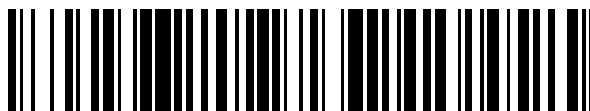


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 713**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2011** **PCT/GB2011/051353**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012** **WO12010881**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2011** **E 11738269 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017** **EP 2596367**

54 Título: **Ensayo de competición**

30 Prioridad:

19.07.2010 GB 201012049

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

06.03.2018

73 Titular/es:

THE BINDING SITE GROUP LIMITED (100.0%)
8 Calthorpe Road, Edgbaston
Birmingham, West Midlands B15 1QT, GB

72 Inventor/es:

CARR SMITH, HUGH;
MEAD, GRAHAM y
BRADWELL, ARTHUR RANDALL

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 657 713 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

Ensayo de competición

- 5 La invención se refiere a ensayos turbidimétricos y nefelométricos mejorados para cadenas ligeras libres en suero (CLLs) y kits para dichos ensayos.

Se han usado ensayos nefelométricos durante varios años para ensayar con respecto a CLLs. Se usan para diagnosticar y supervisar gammapatías monoclonales tales como mieloma múltiple de cadena ligera.

- 10 El término nefelometría se usa para describir la medición de dispersión de la luz por una sustancia, habitualmente en suspensión. La luz dispersada se mide usando un detector colocado en un ángulo en relación con el haz de luz incidente. La turbidimetría es la medición de la cantidad de luz perdida por dispersión de un haz de luz incidente a medida que pasa a través de una sustancia. En este caso, la pérdida de intensidad del haz incidente se mide usando un detector de luz directamente en la ruta de la luz a medida que surge de la muestra. Ambos de estos métodos fotométricos producen resultados similares y el siguiente análisis puede aplicarse igualmente a cualquiera de ellos.

- 20 Los inmunoensayos se basan en la medición de la relación entre una proteína (antígeno) y un anticuerpo específico de esa proteína. Un anticuerpo es capaz de unirse con dos partículas antigénicas y un antígeno puede unirse con más de un anticuerpo, lo que permite que se formen complejos inmunitarios grandes de anticuerpo/antígeno entrecruzados. Un inmunoensayo nefelométrico/turbidimétrico es un ensayo de fase líquida en el que se mezcla una solución de antígeno (habitualmente en forma de suero, plasma u orina) con una solución de anticuerpo. A medida que se produce la reacción, los complejos inmunitarios se hacen progresivamente menos solubles y con el tiempo se separan de la solución por precipitado. Las partículas precipitadas dispersan luz mucho más eficazmente que las moléculas proteicas separadas lo que conduce a un aumento tanto de la turbidez como de la dispersión de la luz. En general, suponiendo una concentración fija de anticuerpo (en exceso), una concentración mayor de antígeno en la mezcla de reacción conduce a un mayor aumento de la luz dispersada, lo que forma la base de un ensayo cuantitativo.

- 30 Los inmunoensayos nefelométricos/turbidimétricos típicos tienen un límite de sensibilidad de aproximadamente 100 mg/l. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse mediante el uso de potenciación de látex. Se unen moléculas de anticuerpo a partículas tales como esferas de poliestireno que tienen un diámetro de aproximadamente cientos de nanómetros. Estas partículas son más eficaces en la dispersión de la luz y progresivamente se hacen más eficaces a medida que los anticuerpos unidos reaccionan con sus antígenos. El uso de estas partículas puede conducir a un aumento de 10 a 100 veces en la sensibilidad de los ensayos nefelométricos/turbidimétricos.

- 40 Las moléculas de anticuerpo (también conocidas como inmunoglobulinas) tienen una simetría doble y están compuestas de dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, que contienen cada una dominios variables y constantes. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se combinan para formar un sitio de unión a antígeno, de modo que ambas cadenas contribuyen a la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo. La estructura tetramérica básica de los anticuerpos comprende dos cadenas pesadas unidas covalentemente por un enlace disulfuro. Cada cadena pesada se une a su vez con una cadena ligera, de nuevo mediante un enlace disulfuro. Esto produce una molécula sustancialmente en forma de "Y".

- 45 Las cadenas pesadas son las mayores de los dos tipos de cadenas halladas en los anticuerpos, con una masa molecular típica de 50.000-77.000 Da, en comparación con la cadena ligera más pequeña (~25.000 Da).

- 50 Hay cinco clases principales de cadena pesada que son γ , α , μ , δ y ϵ que son las cadenas pesadas constituyentes para: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE respectivamente. IgG es la inmunoglobulina principal del suero humano normal, representando 70-75 % del grupo de inmunoglobulinas total. Este es el anticuerpo principal de respuestas inmunitarias secundarias. Forma un único tetrámero de dos cadenas pesadas más dos cadenas ligeras.

- 55 IgM representa aproximadamente el 10 % del grupo de inmunoglobulinas. Las moléculas, junto con cadenas J, forman un pentámero de cinco de las estructuras de 4 cadenas básicas. Las cadenas pesadas individuales tienen un peso molecular de aproximadamente 65.000 y la molécula completa tiene un peso molecular de aproximadamente 970.000. IgM está en su mayoría restringida al grupo intravascular y es el anticuerpo temprano predominante. IgA representa 15-20 % del grupo de inmunoglobulina en suero humano. Más del 80 % de IgA aparece como un monómero. Sin embargo, algo de la IgA (IgA secretora) existe como una forma dimérica.

- 60 IgD representa menos del 1 % de la inmunoglobulina en plasma total.

- IgE, aunque es escasa en suero normal, se encuentra en la membrana de superficie de basófilos y mastocitos. Está asociada con afecciones alérgicas tales como asma y fiebre del heno.

- 65 Además de las cinco clases principales, hay cuatro subclases para IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Adicionalmente

hay dos subclases para IgA (IgA1 e IgA2).

Hay dos tipos de cadena ligera: lambda y kappa. Hay aproximadamente el doble de moléculas kappa que de lambda producidas en seres humanos, pero esto es bastante diferente en algunos mamíferos. Cada cadena contiene aproximadamente 220 aminoácidos en una única cadena polipeptídica que se pliega en un dominio constante y uno variable. Las células plasmáticas producen uno de los cinco tipos de cadena pesada junto con moléculas kappa o lambda. Hay normalmente aproximadamente el 40 % de exceso de producción de cadena ligera libre sobre síntesis de cadena pesada. Cuando las moléculas de cadena ligera no están unidas a moléculas de cadena pesada, se conocen como "moléculas de cadena ligera libres (CLL)". Las cadenas ligeras kappa se encuentran habitualmente como monómeros. Las cadenas ligera lambda tienden a formar dímeros.

Se han producido ensayos nefelométricos para CLL. Dichos ensayos usan anticuerpos anti CLL. Están disponibles en el mercado, por ejemplo con la marca comercial "Freelite" de The Binding Site, Birmingham, Reino Unido.

También se conocen en la técnica anticuerpos que son específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera. Véase por ejemplo el documento WO 2006079816, y comercializado con la marca comercial "Hevylite" de The Binding Site.

Como consecuencia del amplio intervalo de concentraciones de CLLs (cadena ligera libre en suero) que pueden encontrarse, la naturaleza variable de las proteínas monoclonales y el número limitado de epítomos específicos que pueden estar disponibles para unión a anticuerpos, los ensayos tienen ciertos defectos analíticos:

Abraham R. S. *et al* (Clin. Chem. (2002) 48: 10, 1805-1811) presentan la presencia de complejos quiméricos de cadenas ligeras libres λ que afectan a la medición nefelométrica. Daval S. *et al* (Clin. Chem. (2007) 53 (11) 1985-1986) analizan la identificación de lecturas de CLLs falsamente lentas de pacientes con altas concentraciones de CLLs determinadas mediante nefelometría. Los autores de ese artículo recomiendan llevar a cabo una dilución de las muestras para asegurar que el exceso de antígeno no tenga un efecto en la determinación de CLLs en las muestras.

Briand P-Y. *et al* (Clin. Chem Lab Med (2010) 48(1)) revisaron el ensayo basado en nefelometría "Freelite" (The Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido). Este se considera una herramienta valiosa para medir CLLs, pero los autores destacaron varias limitaciones del sistema de ensayo. Están incluyendo la sobreestimación de algunas muestras por nefelometría. Los autores del artículo recomendaron volver a procesar algunas muestras a diferentes diluciones para mejorar la capacidad de reproducción del ensayo.

Tate J. *et al* (Clin. Biochem. Rev. (2009) 30, 131-140 y Clin. Chem Acta (2007) 376, 30-36 plantearon asuntos similares en un número pequeño de casos.

de Kat Angelino C. M. *et al* Clin. Chem (2010) 56:7 analizan la sobreestimación de concentraciones de cadena ligera libre en suero κ (CLLs- κ) por inmunonefelometría. Los autores observaron una sobreestimación de CLLs- κ en un paciente con mieloma de cadena ligera κ usando nefelometría. Los autores compararon después ensayos nefelométricos con un ensayo basado en ELISA para CLLs. Los autores observaron que concentraciones mayores de CLLs- κ tuvieron precisión reducida cuando se midieron por nefelometría. El ELISA produjo estimaciones de la concentración de CLLs- κ más cercanas a las indicadas por la medición densitométrica de geles de electroforesis de proteína en suero. Los autores del artículo especularon que CLLs- κ puede polimerizar espontáneamente lo que influye en la cuantificación nefelométrica de las CLLs- κ . Los autores recomiendan usar ELISA para cuantificar CLLs.

El solicitante cree que el ensayo de CLLs produce varios problemas, no asociados normalmente con ensayos nefelométricos de proteínas.

Las CLL son proteínas relativamente pequeñas de aproximadamente 220 aminoácidos cada una, que presentan problemas no asociados con frecuencia con proteínas mayores. Existen como formas lambda y kappa.

Los anticuerpos usados en sistemas comerciales para detectar CLLs se unen con sitios antigénicos que normalmente están ocultos cuando la cadena ligera se une con cadenas pesadas en anticuerpos intactos. Se cree que hay relativamente pocos sitios de unión a anticuerpo (epítomos) en las moléculas pequeñas. Se cree que esto hace a las CLLs más susceptibles a exceso antigénico y falta de uniformidad en la determinación de las concentraciones.

Además, la formación de multímeros de CLLs, tales como CLLs- κ también plantea dificultades para el sistema nefelométrico usado para ensayar las CLLs. La presencia de CLLs- κ poliméricas en muestras puede aumentar la tasa de formación de complejo inmunitario (durante el ensayo) y conducir a una sobreestimación de las concentraciones de CLLs en comparación con calibradores no polimerizados.

Los ensayos que usan anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera también tienen probabilidades de padecer dificultades similares. También se sabe que IgA monoclonal forma polímeros. También se

crea que los sitios antigénicos con los que se unen los anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera están en una región limitada de las inmunoglobulinas y probablemente sean relativamente pocos, conduciendo de este modo a problemas similares a los ensayos de CLLs.

5 Existe por lo tanto la necesidad de mejorar la uniformidad y precisión de ensayos nefelométricos para CLLs para medir inmunoglobulinas de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera por ejemplo a concentraciones mayores de CLLs o inmunoglobulina intacta en la muestra.

10 El solicitante se dio cuenta de que los inmunoensayos nefelométricos y turbidimétricos podrían mejorarse produciendo un ensayo de tipo competición que implica una cantidad conocida de cadena ligera libre. La necesidad de cantidades controladas de CLL o inmunoglobulina intacta (en un ensayo competitivo) aumenta el coste y la complejidad de la producción; sin embargo, los solicitantes consideran que los beneficios ofrecidos para medición de CLL justificarían estos costes.

15 En consecuencia, la invención proporciona un método para detectar cadenas ligeras libres (CLL) o inmunoglobulinas intactas en una muestra que comprende incubar la muestra con anticuerpo anti CLL, o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de dichos anticuerpos, y una cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina intacta y detectar la unión del anticuerpo con la cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina.

20 El método comprende las etapas de:

(i) mezclar la muestra de suero con anticuerpo anti CLL, o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o un fragmento de los mismos;

25 (ii) incubar la muestra de suero con anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de los mismos para formar una mezcla incubada;

30 (iii) medir la absorbancia óptica o dispersión de una fuente de luz, de la mezcla incubada para producir una lectura de control (o "línea basal");

(iv) mezclar una cantidad predeterminada de partículas recubiertas con una cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina intacta, con la mezcla incubada;

35 (v) medir la formación de complejos de las partículas recubiertas con el anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de los mismos; y

(vi) comparar la formación de los complejos con una curva de calibración predeterminada de formación de complejo con concentraciones conocidas de CLL o inmunoglobulina intacta.

40 El método es un ensayo de aglutinación, por ejemplo ensayo nefelométrico o turbidimétrico.

El anticuerpo anti CLL o fragmento es uno que es específico para unión a cadena ligera libre, por ejemplo cadena ligera libre lambda o cadena ligera libre kappa.

45 Los anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera o fragmentos pueden ser específicos de IgA, IgG, IgM, IgD o IgE (típicamente específicos de IgA), y adicionalmente específicos de tipo lambda o kappa. Los anticuerpos también pueden ser específicos de subclase, por ejemplo anti-IgA (IgA1 e IgA2) y anti-IgG (tales como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

50 Esto permite, por ejemplo, observar IgG_k e IgG_λ o IgA_k e IgA_λ anómalas.

Los fragmentos pueden ser Fab, Fab' o F(ab')².

55 La muestra se mezcla con anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera para formar la mezcla incubada durante un tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo se una con cadenas ligeras libres o inmunoglobulinas intactas dentro de la muestra. Típicamente este será aproximadamente 5 minutos. La lectura óptica tomada al final de este tiempo se usa como una lectura patrón para eliminar los efectos de cualquier complejo que se forme entre la cadena ligera libre en la muestra y el anticuerpo. La lectura óptica puede ser la absorbancia óptica o dispersión de luz de una fuente de luz.

60 La formación de complejos de las partículas recubiertas con el anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera puede determinarse, por ejemplo, midiendo la absorbancia óptica o la dispersión de una fuente de luz. La formación del complejo entre las partículas recubiertas y el anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera típicamente se predetermina y se sigue a lo largo del tiempo y se compara con una curva de calibración. Una curva de calibración se predetermina típicamente y se construye midiendo muestras de suero con concentraciones de CLL o inmunoglobulina intacta

conocidas. La mayor dispersión de la luz o absorción se produce cuando no hay CLL o inmunoglobulina intacta en la muestra de suero, debido a que todo el anticuerpo está entonces disponible para reaccionar con las partículas recubiertas. Típicamente las partículas se recubren con CLL policlinal.

Los anticuerpos anti CLL y anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera son típicamente anticuerpos policlonales por ejemplo del tipo disponible en el mercado con las marcas comerciales "Freelite" y "Hevylite", disponibles del Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido. Se analizan métodos para inducir dichos anticuerpos en general en los documentos WO 97/17372 y WO 2006079816. También podrían usarse anticuerpos monoclonales.

La muestra es preferentemente una muestra de sangre, orina, más típicamente suero o plasma.

La partícula puede ser cualquier partícula orgánica o inorgánica adecuada para usar con el método de la invención, por ejemplo el material inorgánico puede ser carbono, sílice, oro u óxido de hierro. El material orgánico puede ser polimérico, por ejemplo poliestireno, cloruro de polivinilo, cloruro de polivinilideno, una o más resinas epoxi u otros polímeros conocidos en la técnica y copolímeros de los mismos. El uso de esferas de poliestireno también se conoce como "potenciación de látex". Típicamente las partículas tienen tamaños de 30 – 600 nm.

Los principios de ensayos de nefelometría y turbidimetría se conocen en general en la técnica.

La CLL policlinal será habitualmente CLL intacta. Sin embargo, también se pretende que este término incluya la posibilidad de utilizar fragmentos de CLL, siempre que sean aún antigénicos para el anticuerpo anti CLL.

La cantidad conocida de inmunoglobulina intacta (es decir que tenga cadenas ligeras unidas a cadenas pesadas) es típicamente una clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera predeterminada, por ejemplo, IgGκ, IgGλ, IgAκ o IgAλ, para la que es específico el anticuerpo. También pueden usarse fragmentos de las inmunoglobulinas, siempre que conserven epítomos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera para los anticuerpos, o fragmentos, con los que se unen específicamente. La inmunoglobulina intacta es típicamente policlinal.

En general se evitan los ensayos competitivos debido a los costes adicionales de producir lotes uniformes de antígeno unido a partículas. Esto evita con frecuencia el uso comercial de formatos competitivos. Esto significa que, como se analiza en Angelino (véase anteriormente), los problemas con el exceso de antígeno habitualmente se superarán por dilución de las muestras de suero o como alternativa usando ensayos de tipo ELISA. El desarrollo de ensayos nefelométricos/turbidimétricos permite que las mediciones se realicen en analizadores de laboratorio completamente automáticos, junto con otras mediciones de inmunoglobulina.

Los solicitantes se han dado cuenta de que las diferencias observadas en la cinética de reacción vistas entre diferentes CLL monoclonales pueden deberse a diferencias en el número y accesibilidad de los epítomos presentes. El uso de un formato de competición con preincubación de la muestra y anticuerpo supera algunas de estas diferencias y proporciona uniformidad de medición. La polimerización de CLL, tal como CLL kappa, acelera en gran medida la cinética de reacción de la unión de anti CLL y conduce a exceso de lectura de la concentración. Un ensayo de competición del tipo descrito anteriormente supera cualquier lectura excesiva debida a la polimerización de la CLL.

Los ensayos de CLL tienen un riesgo particular de problemas de exceso de antígeno, en comparación con ensayos para otros antígenos debido al enorme intervalo de concentraciones hallado en muestras clínicas y el número limitado de epítomos presentes en algunas CLL monoclonales. El ensayo de competición descrito anteriormente elimina la posibilidad de exceso de antígeno.

Dichas ventajas también se aplican a los ensayos de clase de cadena pesada-cadena ligera.

Este ensayo mejorado permite la detección mejorada de CLL monoclonal o inmunoglobulinas intactas de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, usando al mismo tiempo aún dispositivos nefelométricos y turbidimétricos existentes.

Los inventores también han identificado un método para aumentar la disponibilidad de los epítomos específicos de CLL de la CLL unida a las partículas recubiertas. Dichos epítomos normalmente están ocultos cuando las cadenas ligeras están unidas a cadenas pesadas.

Uniendo un enlazador con cadenas ligeras unidas a cadenas pesadas y eliminando después las cadenas pesadas para exponer los epítomos específicos de CLL, es posible unir la cadena ligera separada con la partícula en la parte de la cadena ligera expuesta al enlazador en el tetrámero de cadena ligera-cadena pesada intacto. Esto deja los epítomos específicos de CLL disponibles para la unión a anticuerpo una vez que se han disociado las cadenas ligeras y las cadenas pesadas.

La descripción desvela un método para unir una cadena ligera libre a un sustrato, tal como una partícula, que

comprende:

(i) unir un resto enlazador con cadenas ligeras unidas a cadenas pesadas

5 (ii) disociar y separar las cadenas pesadas y cadenas ligeras que comprenden el resto enlazador y

(iii) aislar cadenas ligeras unidas al sustrato.

10 Las cadenas ligeras pueden unirse directamente al sustrato antes de su disociación, por ejemplo si el enlazador ya está unido al sustrato, o unirse indirectamente. Por ejemplo, el resto enlazador puede unirse mediante un resto de unión separado proporcionado en el sustrato que se une con el resto enlazador.

La invención se describirá ahora solamente como ejemplo en referencia a las siguientes Figuras:

15 La Figura 1 es una representación esquemática de anticuerpos que se unen con antígeno unido a látex.

La Figura 2 muestra la adición de cantidades pequeñas de antígeno.

20 La Figura 3 muestra la adición de cantidades grandes de antígeno.

La Figura 4 muestra una curva de calibración para CLL kappa libre usando CLL kappa unida a partículas.

La Figura 5 muestra una curva de calibración para CLL lambda libre usando CLL lambda unida a partículas.

25 La Figura 6 muestra un ejemplo de curva de calibración para CLL kappa usada para determinar valores de CLL kappa, en muestras de suero, para una correlación con ensayos de la técnica anterior que no usan la kappa basada en partícula.

30 La Figura 7 muestra una representación de regresión lineal para CLL kappa que compara el método frente a la técnica anterior.

La Figura 8 muestra un ejemplo de curva de calibración para CLL lambda usada para determinar valores de CLL lambda, en muestras de suero, para una correlación con ensayos de la técnica anterior que no usan la lambda basada en partículas.

35 La Figura 9 muestra una representación de regresión lineal para CLL lambda que compara el método frente a la técnica anterior.

40 Inmunoensayo de inhibición turbidimétrica potenciado por partículas de cadena ligera libre

Composición y fabricación de reactivos

Reactivo R1

45 Este tampón, denominado "tampón de reacción", consiste en PBS (solución salina tamponada con fosfato) 100 mM. Está presente en este tampón anticuerpo F(ab)2 ("Freelite" de The Binding Site Group Limited, Birmingham, Reino Unido), a un título típico de menos de 50 mg/l. Puede usarse un acelerante. El acelerante es polivinilpirrolidona a menos de 2 % p/p. También puede usarse Tris 25 mM como un tampón. También puede usarse anticuerpo completo.

Reactivo R2

55 Este puede consistir en un antígeno unido a partículas de clorometilpoliestireno de un tamaño dado, bloqueado con la presencia de un detergente, tal como Tween 20 (polisorbato 20). Se suspenden perlas de clorometilo ("látex") en el tampón de acoplamiento, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 25 mM, y a este se añade una cantidad especificada de antígeno, con la mezcla resultante incubada durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, esta se centrifuga durante 20 minutos a 8.000 rpm, el sobrenadante se descarta y las perlas se resuspenden por ultrasonidos en el tampón de bloqueo, que consiste en GBS (solución salina tamponada con glicina) 0,1 M que contiene una cantidad determinada de Tween20. Después se repite la etapa de centrifuga y las perlas se resuspenden en tampón de bloqueo nuevo. El reactivo se diluye después en una dilución determinada para proporcionar el reactivo de trabajo.

65 Un modo alternativo de producirlos es usar perlas de látex modificadas con carboxilo de un tamaño dado que se unen covalentemente con estreptavidina mediante la carbodiimida EDAC en MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 25 mM y se bloquean con la adición de albúmina de suero bovino. Las perlas se lavan después en GBS (solución salina tamponada con glicina) 0,1 M por centrifugación. El antígeno biotinilado (biotinilado

a diversas relaciones de proteína:biotina) se usa después para recubrir las perlas y cualquier sitio de estreptavidina no unido restante se inactiva con la adicción de biotina libre. Las perlas se lavan después en GBS 0,1 M y se diluyen con agua para proporcionar un reactivo de trabajo con contenido de sólidos de perlas de látex típicos de 0,133 % (g/100 g). Los resultados descritos a continuación usan reactivo preparado por este proceso.

Principio de ensayo y secuencia de reacción

El reactivo R1 entra en una cubeta de reacción y se mezcla con la muestra. Hay un periodo de incubación antes de la adición del reactivo R2 y este se ha denominado “prerreacción”. Durante esta prerreacción, cualquier antígeno presente en la muestra es capaz de reaccionar con el anticuerpo F(ab)₂ y formar complejos inmunitarios. Debido a la escasez del antígeno, se forman complejos inmunitarios pequeños que no se detectan por instrumentación convencional que usa una longitud de onda incapaz de detectar complejos de este tamaño. La adición del reactivo R2 significa que cualquier anticuerpo restante se usa para reticular con la perla de poliestireno y formar complejos suficientemente grandes para detectar a la longitud de onda utilizada. Por lo tanto, cuando más antígeno esté presente en la muestra, menos señal se generará, lo que significa que el cambio de la señal es inversamente proporcional a la presencia de antígeno. Este concepto está representado esquemáticamente en los siguientes diagramas:

Figura 1. No hay ningún antígeno presente en la muestra y todo el anticuerpo se usa para reticular con el antígeno unido a látex, dando como resultado una cantidad de señal alta.

Figura 2. La adición de cantidades pequeñas de antígeno en la muestra significa que el anticuerpo está “cubierto” en la primera reacción y es incapaz de reticular con la perla, reduciendo la cantidad de señal generada.

Figura 3. La adición de grandes cantidades de antígeno en la muestra provoca que todo el anticuerpo se cubra en la primera reacción. No queda ningún anticuerpo que sea capaz de provocar reticulación de la perla, y no se produce ningún cambio en la señal.

La Figura 4 muestra una curva de calibración para CLL kappa usando CLL kappa unida a partículas. Los datos de precisión a continuación muestran la reproducibilidad del ensayo a intervalo alto y bajo.

	Nivel bajo	Nivel alto
1	0,743	9,211
2	0,728	9,401
3	1,051	10,042
4	1,212	10,059
5	0,617	9,939
6	0,836	10,048
7	0,680	10,321
8	0,740	9,726
9	0,877	9,496
10	0,597	9,822
DT	0,19	0,35
Media (mg/l)	0,81	9,81
CV	24,07 %	3,54 %

La Figura 5 muestra una curva de calibración para CLL lambda usando CLL lambda unida a partículas lambda. Los datos de precisión para el ensayo se muestran a continuación.

	Nivel bajo	Nivel alto
1	0,58	7,30
2	0,57	6,99
3	0,76	7,63
4	0,71	7,02
5	0,54	6,99
6	0,53	7,01
7	0,57	7,54
8	0,68	7,08
9	0,54	7,04
DT	0,08	0,25
Media (mg/l)	0,61	7,18
CV	13,95 %	3,49 %

Las Figuras 6 y 8 muestran curvas de calibración que se han usado para determinar los valores de CLL kappa y

- 5 lambda respectivamente, para las mismas muestras de suero, para mostrar correlación con ensayos de la técnica anterior. Aunque los calibradores no se han asignado completamente, los valores corresponden muy bien con valores determinados usando ensayos de la técnica anterior (R^2 de kappa = 0,66, R^2 de lambda = 0,78). Figuras 7 y 9. Los valores de R^2 altos muestran que se está analizando el mismo parámetro y al considerar las correlaciones de CLL tanto kappa como lambda juntas indica tanto una buena sensibilidad como una buena especificidad para el método de ensayo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar cadenas ligeras libres (CLL) o inmunoglobulinas intactas en una muestra que comprende incubar la muestra con el anticuerpo anti CLL, o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de dichos anticuerpos, y una cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina intacta y detectar la unión del anticuerpo con la cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina, **caracterizado por que** el método comprende las etapas de:
 - (i) mezclar la muestra de suero con anticuerpo anti CLL, o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o un fragmento de los mismos;
 - (ii) incubar la muestra de suero con el anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de los mismos para formar una mezcla incubada;
 - (iii) medir la absorbancia óptica o dispersión de una fuente de luz, de la mezcla incubada para producir una lectura de control;
 - (iv) mezclar una cantidad predeterminada de partículas recubiertas con una cantidad conocida de CLL o inmunoglobulina intacta, con la mezcla incubada;
 - (v) medir la formación de complejos de las partículas recubiertas con el anticuerpo anti CLL o anticuerpos específicos de clase de cadena pesada-tipo de cadena ligera, o fragmentos de los mismos; y
 - (vi) comparar la formación de los complejos con una curva de calibración predeterminada de formación de complejo con concentraciones conocidas de CLL o inmunoglobulina intacta.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las partículas son micropartículas de poliestireno.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las partículas se recubren con CLL policlonal.
4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, que es un ensayo nefelométrico o turbidimétrico.
5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona de Fab, Fab' o F(ab')₂, que es capaz de unirse específicamente con CLL.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de unirse específicamente con CLL λ o κ .
7. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 6, en el que las partículas se recubren con CLL y las partículas recubiertas con CLL pueden obtenerse mediante (i) unión de un resto enlazador a cadenas ligeras y cadenas pesadas, (ii) disociación de las cadenas ligeras y cadenas pesadas y (iii) aislamiento de CLL unida a las partículas mediante el resto enlazador, preferentemente en el que el resto enlazador comprende biotina.

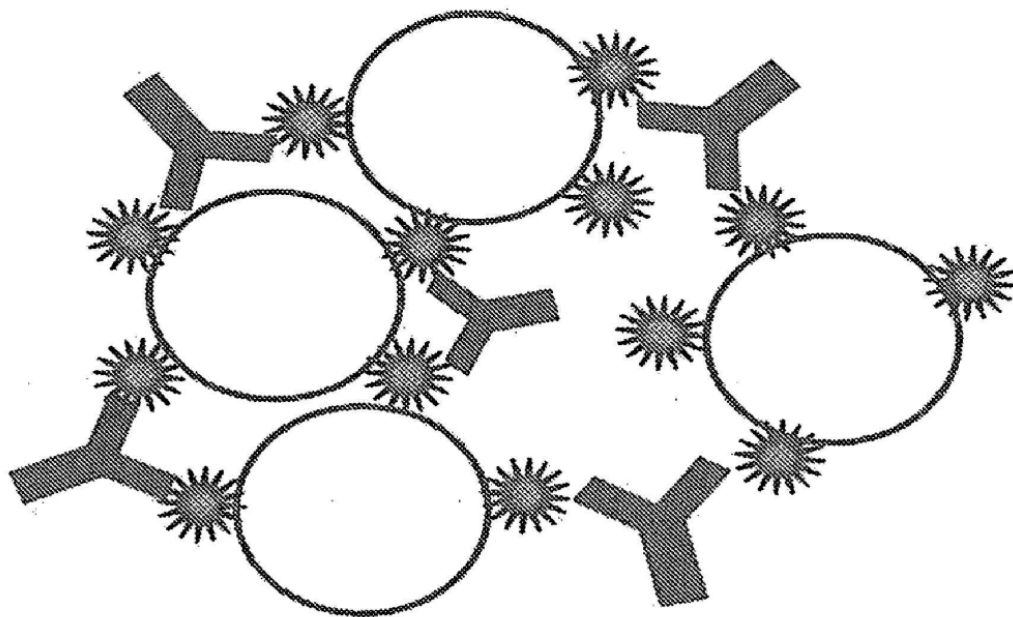


Figura 1

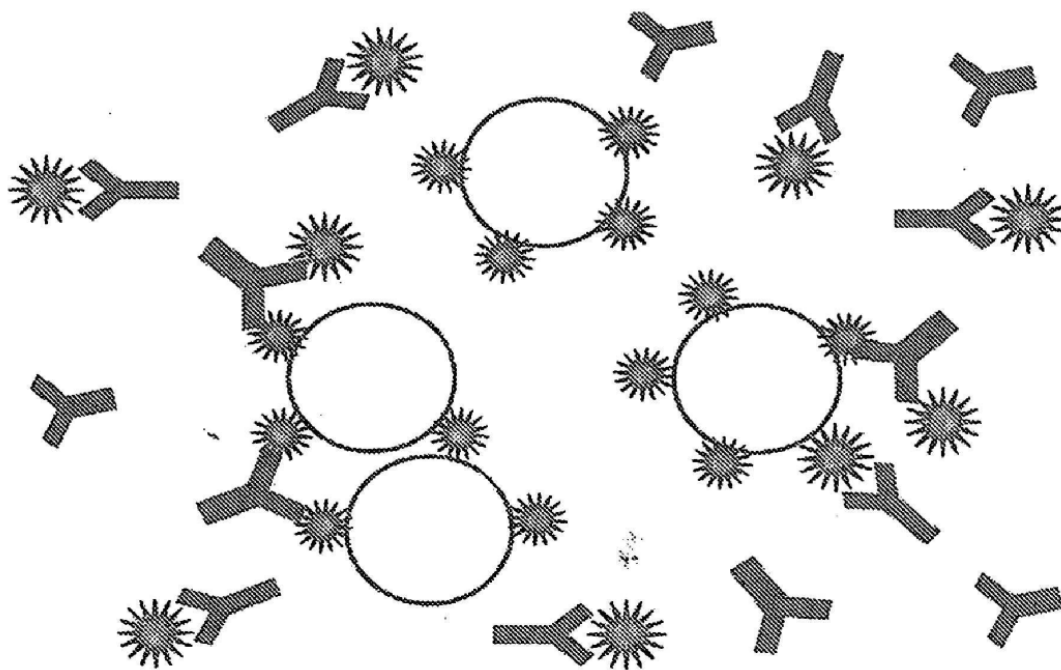


Figura 2

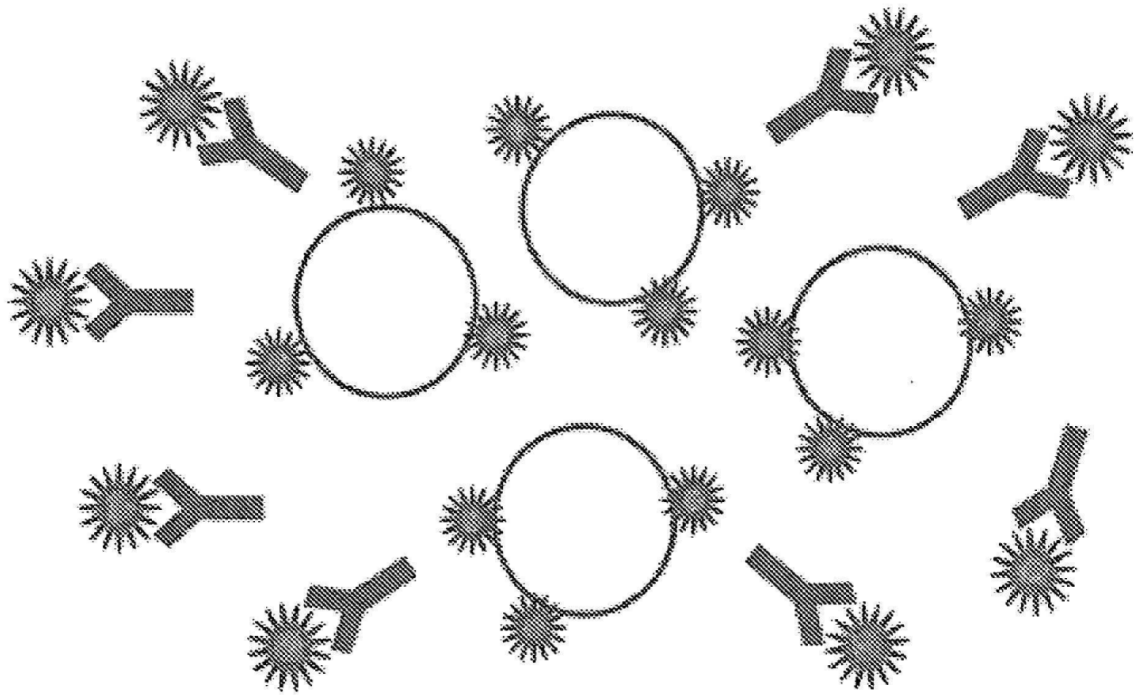


Figura 3

Figura 4

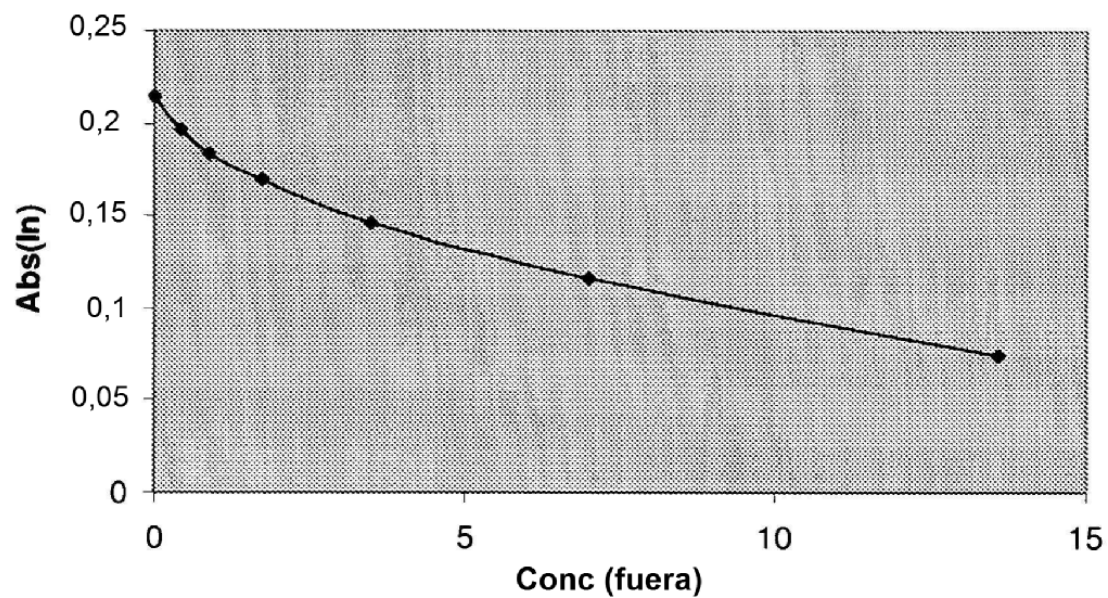
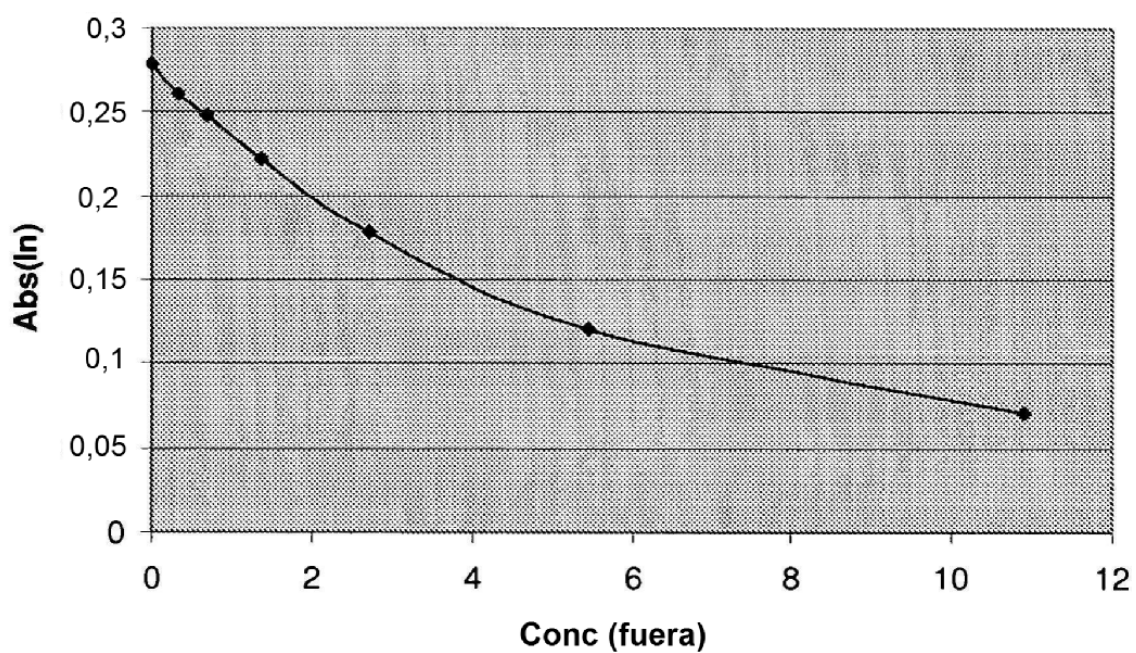


Figura 5



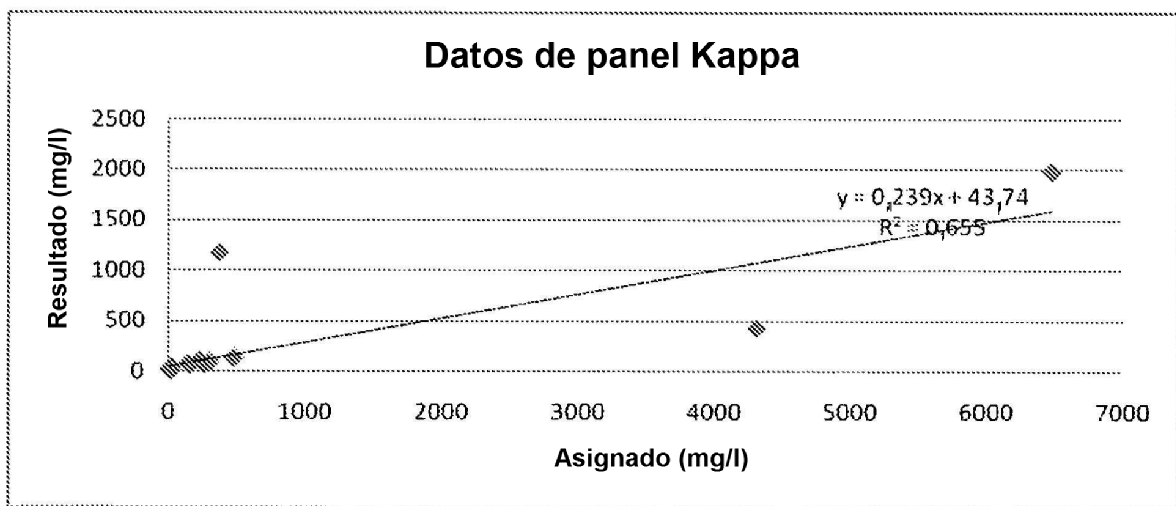
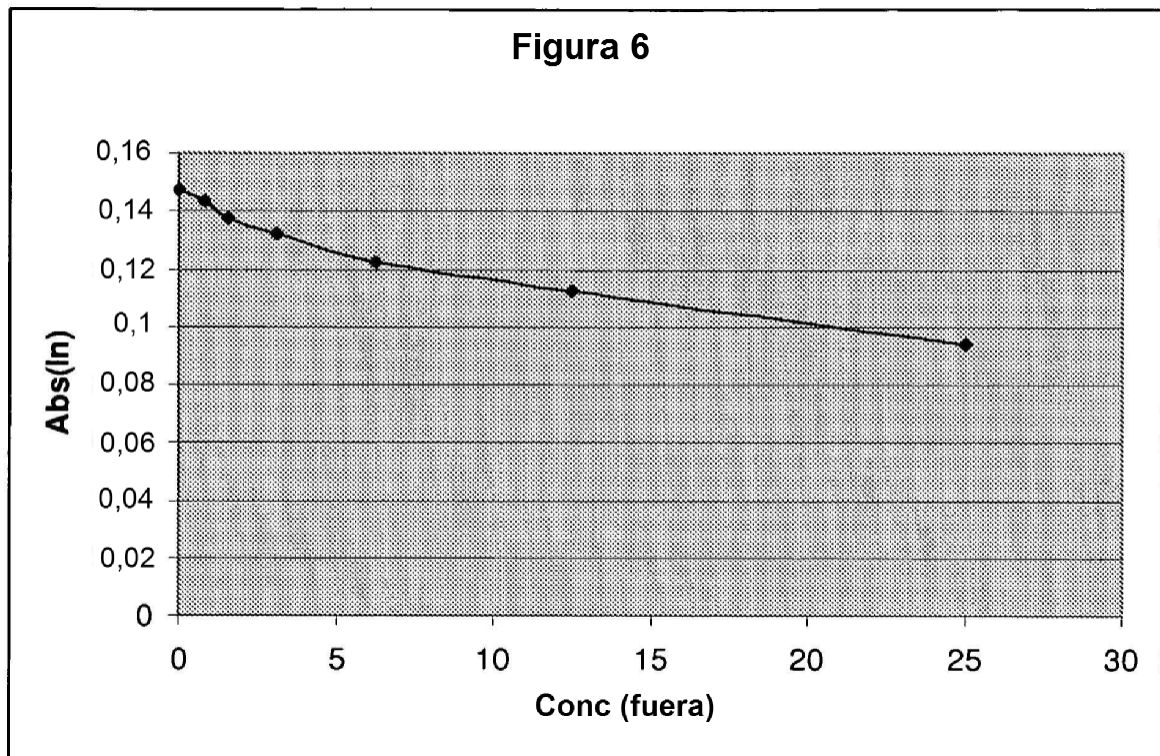


Figura 7

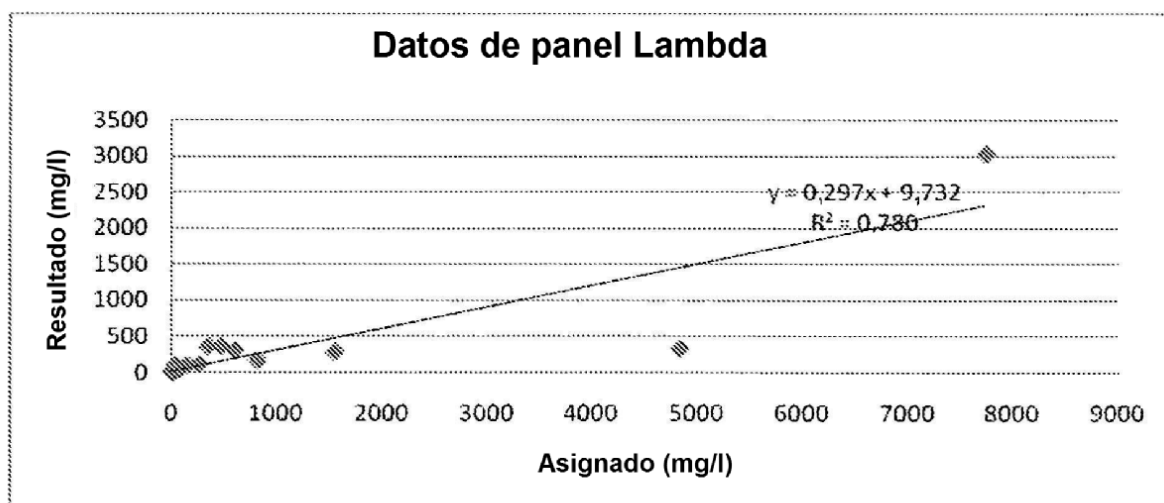
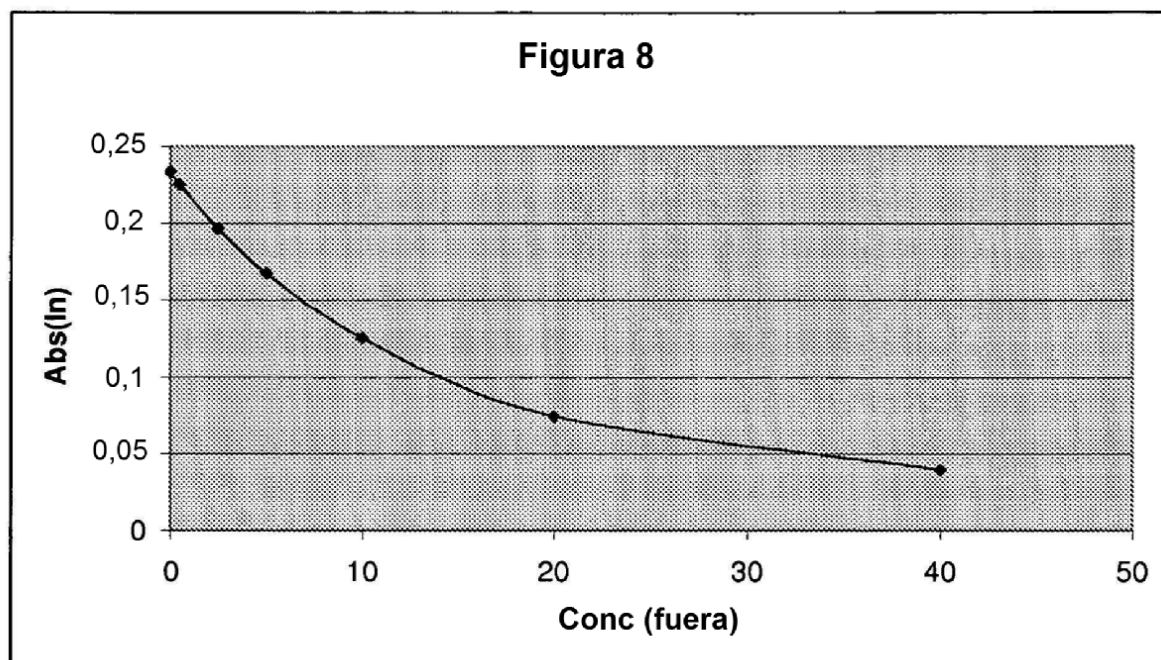


Figura 9