de unión para un compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo que se puede presentar en la muestra. La electroforesis ha sido un método bien establecido para el análisis de varias muestras, que incluyen muestras que comprenden compuestos biológicos tal como proteínas, durante muchas décadas.
- 10 A través de los años se han desarrollado métodos bien establecidos. Por ejemplo, la separación de proteínas séricas en una serie de bandas características mediante electroforesis, se refieren comúnmente como gamma, beta, alfa-1 y 2 y albúmina es bien conocida por aquellos con experiencia en la materia y se describe bien en una amplia variedad de materiales de referencia, tal como el manual 'Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis' por David F. Keren, 2003, Publicaciones Arnold.
- 15 Los métodos comúnmente conocidos incluyen el uso de técnicas en donde un compuesto específico se somete a una formación de complejos con una pareja de unión específica, tal como un anticuerpo contra ese compuesto. Tales técnicas se pueden usar para eliminar el compuesto de la muestra antes de la separación electroforética (típicamente referida como inmunosustracción cuando un anticuerpo se usa como una pareja de unión) o para modificar la movilidad electroforética eficaz de ese compuesto durante la electroforesis (referido como inmunodesplazamiento cuando un anticuerpo se usa como una pareja de unión).
- 20 El compuesto objetivo que forma un complejo con la pareja de unión puede ser un compuesto que debe ser identificado, por ejemplo, una inmunoglobulina monoclonal que puede ser un indicador de una gammapatía monoclonal. En los ejemplos donde la pareja de unión es un anticuerpo este método se puede referir como inmunotipificación.
- 25 Alternativamente, el compuesto objetivo puede ser un factor de interferencia, es decir, que altera potencialmente el análisis de una muestra por otro compuesto cuya presencia debe determinarse, mediante, por ejemplo, la co-migración con el analito de interés o en otro sentido enmascara su presencia, *por ejemplo* una gammaglobulina que puede migrar muy cerca de isoformas de transferrina deficientes en carbohidratos e impedir así su uso como un marcador de diagnóstico para el consumo excesivo de alcohol.
- 30 La electroforesis capilar es una forma específica de electroforesis, en donde un capilar se usa para realizar la electroforesis. La electroforesis capilar ofrece ventajas tales como tiempos de análisis cortos y una alta resolución. Un método para el análisis electroforético capilar de una muestra que comprende un compuesto cuya presencia se debe determinar (es *decir*, analito), en donde se hace uso de un anticuerpo como una pareja de unión para el analito se describe en WO 95/20160. El método implica
- 35 (a) separar una primera porción de la muestra en partes de analito constituyentes mediante electroforesis capilar, y detectar dichas partes;
- 40 (b) mezclar una segunda porción de dicha muestra con al menos una pareja de unión específica con un analito candidato predeterminado, dicha pareja de unión específica tiene una movilidad electroforética diferente de la de dicho analito candidato, confiriéndole por lo tanto, a los complejos resultantes formados una movilidad electroforética diferente a la del analito no unido;
- 45 (c) separar dicha segunda porción en partes constituyentes mediante electroforesis capilar, y detectar dichas partes; y,
- (d) comparar las partes constituyentes separadas de la etapa (c) con las partes constituyentes separadas de la etapa (a).
- 50 Como una pareja de unión específica se usa preferentemente un anticuerpo que se ha modificado químicamente con un anhídrido, tal como anhídrido succínico, para proporcionar el anticuerpo con funciones de ácido carboxílico adicionales, negativas a pH alcalino. En las condiciones analíticas descritas en el ejemplo (pH 10) la carga negativa global del anticuerpo modificado se aumenta por lo tanto, en comparación con el anticuerpo sin modificar. Sin embargo, como se muestra en la Figura 1 de WO95/20160, el anticuerpo modificado todavía migra estrechamente a la inmunoglobulina humana (IgG) y, particularmente el complejo del anticuerpo modificado con IgG no se separa completamente de IgG no complejo. Es evidente que en una muestra biológica real, que se debe analizar para el presencia de una o más proteínas séricas (*por ejemplo*, suero sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo), la migración electroforética del anticuerpo modificado y, particularmente del complejo de anticuerpo e inmunoglobulina en la muestra puede ser tal que pueden co-migrar con las proteínas séricas, por ejemplo, otra inmunoglobulina, una transferrina, albúmina o bis-
- 60 albúmina, para la cual se debe analizar la muestra.
- 65 US 2005/0164302 A1 propone un método alternativo para separar los constituyentes de una muestra biológica y llevar a cabo el inmunodesplazamiento para permitir la tipificación de proteínas monoclonales que se pueden presentar en la muestra biológica analizada. Se menciona que el método permite el desplazamiento fuera de la zona correspondiente al perfil de la migración de las proteínas de la muestra, particularmente, fuera de la zona de migración de la globulina. Se dice que se lleva a cabo mediante la modificación de la pareja de unión (un anticuerpo) de una manera específica. Las

modificaciones específicas mostradas son una modificación de los anticuerpos con anhídrido tricarbónico y la modificación con ácido melítico. A partir de los ejemplos se evidencia que el anticuerpo modificado tiene un efecto en que se lleve a cabo el inmunodesplazamiento, pero es evidente también que el anticuerpo o complejo de anticuerpo modificado e inmunoglobulina de la muestra no se separa totalmente de otras proteínas en la muestra. Notablemente, varios electroferogramas, *por ejemplo*, Figuras 2e, 4b, 5a, 9a y 9b de US 2005/0164302 A1, sugieren una superposición con albúmina y posiblemente otras proteínas que migran entre la albúmina y las inmunoglobulinas de la muestra. Más aun, en una prueba realizada por los presentes inventores el tiempo de migración de un anticuerpo (IgG) sin modificar y un anticuerpo (IgG) modificado con anhídrido de ácido tricarbónico benceno en un tampón a pH 10 (que comprende ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) y ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS)), se encontró que el anticuerpo modificado tuvo un tiempo de migración (tiempo máximo parte superior) que fue similar al tiempo de migración de la albúmina, lo que indica que el anticuerpo modificado no se puede separar de los valores iniciales de la albúmina en una muestra de suero sanguíneo. Más aun, esto indica de que un complejo del anticuerpo modificado y una inmunoglobulina en una muestra de suero pueden tener un tiempo de migración entre el tiempo de migración de inmunoglobulinas y el tiempo de migración de la albúmina. Así, el complejo puede probablemente al menos de forma parcial co-migrar con otras proteínas, *por ejemplo*, las proteínas del suero banda-alfa, en un análisis electroforético usando un tampón de ese tipo. Así, sigue siendo un reto para evitar la co-migración del complejo no-deseada, especialmente en la separación de una muestra complicada, tal como un suero sanguíneo u otra muestra biológica.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método novedoso para analizar una muestra, particularmente, una muestra de un fluido corporal que puede comprender una o más proteínas séricas, para la presencia de uno o más compuestos de interés, tales como una o más proteínas séricas, haciendo uso de una pareja de unión, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, que es capaz de unirse a un compuesto objetivo específico, que puede ser un compuesto cuya presencia se debe determinar (un analito) o un compuesto que puede interferir con el análisis de la muestra.

Particularmente, es un objetivo de la invención proporcionar un método que permite la separación de la línea base de la pareja de unión, y preferentemente de un complejo de la pareja de unión y el compuesto objetivo, a partir de cualquier componente de la muestra, o al menos de cualquier proteína cuya presencia se debe determinar.

Uno o más objetivos adicionales que pueden encontrarse de acuerdo con la invención se harán evidentes a partir de la descripción y/o reivindicaciones.

Los inventores encontraron que es posible usar una pareja de unión que se ha modificado de una manera específica en un método de análisis electroforético.

Como consecuencia, la presente invención se refiere a un método para el análisis de una muestra que puede comprender un compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo, el método que comprende

- mezclar al menos una porción de la muestra con una pareja de unión para el compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo, la pareja de unión es una macromolécula que comprende (i) un segmento capaz de unirse específicamente al compuesto objetivo y (ii) un segmento de polímero polianiónico; y
- separar la muestra que incluye la pareja de unión por electroforesis en un canal que comprende un medio de separación en el que la pareja de unión tiene una carga negativa.

En un método preferido de la invención, una porción de la muestra se analiza después de que se ha combinado (generalmente mezclada antes de iniciar la electroforesis) con la pareja de unión y otra porción de la muestra se analiza usando electroforesis sin que se haya mezclado o de cualquier otra forma combinado con la pareja de unión bajo de cualquier otra forma las mismas condiciones. Después de eso un resultado del análisis de ambas porciones puede compararse para verificar si el analito de interés está presente.

En una modalidad, un método de la invención hace uso de un estuche para uso en el análisis de una muestra por electroforesis capilar, el estuche comprende un

- a) un primer recipiente, que contiene una macromolécula que comprende (i) un segmento capaz de unirse específicamente a un compuesto objetivo y un (ii) segmento de polímero polianiónico; y
- b) un segundo recipiente, que contiene un tampón alcalino para la separación de la muestra por electroforesis capilar;
- c) opcionalmente un capilar para llevar a cabo la electroforesis capilar o un dispositivo microfluídico que comprende un canal en donde se puede llevar a cabo la electroforesis; y
- d) opcionalmente un recipiente que comprende fluido de lavado para el lavado del capilar.

En una modalidad, la pareja de unión es un anticuerpo modificado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un segmento de polímero polianiónico, el segmento de polímero polianiónico con un peso molecular promedio en número de al menos 20 kD, particularmente de al menos 40 kD, más particularmente de al menos 50 kD.

- 5 En un método de la invención, la macromolécula que comprende (i) un segmento capaz de unirse específicamente a un compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo que pueden estar presente en una muestra que se debe analizar y (ii) se usa un segmento de polímero polianiónico para modificar selectivamente la movilidad efectiva del compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo, que -sin unirse a las macromoléculas - puede co-migrar con uno o más compuestos adicionales cuya presencia en la muestra se debe determinar, mediante el cual uno o más los compuestos de interferencia (unido a dicha macromolécula) migran dentro de una zona situada fuera de la zona de migración de los uno o más compuestos cuya presencia se debe determinar.
- 10 El término "o" como se usa en la presente descripción significa "y/o" a menos que se especifique de cualquier otra manera.
- 15 El término "un" o "una" como se usa en la presente descripción significa "al menos uno" a menos que se especifique de cualquier otra manera.
- Al referirse a un sujeto (por ejemplo, un compuesto, un aditivo, etc.), en singular, se pretende que sea incluido el plural.
- Al referirse en la presente descripción a un pH, significa el pH según medido por un medidor Mettler-Toledo SevenEasy con un electrodo de unión abierta InLab Expert Pro con electrodo de referencia integral Argenthal y sensor de temperatura, calibrado por una curva de calibración de tres puntos con pHs de referencia de 4.00, 7.00 y 10.00 a 20 °C, a menos que se especifique de cualquier otra forma.
- 20 La invención, particularmente, permite la determinación de diversos analitos, particularmente, pero no exclusivamente, en muestras complejas, tales como suero sanguíneo, orina, líquido cefalorraquídeo u otro fluido corporal mediante su eliminación selectiva del electroferograma.
- 25 Alternativamente, un análisis puede llevarse a cabo con un nivel reducido de interferencia modificando selectivamente la migración de un compuesto objetivo en la muestra, que puede co-migrar con o de cualquier otra forma enmascarar la presencia del analito o analitos de interés.
- 30 Se prevé que una pareja de unión usada de acuerdo con la invención se puede usar para modificar la movilidad de una variedad de compuestos objetivo (mediante el complejo o de cualquier otra forma la unión con el compuesto objetivo), tal que tanto el compuesto objetivo unido por la pareja de unión como la pareja de unión sin unirse migran suficientemente de forma remota a partir de uno o más analitos en un proceso de separación electroforética para permitir la separación de la línea base a partir de dicho analito o analitos.
- 35 Particularmente, se ha encontrado sorprendentemente que es posible usar, de acuerdo con la invención, una pareja de unión que comprende un segmento de polímero polianiónico que tiene una movilidad electroforética (al menos a pH alcalino, particularmente a un pH por encima de 9) suficientemente diferente de la movilidad de una fracción de inmunoglobulina sérica, preferentemente además a partir de la fracción-beta de proteínas séricas, más preferentemente también a partir de la fracción-alfa y la fracción-alfa2 de proteínas séricas, particularmente, también de la fracción de albúmina y más particularmente, también de la fracción bis-albúmina, para permitir la separación de la línea base de dicha fracción o fracciones tanto a partir de la pareja de unión sin unirse a un compuesto objetivo que puede estar presente en la muestra como a partir de la pareja de unión unida con un compuesto objetivo (tal como una inmunoglobulina) que puede estar presente en la muestra, al menos a un pH alcalino, tal como a un pH en el intervalo de 8 a 11.
- 40 Además, se prevé que la invención puede permitir el uso de la pareja de unión a una concentración relativamente baja aun mientras que sea eficaz para cambiar el tiempo de migración de esencialmente todo el compuesto objetivo o al menos una parte sustancial del mismo en un proceso de separación electroforética.
- 50 En principio, cualquier forma de electroforesis se puede usar. Particularmente, los buenos resultados se obtuvieron con la electroforesis zonal.
- 55 La electroforesis se lleva a cabo en un canal. El canal puede ser particularmente un capilar, en cuyo caso la técnica de electroforesis se refiere generalmente como electroforesis capilar (CE). En una modalidad específica, la electroforesis puede ser llevada en una canal de un dispositivo de microfluido o similar, cuya técnica frecuentemente se refiere en la técnica como 'CE en un chip'. Más información sobre el CE se puede encontrar en el manuscrito de revisión 'Clinical Analysis by Microchip Capillary Electrophoresis' por Sam Li y Larry Kricka, Clinical Chemistry 52, p37-45, 2006, y las referencias citadas en él.
- 60 La pared interior del canal (capilar), particularmente puede comprender grupos ácidos de los cuales al menos una porción se disocia cuando está en contacto con el tampón alcalino, tal que puede hacerse uso de un flujo electroosmótico durante la separación. Los materiales adecuados generalmente se conocen en la técnica. Un material muy preferido que comprende tales grupos ácidos es sílice, particularmente, sílice fundido.
- 65

5 La pareja de unión comprende un segmento capaz de unirse a uno o más compuestos objetivo (el segmento de unión) y un segmento de polímero polianiónico. Típicamente, la pareja de unión es una macromolécula sintética, aunque la macromolécula puede comprender uno o más segmentos de unión y/o uno o más segmentos de polímero polianiónico que son de origen biológico o sintético. El segmento de unión puede ser en principio cualquier segmento natural o sintético capaz de unirse específicamente a un compuesto objetivo específico (*por ejemplo* una inmunoglobulina monoclonal específico) o para un grupo específico de compuestos objetivo (*por ejemplo* IgG's).

10 Particularmente, el segmento de unión puede ser un anticuerpo o un fragmento del anticuerpo de unión al antígeno. El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar comercialmente disponible o se puede preparar mediante una técnica de inmunización, cuyas técnicas son generalmente conocidas en la técnica. Un anticuerpo o fragmento del mismo puede particularmente ser utilizados cuando el compuesto objetivo es un compuesto antigénico, pero también es posible producir anticuerpos contra compuestos que no son antigénicos *per se*, *por ejemplo*, inmovilizando el compuesto (que se conoce generalmente como un hapteno) con una macromolécula que es antigénica. Las técnicas de este tipo
15 generalmente se conocen también. El segmento de unión puede ser un anticuerpo monoclonal o un policlonal o fragmento del mismo. Dependiendo de la aplicación pretendida, se puede preferir un anticuerpo policlonal porque puede permitir la modificación de la migración de una pluralidad de compuestos objetivos estrechamente relacionados.

20 Por otro lado un anticuerpo monoclonal puede ser ventajoso para dirigir un compuesto objetivo específico con alta selectividad. Un anticuerpo usado como un segmento de unión puede ser en principio cualquier tipo de anticuerpo. Por ejemplo, puede ser una IgG, IgA, IgE, IgD o IgM de mamífero o un otro anticuerpo de mamífero, por ejemplo un anticuerpo de mamífero inusual tal como un dominio único de camélido o anticuerpo V_HH, o un anticuerpo aviar tal como IgY.

25 Como se indicó anteriormente, es posible usar también un fragmento de un anticuerpo de unión al antígeno. Tales fragmentos se pueden producir mediante la degradación enzimática de anticuerpos, de una manera conocida en la técnica *per se*.

30 De estos anticuerpos o fragmentos de los mismos, IgG o un fragmento de unión al antígeno del mismo es particularmente útil como un segmento de unión. Se considera que las IgG o fragmentos de unión al antígeno derivados a partir de estos se pueden modificar particularmente bien para obtener una pareja de unión adecuada para su uso en la invención.

35 Otras moléculas que pueden usarse para proporcionar un segmento de unión se pueden seleccionar a partir del grupo de moléculas de unión a proteínas, tales como a partir del grupo de la proteína A, avidina, estreptavidina, y biotina, receptores (*por ejemplo*, como se encuentra en las membranas celulares o en el citoplasma), y otras moléculas con afinidad específica para un objetivo de unión de interés.

40 Un polímero polianiónico es un polímero del cual al menos una parte sustancial de las unidades monoméricas (a partir del cual el polímero está al menos conceptualmente formado) comprende al menos un grupo que es ionizable en un líquido acuoso (de pH suficientemente alto), tal que el polímero se carga negativamente. El polímero puede ser sintético o natural.

45 En general, el segmento de polímero polianiónico comprende una pluralidad de grupos ácido que tiene un pKa alrededor o por debajo del pH en el que la pareja de unión está destinado a ser utilizado, preferiblemente al menos 2 unidades de pH por debajo, de manera que cuando se utiliza en la separación electroforética al menos la mayoría de los grupos se disocian (en el presente documento el grupo aniónico término puede ser utilizado tanto para la no ionizada y la forma ionizada de un grupo ácido de un polímero polianiónico, del mismo modo cuando se refiere a un grupo ácido de un polímero polianiónico este término se entiende para incluir el ácido no disociado, la base conjugada y sales de los mismos). Se prefiere específicamente que el segmento polianiónico comprenda una pluralidad de grupos ácidos que
50 tiene un pKa de 7 o menos. En principio, parte de las unidades monoméricas no necesitan comprender un grupo ionizable, sin embargo, se prefiere que el 50-100 %, particularmente el 75-100 %, más particularmente el 90-100 % de los grupos monoméricos comprenden uno o más grupos que son ionizables para formar un grupo aniónico en pH alcalino.

55 Los ejemplos de grupos ionizados de un segmento de polímero polianiónico, particularmente incluyen, funciones de carboxilato, funciones de sulfato, funciones de sulfonato, funciones de fosfato y funciones de fosfonato.

60 En una modalidad preferida, el segmento polianiónico se selecciona a partir del grupo de poli(aminoácidos) polianiónicos, poli(ácidos carboxílicos), poli(ácidos sulfónicos), polinucleótidos, polisacáridos carboxilados, polisacáridos sulfatados y polisacáridos fosforilados, que incluyen los copolímeros de los mismos.

65 Buenos resultados se realizaron con un poli(aminoácido). El poli(aminoácido) por lo general tiene una pluralidad de grupos laterales ácidos. Estos grupos laterales pueden ser un grupo lateral de un aminoácido natural que tiene un - grupo lateral de ácido carboxílico, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, u otro grupo ácido, tal como una función hidroxilo (como en tirosina, que tiene un pKa de aproximadamente 10). En una modalidad específica de la

- invención, el segmento de polímero polianiónico es un segmento de poli(aminoácido), cuya una pluralidad de grupos laterales de amina (*por ejemplo*, una pluralidad de residuos de aminoácidos lisina) se derivatizaron para formar un grupo ácido. Para lograr esto, tales funciones se pueden reactivar con un poliácido o anhídrido del mismo, *por ejemplo*, ácido dicarboxílico, un ácido tricarboxílico o un ácido carboxílico que tiene más de tres funciones de ácido carboxílico.
- 5 Particularmente, el grupo lateral amina puede derivatizarse con ácido succínico, ácido melítico, ácido tricarboxílico benceno, un ácido sulfónico, un ácido fosfórico, o un anhídrido de cualquiera de éstos. Tales poli(aminoácidos) se puede adquirir comercialmente o derivatizado de una manera conocida *per se*, *por ejemplo*, en la técnica anterior mencionada anteriormente.
- 10 Un segmento poli(aminoácido) particularmente preferido es un segmento de poli(aminoácido) que comprende una pluralidad de residuos de lisina de los cuales al menos la mayoría de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, preferentemente por carboxilación, por ejemplo, por succinilación, particularmente la polilisina en donde el 90-100 %, o preferentemente 98-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos. Una pareja de unión que comprende un segmento de este tipo se encontró particularmente
- 15 ventajosa para uso en un método en donde una muestra se analiza para la presencia de una proteína sérica.
- En una modalidad preferida adicional, se proporciona un segmento polianiónico que comprende ácido poliaspártico o ácido poliglutámico.
- 20 En una modalidad adicional el segmento aniónico que comprende un segmento de poliarginina, poliasparagina, poliglutamina o polihistidina de los cuales al menos la mayoría de los grupos laterales de amina (preferentemente 90-100 %) se transformaron en grupos laterales aniónicos, preferentemente mediante la reacción con ácido succínico u otro ácido policarboxílico o anhídrido de este.
- 25 Un segmento de polisacárido aniónico se puede particularmente seleccionar a partir del grupo de las celulosas de carboxialquilo, tales como celulosas de carboximetilo; heparinas; dextranos sulfatados; ácidos hialurónicos y similares.
- Un ácido polisulfónico adecuado es el poli(ácido 4-estirenosulfónico).
- 30 Ácidos policarboxílicos adecuados se pueden seleccionar a partir del grupo de los ácidos polimaléicos, ácidos poliacrílicos, ácidos polimetacrílicos y ácidos polifumáricos, que incluyen los copolímeros de los mismos. Un copolímero adecuado es, por ejemplo, un copolímero de poli(ácido 4-estirenosulfónico-co-maleico).
- 35 El tamaño promedio (peso molecular) del polímero se puede seleccionar dentro de amplios límites, particularmente en función de su uso previsto. Se ha encontrado que la movilidad efectiva de un complejo de un compuesto objetivo y la pareja de unión puede aumentar (*es decir*, se hace más negativa) con el aumento de la masa molecular del segmento polianiónico (en una relación similar masa sobre carga del segmento). Así, se contempla que seleccionando el peso molecular promedio del segmento de polímero polianiónico se puede ajustar la movilidad deseada del complejo pareja de unión-compuesto objetivo.
- 40 Como se usa en la presente, el peso molecular (promedio) es el peso molecular (promedio) basado en espectrometría de dispersión de luz asistida por matriz (MALLS) o en la viscosidad (como se especifica por el proveedor si un polímero comercialmente obtenido se usa para preparar la pareja de unión), o el peso molecular (promedio) determinado por ultracentrifugación analítica (AUC).
- 45 El peso molecular promedio numérico (que se determina por AUC) del segmento de polímero polianiónico puede ser al menos 1 kg/mol, al menos 10 kg/mol o al menos 20 kg/mol. Preferentemente, el peso molecular promedio numérico es de al menos 40 kg/mol, con mayor preferencia al menos 50 kg/mol o al menos 75 kg/mol.
- 50 El límite superior se define principalmente por la solubilidad/dispersabilidad de la pareja de unión. Más aun, cuanto mayor sea el segmento polimérico, mayor tiende a ser la viscosidad. Así, usualmente el segmento polimérico elegido tiene un peso molecular promedio tal que la viscosidad de la muestra que comprende la pareja de unión sigue siendo fácil de manejar. La persona experta sabrá cómo determinar una adecuada viscosidad superior y el peso molecular. Generalmente, el peso molecular promedio numérico será 10000 kg/mol o menos, preferentemente 5000 kg/mol o
- 55 menos, particularmente 1000 kg/mol o menos, más particularmente 750 kg/mol o menos.
- La muestra preferentemente es una muestra biológica, particularmente una muestra que comprende un fluido corporal, más particularmente una muestra que comprende un fluido corporal seleccionado a partir del plasma sanguíneo, suero sanguíneo, líquido linfático, orina o líquido cefalorraquídeo.
- 60 El analito puede ser en principio cualquier analito que se puede separar por electroforesis (incluyendo cualquier analito separable por cromatografía electrocinética). Particularmente, el analito se puede seleccionar de biomoléculas, más particularmente a partir de proteínas y otros péptidos. El analito puede ser el compuesto objetivo o un compuesto que es probable que co-migre con el compuesto objetivo en ausencia de la pareja de unión. Particularmente, el analito puede ser un marcador para un trastorno, tal como un trastorno seleccionado de gammapatías, paraproteinemias, patologías
- 65 hepáticas y alcoholismo.

Los ejemplos preferidos de los analitos son las proteínas séricas, particularmente una proteína sérica seleccionada a partir del grupo de las inmunoglobulinas; transferrinas; albúmina; bis-albúmina; microglobulinas, tal como beta-2 microglobulina; y macroglobulinas, que pueden ser una inmunoglobulina, tal como IgM, o puede ser otra macroglobulina, tal como macroglobulina alfa-2 .

Las condiciones de separación se pueden basar en un método conocido *per se*, *por ejemplo*, en la técnica anterior descrita anteriormente para el análisis de un analito específico. También soluciones tamponadas para electroforesis están comercialmente disponibles, para diversos analitos.

Generalmente, es ventajoso usar una solución tampón que tiene un pH que es aproximadamente el mismo o más alto que el pKa (promedio) del segmento de polímero polianiónico, tal que al menos la mayoría de las funciones del ácido se ionizan para formar grupos aniónicos. Particularmente, la separación de la muestra puede llevarse a cabo usando una solución que tiene un pH alcalino, particularmente un pH en el intervalo de pH 8.0 a 11.0, más particularmente un pH en el intervalo de pH 9.0 a 10.7, aun más particularmente en el intervalo de 9.5-10.5. Preferentemente, la solución comprende un tampón de pH. Tal tampón es generalmente una combinación de al menos un ácido y al menos una base (que puede ser la base conjugada del ácido); con un pKa de aproximadamente el pH de la solución (generalmente el pKa siendo en el intervalo de pH +/- 1 unidad de pH, preferentemente en el intervalo de +/- 0.5 unidades de pH).

Los ejemplos de ácidos/bases que se pueden usar para proporcionar soluciones tamponadas son tampones de borato, fosfato y carbonato, tampones basados en aminoácidos y compuestos anfotéricos para proporcionar tampones, conocidos como tampones biológicos. Los ejemplos de ácidos/bases para tampones biológicos incluyen bis-TRIS (2-bis [2-hidroxi-etil]amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol), ADA (ácido N- [2-acetamido] -2-iminodiacético), ACES (ácido 2- [2-acetamino]-2-aminoetanosulfónico), PIPES (ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico), MOPSO (ácido 3- [N-morfolino] -2-hidroxiopropanosulfónico), bis-TRIS PROPANO (1,3-bis[tris(hidroxi-etil)metilaminopropano]), BES (ácido N,N-bis [2-hidroxi-etil]-2-aminoetanosulfónico), MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico), TES (ácido 2-[2-hidroxi-1,1-bis (hidroximetil)etilamino]etanosulfónico), HEPES (ácido N- [2-hidroxi-etil] piperazina-N'-(2-etanosulfónico)), DIPSO (ácido 3-N,N-bis[2-hidroxi-etil] amino-2-hidroxiopropanosulfónico), MOBS (ácido 4-N-morfolinobutanosulfónico), TAPSO (ácido 3-[N-tris-hidroxi-etil-metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), TRIS (2-amino-2- [hidroximetil]-1,3-propanodiol), HEPPSO (ácido N-[2-hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-hidroxiopropanosulfónico]), POPSO (ácido piperazina-N,N'-bis[2-hidroxiopropanosulfónico]), TEA (trietanolamina), EPPS (ácido N- [2-hidroxi-etil]- piperazina-N'-[3-propanosulfónico]), TRICINA (N-tris [hidroximetil]metilglicina), GLY-GLY (diglicina), BICINA (N,N-bis [2-hidroxi-etil]glicina), HEPBS (ácido N-[2-hidroxi-etil]-piperazina-N'-[4-butanosulfónico]), TAPS (ácido N-tris[hidroxi-etil]metil 3-aminopropanosulfónico), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), TABS (ácido N-tris[hidroxi-etil]metil-4-aminobutanosulfónico), AMPSO (ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico), CHES (ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico) y CABS (ácido 4-[ciclohexilamino] -1-butanosulfónico).

Por ejemplo, para el análisis del uso de las proteínas séricas se puede hacer, particularmente, una solución tampón que tiene un pH en el intervalo de pH 9.0 a 10.7. Los estuches adecuados que comprenden un tampón y las instrucciones están comercialmente disponibles, *por ejemplo*, el estuche CE-Sure SPE, disponible desde mediados de la década de 1990, de Helena Biosciences (Gateshead, Reino Unido). Además, en US 2002/0162744, que describe un aditivo que interactúa con al menos una proteína sérica, particularmente la albúmina, y modifica la movilidad electroforética, se describe una solución tampón alcalina de pH 10. Del mismo modo, la separación de sialoformas de la transferrina sérica puede, por ejemplo llevarse a cabo en el intervalo de pH de 8-9, en una solución tampón que comprende borato y diaminobutano, *por ejemplo*, como se describe en Journal of Chromatography B, 742 (2000), 79-89.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1 Inmunodesplazamiento CE utilizando un anticuerpo modificado con un poli(aminoácido)

preparación de pareja de unión

55 Fluido A: anticuerpo (IgG anti-humano de oveja kappa, 8 mg/ml) se dializó durante toda la noche en 100 mM de fosfato sódico, 900 mM de NaCl pH 7.4. Se usaron 500 µl de esta solución de anticuerpo por reacción.

60 Fluido B: 10 mg de poli(aminoácido) se disolvió en 250 µl de 100 mM de fosfato sódico, 900 mM de NaCl, pH 7.4.

Fluido C: 10 mg de NHS (sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida) se disolvió en 40 µl de 100 mM de fosfato sódico, 100 mM de NaCl, pH 7.4.

65 Fluido D: 10 mg EDC (N-(3-dimetilaminopropil) -N'-clorhidrato de etilcarbodiimida) disuelto en 40 µl de 100 mM de fosfato sódico, 100 mM de NaCl, pH 7.4.

5 Los fluidos A, B, C y D se combinaron y se mezclaron para formar una mezcla de reacción mediante agitación con vórtex. Los reactivos en la mezcla se dejaron reaccionar durante toda la noche a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), mientras que se mezclaron de extremo a extremo en un rotador, formando de ese modo un anticuerpo al cual se une el poli(aminoácido) covalentemente, es decir, el anticuerpo modificado o pareja de unión.

Después de eso la mezcla de reacción se dializó contra una solución de 50 mM, de fosfato sódico, 200 mM de NaCl, pH 8.1, usando un tubo de diálisis de corte de 100 kg/mol de peso molecular.

10 El anticuerpo modificado se concentró después de eso colocando el tubo de diálisis que contiene el anticuerpo modificado en absorbente Spectra/Gel (Spectrum Labs, Rancho Domínguez California, Estados Unidos).

Después de la etapa de concentración, una solución de 50 mM de fosfato sódico, 200 mM de NaCl, pH 8.1 se añadió a la solución de anticuerpo, hasta un volumen de 500 µl.

15 Preparación de muestras para el inmunodesplazamiento CE

2 µl de suero sanguíneo humano se añadió en 98 µl de solución tampón CE El tampón fue 200 mM de CAPS, 66 mM de TAPS en agua, pH 9.7, y se mezcló. Después de eso, se añadió 20 µl de solución de anticuerpo modificado. Después de mezclar, la muestra estuvo lista para la separación por CE.

Electroforesis con inmunodesplazamiento

25 La configuración del sistema CE fue como sigue:

Instrumento	: Programa PrinCE CEC 760, DAX 3D 8.1
Capilar	: silicio fundido (sin revestimiento interno)
Longitud del capilar al detector	: 23 cm
Longitud del capilar total	: 30 cm
Diámetro interno del capilar	: 50 µm

35 La muestra se inyectó mediante inyección a presión (25 mbar, 6 seg) y para la separación se aplicó 13 kV. La temperatura fue 25 °C.

Además, una muestra de suero se preparó y se separó de la misma manera, con la excepción de añadir el anticuerpo modificado.

40 Ejemplo 1A: Anticuerpo modificado con succinilato de polilisina

IgG anti-humana de oveja se modificó con succinato de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, núm. de catálogo. P3513, Pm>50 000 g/mol, Pm basado en la viscosidad de poli-L-lisina, evaluado además por MALLS) como se describió anteriormente.

45 La muestra de suero fue una muestra de control de suero humano normal, es decir, una muestra de un humano sano.

50 La Figura 1 muestra cómo se separaron las bandas de proteínas. El gráfico superior es de la muestra con la que se añadió la pareja de unión (anticuerpo modificado) a las inmunoglobulinas humanas, el gráfico inferior es de la muestra sin la pareja de unión. Como se muestra en la Figura 1, la pareja de unión fue eficaz en la unión a las inmunoglobulinas en el suero y ni la pareja de unión en sí ni el complejo de la pareja de unión con inmunoglobulinas humanas migró dentro o cerca de las bandas de proteínas séricas. La separación se detuvo después de 4 min (aproximadamente 45 seg después que la última banda (albúmina) migró completamente superando el detector), en cuyo momento ni el complejo ni el no-complejo de la pareja de unión habían migrado todavía superando el detector. Esto ilustra que una pareja de unión de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuada para su uso en el análisis de las proteínas séricas.

Ejemplo 1B Anticuerpo modificado con ácido poli-L-glutámico

60 IgG anti humana de oveja se modificó con ácido poli-L-glutámico (Sigma-Aldrich núm. catálogo P4886, peso molecular 50000-100000 g/mol, 64000 g/mol promedio, determinación basada en la viscosidad y por MALLS) como se describió anteriormente.

65 Después de eso una muestra de suero de sangre humana con un nivel anormal de banda gamma (una muestra de control denominada anormal) a la que se añadió el anticuerpo modificado con poli-L-glutámico (como anteriormente) y una muestra a la que se no se añadió ningún anticuerpo modificado se separaron con CE (como anteriormente). Se

encontró que el anticuerpo modificado fue eficaz en eliminar casi completamente la inmunoglobulina humana anormal en la banda gamma. La última banda de proteína sérica (albúmina) migró completamente en 3 min 15 seg. Después de 4 min se detuvo la separación, en cuyo momento ni el anticuerpo modificado ni el complejo del mismo con inmunoglobulina humana se habían detectado todavía.

5

Ejemplo 1C Anticuerpo modificado con ácido poli--gamma glutámico

IgG anti-humana de oveja se modificó con ácido poli-gamma-glutámico (PGGA) (Natto Biosciences, Montreal, Canadá), con pesos moleculares de 390 kg/mol o 2250kg/mol como describió anteriormente, usando 5 mg de poli(aminoácido) por reacción de modificación.

10

Cada uno de los anticuerpos modificados se añadió a una muestra de control sérica, como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 2 (390 kg/mol) y 3 (2250kg/mol). Las líneas discontinuas representan las muestras tratadas con el anticuerpo modificado, las líneas continuas las muestras sin añadir el anticuerpo modificado. Se puede ver que en cada una de las pruebas que el anticuerpo modificado es eficaz en la eliminación de la inmunoglobulina humana a partir de la banda gamma y que la inmunoglobulina humana se inmunodesplazó así como el anticuerpo modificado migró después de la última banda de proteína sérica (albúmina).

15

Ejemplo 2 Inmunodesplazamiento CE usando un anticuerpo modificado con un polisacárido carboxilado

20

Preparación de la pareja de unión

Se usó el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 1, con la condición de que las cantidades de polímero polianiónico, en este caso dos diferentes carboximetilcelulosas (CMC), se variaron como sigue:

25

De una sal sódica CMC, Pm promedio 90 000 g/mol (Aldrich núm. de producto 419273) se usaron 2, 5 o 10 mg para modificar la IgG anti-humana de oveja.

De una sal sódica CMC, Pm promedio 250 000 g/mol (Aldrich núm. de producto 419303) se usaron 2, 4 o 6 mg.

30

Preparación de las muestras para el inmunodesplazamiento CE

Muestras de suero humano control anormal se prepararon como se describió anteriormente, con o sin pareja de unión.

Electroforesis con inmunodesplazamiento

35

Separaciones CE se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Se encontró que las parejas de unión modificadas con cualquier tipo de CMC fueron eficaces en la unión a inmunoglobulinas en las muestras de suero y causan que las inmunoglobulinas unidas a las parejas de unión migren después de la última banda de proteína sérica (albúmina). Se encontró que la pareja de unión que comprende CMC que tiene un peso molecular promedio de 90 000 g/mol (en conjunto con la inmunoglobulina humana) migró más cerca de la última banda de proteína de suero de la pareja de unión que comprende CMC que tiene un peso molecular promedio de 250 000 g/mol (en conjunto con la inmunoglobulina humana), aunque para ambos tipos de parejas de unión una separación de línea de base entre la pareja de unión (complejo) y la albúmina fue posible.

40

Se encontró, además, que la resolución entre pareja de unión (complejo) y la albúmina fue mayor cuando, la pareja de unión obtenida añadiendo 4, 5, 6 o 10 mg de CMC que para la pareja de unión obtenida añadiendo solamente 2 mg de CMC.

45

Ejemplo 3 Inmunodesplazamiento CE usando un anticuerpo modificado con un copolímero de ácido carboxílico y ácido sulfónico

50

Preparación de la pareja de unión

Dos polímeros poli(ácido 4-estirenosulfónico-ácido-co- maleico) (PSSA-MA) se usaron para modificar el anticuerpo anti-humano. Los PSSA-MA, obtenidos de Sigma-Aldrich, ambos tuvieron un peso molecular promedio de aproximadamente 20 000 g/mol. Una PSSA-MA tuvo una relación molar de ácido sulfónico estireno para ácido maleico de 1: 1 (Aldrich núm. de catálogo 434558), el otro tuvo una relación molar de ácido sulfónico estireno para ácido maleico de 3:1 (Aldrich núm. de catálogo 434566)

55

Se usó el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 1, con la condición de que las cantidades fueron 15 mg o 20 mg, en lugar de 10 mg.

60

Preparación de muestras para el inmunodesplazamiento CE

Muestras de suero humano control anormal se prepararon como se describió anteriormente, con o sin pareja de unión.

65

Electroforesis con inmunodesplazamiento

Separaciones CE se llevaron a cabo como se describió anteriormente.

- 5 Se encontró que las parejas de unión modificadas con cualquier tipo de PSSA-MA fueron eficaces en la unión a inmunoglobulinas en las muestras de suero y causan que las inmunoglobulinas unidas a las parejas de unión migren después de la última banda de proteína sérica (albúmina).

Reivindicaciones

- 5 1. Método para el análisis de una muestra que puede comprender un compuesto objetivo o un grupo de compuestos objetivos, el método que comprende
 - mezclar al menos una porción de la muestra con una pareja de unión para el compuesto objetivo o un grupo de compuestos objetivo, la pareja de unión siendo una macromolécula que comprende (i) un segmento capaz de unirse específicamente al compuesto objetivo y (ii) un segmento de polímero polianiónico; y
 - separar la muestra que contiene la pareja de unión por electroforesis en un canal que comprende un medio de separación en el que la pareja de unión tiene una carga neta negativa.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto objetivo o grupo de compuestos objetivo se selecciona a partir del grupo de las proteínas séricas, particularmente del grupo de inmunoglobulinas, macroglobulinas y microglobulinas séricas.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el segmento polianiónico se selecciona a partir del grupo de poli(aminoácidos) polianiónicos, poli(ácidos carboxílicos), poli(ácidos sulfónicos), polinucleótidos, polisacáridos carboxilados, polisacáridos sulfatados y polisacáridos fosforilados incluyendo copolímeros de los mismos.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el segmento polianiónico se selecciona a partir del grupo de polilisinas de las cuales el 90-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, poliargininas de las cuales el 90-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, polihistidinas de las cuales el 90-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, poliasparaginas, de las cuales el 90-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, poliglutaminas de las cuales el 90-100 % de los grupos laterales de amina se transformaron en grupos laterales aniónicos, ácidos poliglutámicos, ácidos poliaspárticos, carboxialquilcelulosas, heparinas, dextranos sulfatados, ácidos hialurónicos, ácidos polisulfónicos, ácidos polimaleicos y ácidos poliacrílicos, incluyendo copolímeros de los mismos.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el segmento polianiónico se selecciona a partir del grupo de polilisinas de la cual el 90-100 % de los grupos laterales de amina se modificaron con un ácido policarboxílico o anhídrido del mismo.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el segmento de polímero polianiónico tiene un peso molecular promedio numérico de al menos 20 kD.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segmento de polímero polianiónico tiene un peso molecular promedio numérico de al menos 40 kD.
- 40 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el segmento de polímero polianiónico tiene un peso molecular promedio numérico de al menos 50 kD.
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el segmento capaz de unirse específicamente al compuesto objetivo es un anticuerpo, que tiene especificidad antigénica para el compuesto objetivo.
- 50 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la separación de la muestra se lleva a cabo usando un tampón que tiene un pH en el intervalo de pH 8.0 a 11.0.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, donde la separación de la muestra se llevó a cabo utilizando un tampón que tiene un pH en el intervalo de pH 9.0 a 10.7.
- 60 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la separación de la muestra se lleva a cabo usando un tampón que tiene un pH en el intervalo de 9.5 - 10.5.
- 65 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde además una porción de la muestra se analiza usando electroforesis sin mezclarse con la parte de unión de cualquier otra forma bajo las mismas condiciones, y comparar un resultado del análisis de dicha porción con un resultado del análisis de la porción que se analizó después de mezclar con la pareja de unión.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el análisis comprende la determinación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de un compuesto seleccionado a partir del grupo de las proteínas séricas, particularmente un compuesto seleccionado a partir del grupo de las inmunoglobulinas, microglobulinas, macroglobulinas; transferrinas, que incluyen transferrinas deficientes de carbohidratos.

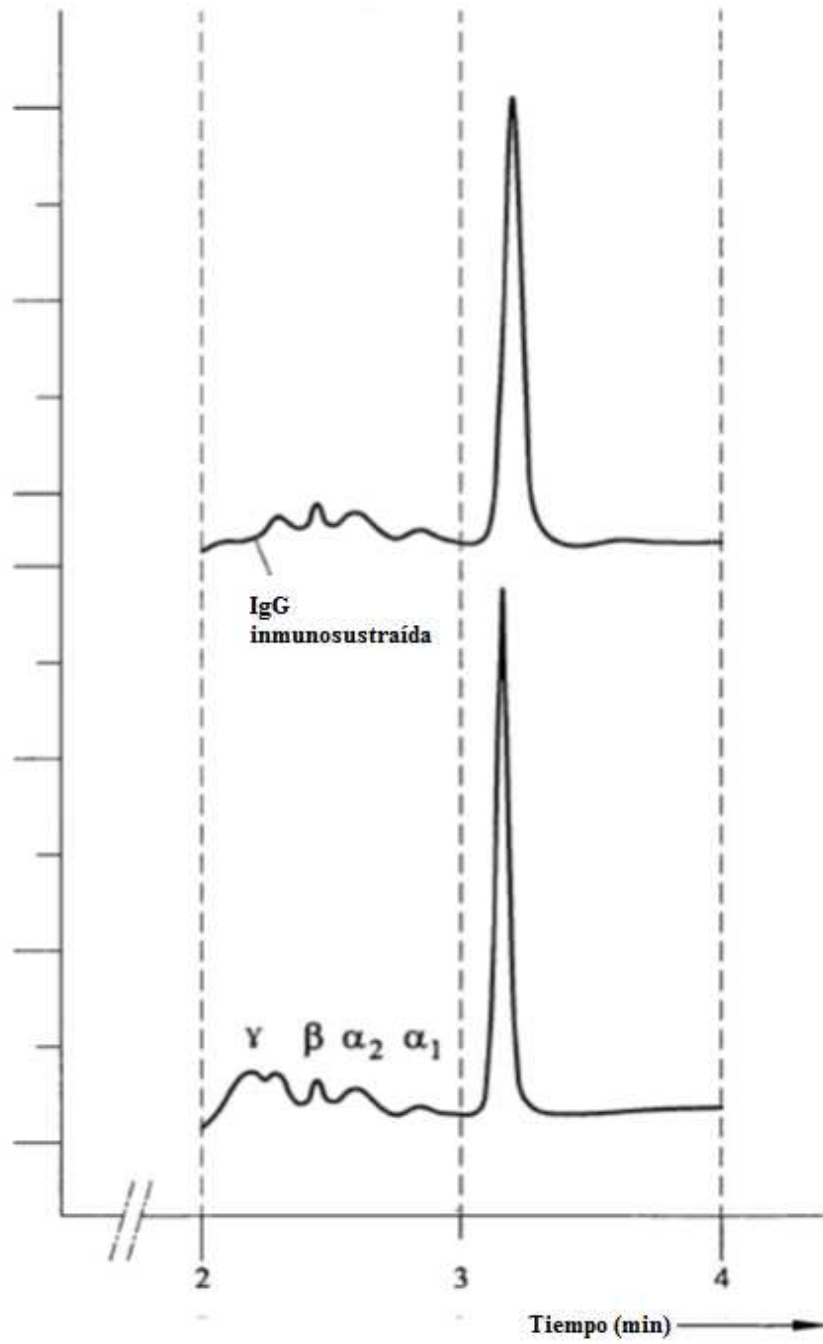


Fig. 1

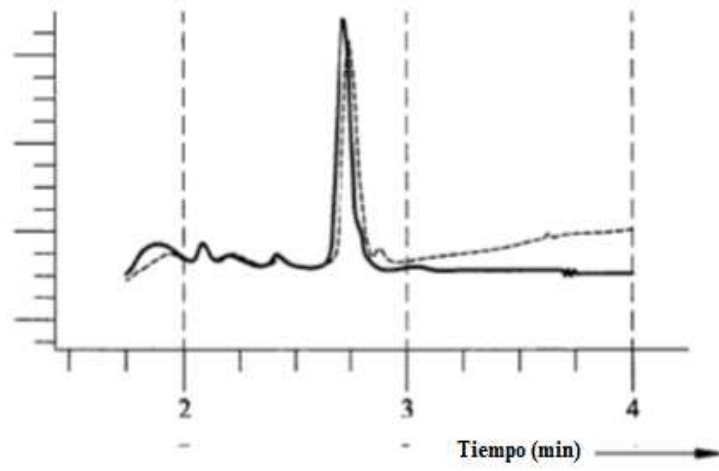


Fig. 2

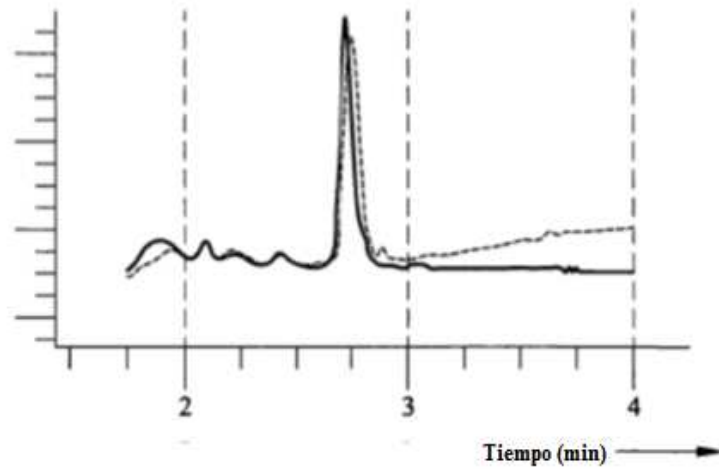


Fig. 3