

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 600**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/72** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/US2015/024379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15154052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15772546 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020 EP 3126826**

54 Título: **Isotipaje de inmunoglobulinas usando masa molecular precisa**

30 Prioridad:

**04.04.2014 US 201461975524 P**

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

**06.10.2021**

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION  
AND RESEARCH (100.0%)  
200 First Street S.W.  
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**MURRAY, DAVID L.;  
BARNIDGE, DAVID R.;  
DASARI, SURENDRA y  
MILLS, JOHN R.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 861 600 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**

Isotipaje de inmunoglobulinas usando masa molecular precisa

**REFERENCIA CRUZADA**

Esta Solicitud reivindica el beneficio de Solicitud Provisional U.S. nº 61/975.524, presentada el 4 de abril de 2014.

**5 CAMPO TÉCNICO**

Este documento se refiere a métodos para detectar y cuantificar cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina utilizando técnicas de espectrometría de masas.

**ANTECEDENTES**

10 Las inmunoglobulinas humanas contienen dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (cada uno de alrededor de 54 kilodaltons en MW) y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos (cada uno de alrededor de 24 kilodaltons de peso molecular) que están unidos por enlaces de disulfuro. Cada cadena ligera y cada cadena pesada incluyen una región constante y una región variable. La región variable está ubicada en la parte N-terminal de cada cadena, y la región constante está ubicada en la parte C-terminal de cada cadena. Las regiones constantes de las cadenas ligeras y pesadas tienen diferentes secuencias de aminoácidos, y se pueden usar para identificar el isotipo de la cadena pesada o ligera. En los seres humanos, hay dos isotipos diferentes de polipéptidos de cadena ligera, denominados kappa o lambda; y cinco isotipos diferentes de polipéptidos de cadena pesada, denominados gamma (IgG), alfa (IgA), mu (IgM), épsilon (IgE), y delta (IgD).

20 Actualmente, los laboratorios clínicos cuantifican e isotipan las inmunoglobulinas séricas mediante una combinación de electroforesis en gel de proteínas (PEL) e inmunogixación (IFE). Para un individuo sano normal, el patrón electroforético observado es un patrón de tinción uniformemente disperso. Este patrón refleja el fondo policlonal producido por el gran número (alrededor de  $6,3 \times 10^6$  cadenas pesadas y  $3,5 \times 10^5$  cadenas ligeras) de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina generadas en función de la hipermutación somática. En ciertas enfermedades, tales como la gammapatía policlonal, hay un aumento en la cantidad total de inmunoglobulinas en el torrente sanguíneo o en la orina con respecto a un individuo sano. En otras enfermedades, tales como mieloma múltiple, este aumento en la cantidad de inmunoglobulinas se debe a una inmunoglobulina monoclonal en el torrente sanguíneo. Si se detectan niveles altos de inmunoglobulina monoclonal, se realizan ensayos adicionales para determinar los isotipos de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina monoclonal.

30 Asimismo, los laboratorios clínicos ahora evalúan el líquido cefalorraquídeo (LCR) con electroforesis en gel de isoelectroenfoque, seguido de inmunotransferencia de IgG (IgG IEF), para detectar clones de IgG en el LCR en comparación con el suero. Véase, por ejemplo, Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA. *Am J Clin Pathol.* 2003 Nov; 120(5):672-5. Una o más bandas de LCR (es decir, bandas oligoclonales; OCB) que no están presentes en el suero sugieren que los clones de células B están produciendo activamente IgG como parte de una respuesta inflamatoria en el SNC. La detección de OCB es un método sensible para las enfermedades inflamatorias del LCR, y, en la EM, el 95% de los pacientes tienen OCB de IgG específicas del LCR. Awad A, Hemmer B, Hartung HP, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. *J Neuroimmunol.* 2010 Feb 26; 219(1-2):1-7.

Rhianna Lindop et al describen, en *Arthritis & Rheumatism*, vol. 63, nº 11, 28 de octubre de 2011, en las páginas 3477-3486, una firma molecular de un autoanticuerpo clonotípico público en el síndrome de Sjogren primario.

Lauren A. Thurgood et al describen, en *Clinical and Experimental Immunology*, 6 de octubre de 2013, un proteoma de autoanticuerpo inmunodominante La/SSB que deriva de clonotipos públicos.

40 David R. Barnidge et al describen, en *Journal of Proteome Research*, vol. 13, no. 11, 18 de agosto de 2014, en las páginas 5198-5205, el fenotipaje de distribuciones de masas moleculares de cadenas ligeras kappa y lambda policlonales en suero de pacientes utilizando espectrometría de masas.

**SUMARIO**

45 La presente invención está definida por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención. Se describen aquí métodos para detectar cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas, en una muestra. El método incluye proporcionar una muestra que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas; inmunopurificar, diluir y/o concentrar la muestra; y someter la muestra a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra.

50 La inmunopurificación incluye el uso de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-IgG humana, un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgM humana, un anticuerpo anti-IgD humana, un anticuerpo anti-IgE humana, un anticuerpo anti-kappa humana, un anticuerpo anti-lambda humana, y combinaciones de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo no humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo no humano

es al menos uno de un anticuerpo de camélido, un anticuerpo de pez cartilaginoso, llama, oveja, cabra, o un anticuerpo de ratón.

5 El anticuerpo para la inmunopurificación es un fragmento de anticuerpo de dominio único. El fragmento de anticuerpo de dominio único (SDAF) se puede seleccionar del grupo que consiste en un SDAF anti-IgG humana, un SDAF anti-IgA humana, un SDAF anti-IgM humana, un SDAF anti-IgD humana, un SDAF anti-IgE humana, un SDAF anti-kappa humana, un SDAF anti-lambda humana, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo de dominio único deriva de un anticuerpo de camélido, un anticuerpo de pez cartilaginoso, llama, un anticuerpo de ratón, oveja, cabra, o un anticuerpo humano.

10 El fragmento de anticuerpo de dominio único puede seleccionarse de modo que el espectro de masas generado en la etapa c) para el fragmento de anticuerpo de dominio único no se solape con el espectro de masas generado en la etapa c) para la cadena ligera de inmunoglobulina o la cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo de dominio único se selecciona de manera que el fragmento de anticuerpo de dominio único genera una señal de alrededor de 12.500 a alrededor de 15.000 m/z en la etapa c) con una sola carga.

15 En algunas realizaciones, las cadenas ligeras de inmunoglobulina se desacoplan de las cadenas pesadas de inmunoglobulina antes de someter la muestra a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina se pueden desacoplar mediante la escisión de los enlaces de disulfuro entre las cadenas ligeras y pesadas. Por ejemplo, los enlaces de disulfuro se pueden escindir usando un agente reductor capaz de reducir los enlaces de disulfuro. En algunas realizaciones, el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en DTT (2,3 dihidroxibutano-1,4-ditiol), DTE (2,3 dihidroxibutano-1,4-ditiol), tioglicolato, cisteína, sulfitos, bisulfitos, sulfuros, bisulfuros, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), y formas de sal de los mismos.

En algunas realizaciones, el método incluye además determinar la relación de cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa y lambda en la muestra después de someter la muestra a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra.

25 En algunas realizaciones, las cadenas ligeras no se fragmentan durante la técnica de espectrometría de masas.

La muestra puede ser una muestra biológica. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina, o una muestra de líquido cefalorraquídeo. La muestra biológica puede ser una muestra biológica de mamífero. En algunas realizaciones, la muestra biológica de mamífero es una muestra biológica humana.

30 En algunas realizaciones, la técnica de espectrometría de masas incluye una técnica de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). Por ejemplo, la técnica de espectrometría de masas puede incluir una ionización por electropulverización de cromatografía de líquidos de microflujos acoplada a una técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (microLC-ESI-Q-TOF MS). En algunas realizaciones, la técnica LC-MS incluye el uso del modo de ion positivo.

35 En algunas realizaciones, la técnica de espectrometría de masas incluye una técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por adsorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS).

En algunas realizaciones, la muestra que incluye cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas, se analiza como una única fracción en un único análisis.

40 El método puede incluir además determinar el emparejamiento de las cadenas pesadas de inmunoglobulina y las cadenas ligeras de inmunoglobulina en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye además isotipar una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye además isotipar una o más de las cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye además isotipar una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y las cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye además identificar una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y las cadenas pesadas de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el método incluye además cuantificar la cantidad de una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y las cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra.

50 En algunas realizaciones, el método incluye además identificar la proteína M en la muestra. El método puede incluir además cuantificar la proteína M en la muestra. En algunas realizaciones, el método incluye además determinar el emparejamiento de cadenas pesadas de inmunoglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulina en la proteína M en la muestra.

En algunas realizaciones, la relación de las cadenas ligeras kappa y lambda se determina midiendo el área del pico de uno o más picos de iones con carga múltiple correspondientes a cada cadena. Las cadenas ligeras kappa y lambda se pueden cuantificar convirtiendo el área del pico de los picos de iones con carga múltiple en una masa molecular.

55 En algunas realizaciones, se puede usar un patrón interno sustituto de modo que la masa de la dosis del patrón interno no se solape con la masa de la proteína que se cuantifica.

Por consiguiente, se proporciona aquí un método para detectar cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas, en una muestra. El método incluye (a) proporcionar una muestra que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas; (b) inmunopurificar la muestra utilizando un fragmento de anticuerpo de dominio único; (c) desacoplar las inmunoglobulinas de cadena ligera de las inmunoglobulinas de cadena pesada; y (d) someter la muestra inmunopurificada a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra; (e) determinar una o más de (i) la relación de cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa y lambda; (ii) el isotipo de las cadenas ligeras de inmunoglobulina; (iii) el isotipo de las cadenas pesadas de inmunoglobulina; (iv) el isotipo de una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y cadenas pesadas de inmunoglobulina; y (v) la cantidad cuantitativa de una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra. La técnica de espectrometría de masas se escoge del grupo que consiste en (i) ionización por electropulverización de cromatografía de líquidos acoplada a un analizador de masas (cuadrupolo, tiempo de vuelo u orbitrap), (ii) una técnica de ionización por electropulverización de cromatografía de líquidos de microflujo acoplada a una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (microLC-ESI-Q-TOF MS o MS/MS), y (iii) una técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por adsorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS o MS/MS).

Además, se proporciona aquí un método para analizar cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas, en una muestra. El método incluye (a) proporcionar una muestra que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas; (b) inmunopurificar la muestra utilizando un fragmento de anticuerpo de dominio único; (c) opcionalmente desacoplar las inmunoglobulinas de cadena ligera de las inmunoglobulinas de cadena pesada, en el que una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina o cadenas pesadas de inmunoglobulina derivan de una proteína M; (d) someter la muestra inmunopurificada a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra; y (e) determinar uno o más de (i) la identidad de la proteína M; (ii) la cantidad de la proteína M; (iii) el emparejamiento de cadenas pesadas de inmunoglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulina de la proteína M; y (iv) la cantidad cuantitativa de una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, y proteína M en la muestra. La técnica de espectrometría de masas se escoge del grupo que consiste en (i) ionización por electropulverización de cromatografía de líquidos acoplada a un analizador de masas (cuadrupolo, tiempo de vuelo u orbitrap), (ii) una técnica de ionización por electropulverización de cromatografía de líquidos de microflujo acoplada a una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (microLC-ESI-Q-TOF MS o MS/MS), y (iii) una técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por adsorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS o MS/MS).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los métodos y materiales se describen aquí para uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y una referencia mencionada aquí, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y de las reivindicaciones.

#### 40 DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 ilustra los perfiles de masa molecular teóricos esperados que se observarían para cada una de las tres regiones (V, J y C) para las cadenas ligeras tanto kappa como lambda.

La FIG. 2 muestra las secuencias de aminoácidos para las regiones constantes para las cadenas ligeras kappa y lambda junto con la diferencia de masa molecular entre la región constante kappa y la masa promedio de las cuatro regiones constantes lambda.

La FIG. 3 muestra los histogramas construidos para kappa y lambda utilizando las masas moleculares calculadas mostradas en anchuras de intervalos ("bin") de 100 Da.

La FIG. 4 muestra un cromatograma de iones totales obtenido a partir de la inyección de 2 µl de suero combinado normal purificado en gel Melon y reducido con DTT, analizado por microLC-ESI-Q-TOF MS.

La FIG. 5 muestra el espectro de masas obtenido sumando los espectros recogidos en una ventana de 1 minuto con el estado de carga de las cadenas ligeras kappa policlonales, esperadas que se muestran junto a la línea vertical resaltada.

La FIG. 6 proporciona el espectro de masas deconvolucionado de la Figura 5 transformado a masa molecular, y que muestra el perfil de masa molecular policlona kappa y lambda.

La FIG. 7 muestra los resultados que comparan los perfiles de masa molecular deconvolucionados para suero combinado normal (arriba), suero combinado normal purificado con IgG kappa (centro), y suero combinado normal purificado con IgG lambda (abajo).

La FIG. 8 proporciona los resultados para muestras de suero combinadas derivadas de ovejas, cabras, vacas, y caballos.

5 La FIG. 9 muestra los iones de cadena ligera kappa y lambda en estado de carga +11 observados del suero tomado de un paciente con hipergammaglobulinemia (traza superior) en comparación con un suero de control normal (traza inferior).

La FIG. 10 muestra los iones del estado de carga +11 observados en el suero de control normal (arriba), un paciente con una respuesta inflamatoria crónica de origen desconocido (centro), y un paciente con síndrome de Sjögren, un trastorno autoinmune que involucra las glándulas salivales y lagrimales (abajo).

10 La FIG. 11 muestra la respuesta observada en la región de masa de la cadena ligera para una muestra de suero a la que se añade el anticuerpo terapéutico recombinante monoclonal HUMIRA® (adalimumab) que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG.

15 La FIG. 12 muestra la respuesta observada en la región de masa de cadena ligera para una muestra de suero de un paciente con una cadena ligera libre monoclonal lambda conocida y que también había sido tratado con el anticuerpo terapéutico recombinante monoclonal REMICADE® (infliximab) que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG.

La FIG. 13 muestra la respuesta observada en la región de masa de la cadena pesada para una muestra de suero a la que se añade el anticuerpo terapéutico recombinante monoclonal HUMIRA® (adalimumab) que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo de una realización de los métodos proporcionados aquí.

20 La FIG. 15 muestra la respuesta observada en la región de masa de la cadena ligera para una muestra de suero de un paciente con infección por VIH.

La FIG. 16 ilustra las etapas en la preparación de la muestra para un método basado en gel (arriba) y un método basado en espectrometría de masas (abajo) como se proporciona aquí.

25 La FIG. 17 ilustra los espectros de masas de un paciente negativo para inmunoglobulinas monoclonales específicas de LCR por IgG IEF analizado mediante un método basado en espectrometría de masas (abajo), como se proporciona aquí.

La FIG. 18 ilustra los espectros de masas de un paciente con inmunoglobulinas monoclonales de suero y de LCR coincidentes (es decir, un paciente negativo) por IgG IEF analizado mediante un método basado en espectrometría de masas, como se proporciona aquí.

30 La FIG. 19 ilustra los espectros de masas de un paciente positivo para inmunoglobulinas monoclonales específicas de LCR por IgG IEF analizado mediante un método basado en espectrometría de masas, como se proporciona aquí.

35 La FIG. 20 ilustra los espectros de masas de un paciente positivo para inmunoglobulinas monoclonales específicas de LCR por IgG IEF analizado mediante un método basado en espectrometría de masas, como se proporciona aquí.

40 La FIG. 21 ilustra las cadenas ligeras kappa en estado de carga +17 procedentes de una muestra de LCR del paciente positiva para OCB a la que se añade un patrón de cadena ligera kappa y después se analizó mediante un método basado en espectrometría de masas, como se proporciona aquí. El trazo azul corresponde a la adición de 1,5 µg/ml, el trazo rosa corresponde a la adición de 3 µg/ml, el trazo naranja corresponde a la adición de 6 µg/ml, y el trazo verde corresponde a la adición de 12 µg/ml.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

La secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de inmunoglobulina humana consiste en tres regiones: la región V N-terminal (aproximadamente 107 aminoácidos para kappa y 110 aminoácidos para lambda), la región J (12 aminoácidos), y la región C C-terminal (106 aminoácidos). Cada región se traduce a partir de un conjunto específico de genes expresados solo en células B que producen y segregan cadenas ligeras como parte de una inmunoglobulina intacta o como cadena ligera libre. Las células B también son capaces de mutar aleatoriamente genes de las regiones V y J para cadenas ligeras a través del proceso de hipermutación somática que da como resultado una gran cantidad de combinaciones de genes diferentes (aproximadamente  $1,3 \times 10^3$  para kappa sola) (véase, por ejemplo, Lefranc, MP. Cold Spring Harb Protoc 2011; 2011:595-603). Dado que las secuencias de genes de la región V y J de la cadena ligera se crean al azar, el Teorema del Límite Central (Mukhopadhyay, N y Chattopadhyay, B. Sequential Anal 2012; 31:265-77) predice que la secuencia de aminoácidos del repertorio de cadenas ligeras expresadas debería tener un perfil de masa molecular distribuido normalmente.

La Figura 1 presenta un ejemplo de los perfiles de masa molecular teóricos esperados que se observarían para cada una de las tres regiones (V, J y C) para las cadenas ligeras kappa y lambda. Los perfiles debajo de las regiones V y J muestran la distribución normal predicha de los perfiles de masa molecular de las regiones traducidas, mientras que los perfiles debajo de las regiones C muestran simples barras. Dado que la región constante kappa tiene solo una secuencia de aminoácidos conservada, está representada por una única barra de masa molecular, mientras que el perfil debajo de la región C para lambda muestra cuatro barras diferentes, representando cada una las cuatro masas moleculares de región constante lambda diferentes L1, L2, L3 y L7 (McBride, OW et al. J Exp Med 1982; 155:1480-90). La Figura 2 muestra las secuencias de aminoácidos para las regiones constantes para las cadenas ligeras kappa y lambda junto con la diferencia de masa molecular entre la región constante kappa y la masa promedio de las cuatro regiones constantes lambda. Suponiendo que las masas moleculares de las secuencias de aminoácidos de las regiones V y J siguen una distribución normal, entonces la diferencia entre  $\mu$  para kappa y  $\mu$  para lambda de sus perfiles de masa molecular debe diferir en la diferencia de masa de las regiones constantes (aproximadamente 363,55 Da). Usando una base de datos de secuencias de genes de cadenas ligeras que contiene las regiones V y J completas para 1087 secuencias de cadena ligera kappa y 735 secuencias de cadena ligera lambda, se calculó la masa molecular de las cadenas ligeras kappa y lambda. La información de la secuencia nucleotídica para cada región VJ se convirtió en la secuencia de aminoácidos, y después se convirtió en masa molecular. A continuación, se añadió la masa molecular de la región VJ a la masa molecular de la región constante kappa o lambda correspondiente. La Figura 3 muestra los histogramas construidos para kappa y lambda usando las masas moleculares calculadas mostradas en anchuras de intervalos de 100 Da. Se encontró que la masa molecular media para kappa era 23.373,41 Da, mientras que la masa molecular media para lambda era 22.845,24 Da (media indicada por líneas verticales discontinuas rojas). Esto se traduce en una diferencia de 528,17 Da entre las cadenas ligeras kappa y lambda, que es mayor que la diferencia de 363,55 Da entre las masas moleculares de las regiones constantes kappa y lambda solas. Esta diferencia probablemente se deba a la contribución en masa de las regiones marco (FR) dentro de las regiones V que no experimentan una aleatorización completa en comparación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de las regiones V.

Al igual que con las cadenas ligeras de inmunoglobulina, las cadenas pesadas incluyen una región variable y una región de contacto. Usando secuencias conocidas de cadenas pesadas de inmunoglobulinas seleccionadas (es decir, IgA, IgG e IgM), las secuencias de genes de la región variable se convirtieron en su secuencia de aminoácidos respectiva, y después se convirtieron en una masa molecular. Estas masas se añadieron entonces a las masas moleculares de regiones constantes conocidas para IgA, IgG e IgM. Se preparó un conjunto de posibles intervalos de masas moleculares en incrementos de 200 Da, y se registró el número de clones que coincidían con la masa para cada intervalo. En la Figura 2 se muestra un gráfico de histograma suavizado del número de clones en cada intervalo (eje y) frente a la masa molecular de cada intervalo (eje x), en la que la línea roja (primer y tercer picos desde la izquierda) = IgA, la línea azul (segundo y cuarto picos desde la izquierda) = IgG, y la línea verde (quinto y sexto picos desde la izquierda) = IgM. El gráfico demuestra que existe una brecha en la masa molecular de cada uno de los diferentes isotipos de cadena pesada análoga a la diferencia en masa entre las cadenas ligeras kappa y lambda. La masa molecular promedio conocida de las regiones constantes para los isotipos de Ig es:

- IgA, 2 subclases, Masa Molecular Promedio = 37.090 Da
- IgG, 4 subclases, Masa Molecular Promedio = 37.308 Da
- IgM, 1 clase, Masa Molecular = 49.307 Da

La masa molecular observada para cada uno de los isotipos de inmunoglobulina se desplazará debido a la adición de glicosilación ligada a N y/o ligada a O. Esta modificación post-traducciona es un proceso natural realizado por la célula B, pero el grado de glicosilación añadida por la célula es diferente para cada isotipo de Ig, y por lo tanto debería proporcionar un medio adicional para identificar el isotipo sin realizar una fragmentación adicional de MS/MS. Los patrones de glicosilación de isotipo son:

- IgA tiene glicosilación tanto ligada a O como ligada a N
- IgG solo tiene glicosilación ligada a N en Aps 297
- IgM tiene 5 sitios de glicosilación ligada a N.

Los datos proporcionados aquí muestran que las distribuciones de masa molecular observadas usando los métodos descritos aquí representan el repertorio completo de cadenas pesadas y ligeras policlonales presente en el suero. La capacidad para observar la distribución completa de la masa molecular de la inmunoglobulina es una propiedad única de los métodos proporcionados aquí, y permite al usuario registrar una firma fenotípica de inmunoglobulina específica para una muestra.

Utilizando los distintos perfiles de masa molecular de los diversos isotipos de cadena pesada y ligera, se ha descubierto un método para utilizar la espectrometría de masas para identificar y cuantificar las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras en una muestra. Por ejemplo, se proporcionan aquí métodos para usar esta diferencia en masas moleculares para identificar y cuantificar las cadenas ligeras kappa y lambda en muestras usando técnicas de espectrometría de masas (véase la Figura 14). La velocidad, sensibilidad, resolución y robustez de la espectrometría

de masas hace a los presentes métodos superiores a PEL, la nefelometría o el IFE para isotipar inmunoglobulinas, y permite comparaciones y cuantificaciones de su abundancia relativa. Dichos métodos son útiles para diagnosticar diversos trastornos y para monitorizar a los pacientes después del tratamiento.

5 La electroforesis de proteínas se puede utilizar para cuantificar las inmunoglobulinas del LCR en pacientes con esclerosis múltiple (EM). Véase, por ejemplo, Kabat EA, Moore DH, Landow H. *J Clin Invest.* 1942 Sep; 21(5):571-7. Los laboratorios clínicos ahora evalúan el LCR con electroforesis en gel de isoelectroenfoque, seguido de inmunotransferencia de IgG (IgG IEF), para detectar clones de IgG en el LCR en comparación con el suero. Véase, por ejemplo, Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmán JA. *Am J Clin Pathol.* 2003 Nov; 120(5):672-5. Múltiples bandas de LCR (es decir, bandas oligoclonales - OCB) que no están presentes en el suero sugieren que los clones de células B producen activamente IgG como parte de una respuesta inflamatoria en el SNC. La detección de OCB es un método sensible para las enfermedades inflamatorias del LCR, y, en la esclerosis múltiple, el 95% de los pacientes tienen OCB de IgG específicas del LCR. Véase, por ejemplo, Awad A, Hemmer B, Hartung HP, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. *J Neuroimmunol.* 2010 Feb 26; 219(1-2):1-7. Las inmunotransferencias de IgG IEF se interpretan como: 1) Sin bandas en suero y LCR (negativo); 2) Bandas coincidentes en suero y LCR (negativo); 3) Bandas únicas en suero (negativo); o 4) Bandas únicas en LCR (positivo). Además, las moléculas de IgG aisladas del líquido del LCR se analizaron mediante geles de IEF, y las bandas se cortaron posteriormente y después se analizaron mediante MALD-TOF MS. Véase, por ejemplo, Obermeier et al. *Nature Medicine.* 2008 Jun; 14(6):688-93. Asimismo, el LCR se ha purificado a partir del LCR usando SDS-PAGE, con las bandas relevantes escindidas, tripsinizadas, y medidas con LC-MS. Véase, por ejemplo, Singh et al. *Cerebrospinal-fluid-derived Immunoglobulin G of Different Multiple Sclerosis Patients Shows Mutated Sequences in Complementary Determining Regions.* *Mol Cell Proteomics.* 2013 Dec; 12(12):3924-34.

Usando métodos de espectrometría de masas como se proporciona aquí, también denominados medida de masa precisa rápida de inmunoglobulina monoclonal (miRAMM), se pueden detectar inmunoglobulinas oligoclonales evaluando sus cadenas ligeras asociadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero. Por ejemplo, se compararon los resultados de 56 muestras de suero y LCR emparejadas analizadas por IgG IEF y miRAMM. Los dos métodos estuvieron de acuerdo con 54 muestras con resultados concordantes (22 positivas y 34 negativas), y 2 que fueron positivas por IgG IEF pero negativas por miRAMM. Adicionalmente, además de identificar inmunoglobulinas clonales, los métodos proporcionados aquí se pueden usar para cuantificar la cantidad de inmunoglobulina clonal.

En diversas realizaciones, los métodos proporcionados aquí exhiben una mayor precisión de emparejamiento de clones entre suero y LCR, en comparación con otras metodologías conocidas. En diversas realizaciones, los métodos tienen un menor coste de suministro en comparación con las técnicas basadas en inmunofijación (IFE). En diversas realizaciones, los métodos pueden cuantificar ventajosamente uno o más de los clones de LCR.

Las células plasmáticas (CP) residen en la médula ósea y segregan grandes cantidades de inmunoglobulinas específicas de antígeno de alta afinidad. En las discrasias de células plasmáticas (DCP) hay una sobrerrepresentación de CP clonales específicas que segregan proteínas M únicas con masas definidas determinadas por el isotipo de la cadena pesada y/o ligera que compone la proteína M. De este modo, estas proteínas M son biomarcadores de las DCP. De este modo, si existe una sospecha clínica de un trastorno de DCP, el suero y la orina del paciente generalmente se analizan para detectar la presencia de proteínas M (también conocidas como inmunoglobulinas monoclonales). Las proteínas M se detectan típicamente usando una combinación de electroforesis en gel de proteínas (PEL) e inmunofijación.

#### Muestras y preparación de muestras

Una muestra para análisis puede ser cualquier muestra biológica, tal como una muestra de tejido (por ejemplo, tejido adiposo, hígado, riñón, corazón, músculo, hueso, o piel) o de fluido biológico (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, fluido lagrimal, saliva, o líquido cefalorraquídeo central). La muestra biológica puede ser de un sujeto que tiene inmunoglobulinas, que incluye, pero no se limita a, un mamífero, por ejemplo, un ser humano, perro, gato, primate, roedor, cerdo, oveja, vaca, y caballo. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende una inmunoglobulina monoclonal exógena. Una muestra también puede ser un reactivo artificial, tal como una mezcla de composición conocida o una muestra de control.

Una muestra se puede tratar para eliminar los componentes que podrían interferir con la técnica de espectrometría de masas. Se puede utilizar una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica en función del tipo de muestra. Las muestras sólidas y/o tisulares se pueden triturar y extraer para liberar los analitos de interés de los componentes que interfieren. En tales casos, una muestra se puede centrifugar, filtrar y/o someter a técnicas cromatográficas para eliminar los componentes que interfieren (por ejemplo, células o fragmentos de tejido). En aún otros casos, pueden añadirse reactivos que se sabe que precipitan o se unen a los componentes que interfieren. Por ejemplo, las muestras de sangre completa se pueden tratar usando técnicas de coagulación convencionales para eliminar los glóbulos rojos y blancos y las plaquetas. Una muestra se puede desproteínizar. Por ejemplo, una muestra de plasma puede tener proteínas séricas precipitadas usando reactivos convencionales tales como acetonitrilo, KOH, NaOH, u otros conocidos por los expertos en la técnica, opcionalmente seguido de centrifugación de la muestra.

Las inmunoglobulinas pueden aislarse de las muestras o enriquecerse (es decir, concentrarse) en una muestra utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen eliminar de una muestra uno o más contaminantes que no son inmunoglobulinas. En algunas realizaciones, las muestras se pueden enriquecer o purificar usando inmunopurificación, centrifugación, filtración, ultrafiltración, diálisis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad de proteína A/G, purificación por afinidad, precipitación, electroforesis en gel, electroforesis capilar, fraccionamiento químico (por ejemplo, kits de purificación de anticuerpos, tales como Melon Gel Purification), y técnicas con aptámeros. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden purificar mediante fraccionamiento químico, por ejemplo Melon Gel Chromatography (Thermo Scientific), en la que las resinas Melon Gel se unen en una muestra a proteínas que no son inmunoglobulinas y permiten que las inmunoglobulinas se recojan en la fracción de flujo continuo; o mediante purificación por afinidad, por ejemplo mediante purificación con Proteína A, Proteína G o Proteína L, en la que las inmunoglobulinas se unen a esas proteínas a pH fisiológico y después se liberan de las proteínas reduciendo el pH. Cuando se utilizan muestras de suero, plasma o sangre completa, una muestra, tal como una muestra de 10 - 250  $\mu\text{l}$ , por ejemplo 50  $\mu\text{l}$ , se puede someter directamente a purificación con Melon Gel, Proteína A, Proteína G o Proteína L. Los principios de exclusión por tamaño, tal como una columna TurboFlow, también se pueden emplear para separar de una muestra los contaminantes que no son inmunoglobulinas. Cuando se utilizan muestras de orina, una muestra de orina se puede amortiguar, por ejemplo, una muestra de orina de 50  $\mu\text{l}$  se puede diluir primero con 50  $\mu\text{l}$  de bicarbonato de amonio 50 mM.

En algunas realizaciones, una muestra puede someterse a inmunopurificación antes del análisis por espectrometría de masas. En algunas realizaciones, la muestra puede estar enriquecida en inmunoglobulina. Por ejemplo, la inmunopurificación puede dar como resultado el enriquecimiento de una o más inmunoglobulinas. En algunas realizaciones, la inmunopurificación puede separar o enriquecer las cadenas ligeras de inmunoglobulina en una muestra. En algunas realizaciones, la inmunopurificación puede separar o enriquecer las cadenas pesadas de inmunoglobulina en una muestra. En algunas realizaciones, la inmunopurificación puede separar o enriquecer cadenas ligeras kappa de inmunoglobulina o cadenas ligeras lambda de inmunoglobulina en una muestra. En algunas realizaciones, la inmunopurificación puede separar o enriquecer IgG, IgA, IgM, IgD, o IgE en una muestra. La inmunopurificación puede implicar poner en contacto una muestra que contiene el antígeno deseado con una matriz de afinidad que incluye fragmentos de anticuerpo de dominio único para el antígeno unido covalentemente a una fase sólida (por ejemplo, perlas de agarosa). Los antígenos en la muestra se unen a la matriz de afinidad a través de un enlace inmunoquímico. A continuación, la matriz de afinidad se lava para eliminar cualquier especie no unida. Después, el antígeno se elimina de la matriz de afinidad alterando la composición química de una disolución en contacto con la matriz de afinidad. La inmunopurificación se puede realizar en una columna que contiene la matriz de afinidad, en cuyo caso la disolución es un eluyente, o en un proceso discontinuo, en cuyo caso la matriz de afinidad se mantiene como una suspensión en la disolución.

De acuerdo con la invención, en el procedimiento de inmunopurificación se utilizan fragmentos de anticuerpo de dominio único (SDAF) con afinidad por las inmunoglobulinas. Los SDAF pueden derivar de anticuerpos de cadena pesada de fuentes no humanas (por ejemplo, camélidos), anticuerpos de cadena pesada de fuentes humanas, y anticuerpos de cadena ligera de seres humanos. Los SDAF poseen características únicas, tales como bajo peso molecular, alta estabilidad físico-química, buena solubilidad en agua, y la capacidad de unirse a antígenos inaccesibles a los anticuerpos convencionales.

La combinación de enriquecimiento utilizando una colección de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo de dominio único) con afinidad por uno o más de los diferentes isotipos de inmunoglobulina, junto con la generación rápida de espectros de masas utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF, se utilizó para la identificación de proteínas monoclonales, la cuantificación de proteínas M, y la identificación de una o más de las inmunoglobulinas de cadena pesada o ligera, incluyendo la identificación de los pares de isotipos de cadena pesada/ligera. Los métodos proporcionados aquí pueden generar información clínica equivalente a los cuatro ensayos clínicos que se utilizan actualmente para el diagnóstico, y se podría lograr la monitorización de DCP - PEL, la cuantificación de proteínas totales, ensayos IFE y Hevy Lite (HCL).

Según la invención, el aislamiento de inmunoglobulinas se realiza con una entidad distinta de un anticuerpo tradicional - que contiene cadenas tanto pesadas como ligeras (tales como las que se utilizan en IFE y diversos inmunoensayos clínicos conocidos). Los anticuerpos tradicionales contienen cadenas pesadas y/o ligeras con masas que pueden solaparse con las masas de las inmunoglobulinas en la muestra de interés (por ejemplo, inmunoglobulinas humanas). Por tanto, estos anticuerpos pueden interferir en los espectros de masas de las inmunoglobulinas del paciente. Los fragmentos de anticuerpo de dominio único (SDAF) pueden tener masas que oscilan de 12.500-15.000 Da, y, utilizando los métodos descritos aquí, pueden portar una sola carga, generando así una señal en el intervalo de 12.500-15.000 m/z, que no se solapa con la señales generadas por cadenas pesadas o cadenas ligeras humanas. Además, la masa molecular precisa sola no es 100% específica en la identificación del isotipo de inmunoglobulina, ya que hay regiones m/z (23.000-23.200 m/z u 11.500-11.600 m/z) en las que las inmunoglobulinas pueden ser del isotipo de cadena ligera kappa o lambda. De este modo, el uso de aislamiento específico de cadenas pesadas y/o ligeras utilizando SDAF, junto con la identificación de masas, da como resultado un método específico y sensible para la detección de cadenas pesadas de inmunoglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulina.

En diversas realizaciones, el uso de fragmentos de anticuerpo de dominio único puede usarse en lugar de concentrar muestras con bajas concentraciones de inmunoglobulinas antes del análisis. En diversas realizaciones, el método

descrito aquí puede reemplazar la necesidad de medir las proteínas totales y la electroforesis en gel de proteínas de orina o suero para cuantificar proteínas monoclonales específicas. En diversas realizaciones, el método puede identificar todos los tipos principales de isotipos monoclonales de proteínas M con sensibilidad que excede los métodos actuales. En diversas realizaciones, el método es más rápido, menos costoso, menos laborioso, y automatizable. En diversas realizaciones, el método es ventajoso debido a que crea un registro electrónico en contraposición a un gel. En diversas realizaciones, el método supera el inconveniente de los métodos anteriores en el sentido de que la adquisición de datos puede tardar menos de 15 segundos por muestra.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas, o las cadenas pesadas y/o ligeras de las mismas, se aíslan de forma sustancial. Por "se aíslan de forma sustancial" se quiere decir que las inmunoglobulinas se separan al menos parcialmente o de forma sustancial de la muestra de la que se proporcionaron. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una muestra enriquecida en las inmunoglobulinas (es decir, las cadenas pesadas y/o ligeras). La separación sustancial puede incluir muestras que contienen al menos alrededor de 10%, al menos alrededor de 20%, al menos alrededor de 30%, al menos alrededor de 40%, al menos alrededor de 50%, al menos alrededor de 60%, al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, al menos alrededor de 97%, o al menos alrededor de 99% en peso de la inmunoglobulina, o sus cadenas pesadas y/o ligeras. Los métodos para aislar inmunoglobulinas, tales como los descritos anteriormente, son rutinarios en la técnica.

Las inmunoglobulinas intactas pueden procesarse adicionalmente para desacoplar las cadenas ligeras en una muestra de inmunoglobulinas totales de las inmunoglobulinas de cadena pesada. El desacoplamiento se puede lograr tratando las inmunoglobulinas totales con un agente reductor, tal como DTT (2,3 dihidroxibutano-1,4-ditiol), DTE (2,3 dihidroxibutano-1,4-ditiol), tioglicolato, cisteína, sulfitos, bisulfitos, sulfuros, bisulfuros, TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina), 2-mercaptoetanol, y formas de sal de los mismos. En algunas realizaciones, la etapa de reducción se realiza a temperatura elevada, por ejemplo, en un intervalo de alrededor de 30°C a alrededor de 65°C, tal como alrededor de 55°C, para desnaturar las proteínas. En algunas realizaciones, la muestra se trata además, por ejemplo, modificando el pH de la muestra o amortiguando la muestra. En algunas realizaciones, la muestra se puede acidificar. En algunas realizaciones, la muestra se puede neutralizar (por ejemplo, mediante la adición de una base tal como bicarbonato).

#### Métodos de espectrometría de masas

Después de la preparación de la muestra, una muestra de inmunoglobulina, tal como una muestra desacoplada que tiene una o más cadenas de inmunoglobulina pesadas o ligeras, se puede someter a una técnica de espectrometría de masas (MS), ya sea directamente o después de la separación en una columna de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En algunas realizaciones, se puede usar cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) para analizar el espectro de masas de los iones. Por ejemplo, el método se puede utilizar para identificar iones con carga múltiple (por ejemplo, los iones +1, iones +2, iones +3, iones +4, iones +5, iones +6, iones +7, iones +8, iones +9, iones +10, iones +11, iones +12, iones +13, iones +14, iones +15, iones +16, iones +17, iones +18, iones +19, iones +20, iones +21, e iones +22), que resultan de las cadenas pesadas o ligeras en la muestra. En algunas realizaciones, el ión cargado +11 se identifica y se usa para análisis posteriores. En algunas realizaciones, las muestras no se fragmentan durante la técnica de espectrometría de masas. LC-MS es una técnica analítica que combina las capacidades de separación física de la cromatografía de líquidos con las capacidades de análisis de masas de la espectrometría de masas, y es adecuada para la detección e identificación potencial de sustancias químicas en una mezcla compleja. Se puede utilizar cualquier instrumento de LC-MS, por ejemplo el espectrómetro de masas ABSciex 5600. En algunas realizaciones, se puede utilizar microflujoLC-MS. Puede usarse cualquier instrumento de microflujo adecuado, por ejemplo el microLC Eksigent Ekspert 200. El espectro de masas de iones se puede analizar para uno o más picos correspondientes a una o más cadenas pesadas o ligeras en la muestra. Por ejemplo, se pueden examinar uno o más picos de iones, por ejemplo un pico de iones +11 para cada una de las cadenas ligeras kappa y lambda, para determinar la relación de cada cadena en la muestra. En algunas realizaciones, la relación se determina por el área del pico del pico o picos de iones seleccionados.

En algunas realizaciones, la ionización por electropulverización acoplada a una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (ESI-Q-TOF MS) puede usarse para analizar el espectro de masas de una muestra de inmunoglobulina, por ejemplo el espectro de masas del estado de carga +11 de las cadenas pesadas y/o ligeras en la muestra. La espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI MS) es una técnica útil para producir iones a partir de macromoléculas, debido a que supera la propensión de estas moléculas a fragmentarse cuando se ionizan. Además, ESI a menudo produce iones con carga múltiple, extendiendo de manera efectiva el intervalo de masa del analizador para adaptarse a los órdenes de magnitud observados en proteínas y otras moléculas biológicas. Un analizador de masas de cuadrupolo (Q) consiste en cuatro barras cilíndricas, colocadas en paralelo entre sí. En un espectrómetro de masas de cuadrupolo, el cuadrupolo es el componente del instrumento responsable de filtrar los iones de la muestra en función de su relación masa-carga (m/z). El analizador de tiempo de vuelo (TOF) utiliza un campo eléctrico para acelerar los iones a través del mismo potencial, y después mide el tiempo que tardan en llegar al detector. Si todas las partículas tienen la misma carga, las energías cinéticas son idénticas, y sus velocidades dependen solo de sus masas. Los iones más ligeros llegan primero al detector. Se puede utilizar cualquier espectrómetro de masas ESI-Q-TOF, por ejemplo el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo ABSciex TripleTOF 5600. El espectro de masas, por ejemplo, el espectro de masas de iones polipeptídicos de cadena ligera o cadena pesada intactos con carga múltiple, se puede analizar para identificar uno o más picos a una

masa/carga apropiada esperada para la cadena. Por ejemplo, para las cadenas ligeras, los picos pueden aparecer a alrededor de 600 - 2500 m/z. En algunas realizaciones, los picos pueden aparecer a alrededor de 1000 - 2300 m/z (por ejemplo, alrededor de 2000 - 2200 m/z para el ión +11). Los picos de iones de fragmentos se pueden detectar en un intervalo de m/z de 250-2000. En el caso de las cadenas pesadas, los picos pueden aparecer a alrededor de 600 - 2500 m/z. En algunas realizaciones, los picos pueden aparecer a alrededor de 900 - 2000 m/z.

En algunas realizaciones, la ionización por electropulverización acoplada a un analizador de masas orbitrap de tiempo de vuelo de cuadrupolo se puede usar para analizar el espectro de masas de una muestra de inmunoglobulina, por ejemplo el espectro de masas del estado de carga +11 de las cadenas pesadas y/o ligeras en la muestra.

Los picos de iones con carga múltiple se pueden convertir en una masa molecular utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden utilizar centroides de picos de iones con carga múltiple para calcular la masa molecular promedio, y el valor del área de pico usado para la cuantificación se proporciona mediante un paquete de software. Específicamente, la deconvolución de múltiples iones se puede realizar utilizando el paquete de software Bayesian Protein Reconstruct en el paquete de software complementario BioAnalyst en ABSCIEX Analyst TF 1.6. Se pueden utilizar los siguientes ajustes: Masa inicial (Da) = 22.000, Masa final (Da) = 26.000 Da, Masa escalonada (Da) = 1, Umbral S/N = 20, Intensidad mínima % = 0, Iteraciones = 20, Aducto: Hidrógeno. Se utilizó un intervalo de masas limitado, con un m/z inicial = 1.100 y un m/z final = 2.500. Los iones deconvolucionados y con carga múltiple también se pueden integrar manualmente mediante la secuencia de comandos Manual Integration 33 en Analyst TF. La provisión de la masa molecular para las cadenas de inmunoglobulina pesadas y/o ligeras en la muestra facilita la cuantificación y el isotipaje de las cadenas en la muestra. Por ejemplo, los métodos proporcionados aquí pueden usarse para determinar la relación de las cadenas ligeras kappa y lambda en la muestra. La relación kappa/lambda es simplemente el área del pico calculada para la distribución de masa molecular de la cadena ligera kappa dividida entre la distribución de masa molecular de la cadena ligera lambda. Además, los métodos proporcionados aquí pueden usarse para comparar la abundancia relativa de cada una de las cadenas ligeras en comparación con una muestra de referencia o de control. Como se discutirá con más detalle a continuación, la relación aceptada de cadenas ligeras kappa a lambda en una muestra de suero normal es 3,20. Las desviaciones de esta relación pueden ser indicativas de diversos trastornos, y por lo tanto es una herramienta útil para diagnosticar y monitorizar a los pacientes con dichos trastornos.

En algunas realizaciones, la espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por adsorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS) se puede usar para analizar el espectro de masas de una muestra de inmunoglobulina. La MALDI-TOF MS identifica proteínas y péptidos como picos espectrales masa/carga (m/z). Además, la resolución inherente de MALDI-TOF MS permite diseñar ensayos usando múltiples ligandos de afinidad para purificar/concentrar selectivamente, y después analizar múltiples proteínas en un solo ensayo.

Métodos para cribar muestras biológicas y para diagnosticar y monitorizar trastornos

Los métodos basados en espectrometría de masas proporcionados aquí pueden usarse para determinar la relación de las cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa y lambda en una muestra. En algunas realizaciones, una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) que tiene una o más inmunoglobulinas se puede someter a un ensayo de espectrometría de masas. La muestra se puede pretratar para aislar o enriquecer las inmunoglobulinas presentes en la muestra, y en algunos casos, las cadenas ligeras de inmunoglobulina se pueden desacoplar de las cadenas pesadas de inmunoglobulina antes del análisis de espectrometría de masas. El espectro obtenido del ensayo se puede utilizar entonces para determinar la relación de las cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa y lambda en la muestra. En algunas realizaciones, la abundancia relativa de las cadenas ligeras kappa y lambda se puede determinar convirtiendo en una masa molecular las áreas de los picos de uno o más de los picos identificados.

Las relaciones y la abundancia relativa de las cadenas ligeras de inmunoglobulina se pueden comparar con un valor de referencia o una muestra de control para ayudar en el diagnóstico de diversos trastornos, incluyendo las gammopatías policlonales (por ejemplo, hipergammaglobulinemia), trastornos autoinmunes (por ejemplo, síndrome de Sjögren), trastornos infecciosos (por ejemplo, VIH), y trastornos inflamatorios (por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos). En tales trastornos, la relación de cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa a lambda se desvía de la relación normal aceptada (por ejemplo, una relación de 3,20). Por ejemplo, en el caso de un trastorno autoinmune tal como el síndrome de Sjögren, la prevalencia de cadenas ligeras de inmunoglobulina kappa aumenta desde lo normal, y la relación de cadenas ligeras kappa a lambda es mayor que la normal 3,20, por ejemplo la relación puede ser alrededor de 5 (por ejemplo, 83:17). Para un trastorno inflamatorio tal como un trastorno inflamatorio crónico, la abundancia relativa de cada una de las cadenas ligeras se puede invertir (es decir, se observa una mayor prevalencia de la cadena ligera lambda en comparación con la cadena ligera kappa). Por ejemplo, la cantidad de cadenas ligeras lambda en una muestra de un paciente que padece tal trastorno puede ser alrededor de 0,5 (por ejemplo, 0,54). En algunos casos, los trastornos tales como la hipergammaglobulinemia pueden diagnosticarse basándose en la abundancia relativa de las cadenas ligeras de inmunoglobulina en comparación con un valor de referencia o una muestra de control. Por ejemplo, la abundancia relativa de las cadenas ligeras en comparación con un valor de referencia aceptado como normal puede ser al menos dos desviaciones estándar mayor; en algunos casos, al menos 50% más, al menos 75% más, o al menos 100% más, o al menos 2 veces mayor, 3 veces mayor, o 4 veces, o más. Además de las relaciones relativas, la detección de clones de inmunoglobulina que aparecen en mayores cantidades que el fondo policlonal puede ayudar en el diagnóstico del estado patológico. Por ejemplo, se sabe que los pacientes

que están respondiendo a una infección bacteriana producen una respuesta de inmunoglobulina oligoclonal frente a esa bacteria. La observación de una respuesta oligoclonal puede dirigir entonces el tratamiento contra agentes infecciosos.

5 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados aquí pueden usarse para confirmar un diagnóstico realizado por métodos actuales tales como electroforesis de proteínas (PEL) o ensayo de inmunofijación (IF). Por ejemplo, si se obtiene un resultado negativo de PEL y/o IF, los presentes métodos pueden usarse como un ensayo secundario para confirmar o contrarrestar dichos resultados. En algunas realizaciones, el diagnóstico proporcionado aquí puede confirmarse usando tales métodos estándar.

10 Los métodos basados en espectrometría de masas proporcionados aquí también se pueden usar para monitorizar el tratamiento de un trastorno en un sujeto. Por ejemplo, cuando se diagnostica que el sujeto tiene gammapatía policlonal (por ejemplo, hiperglobulinemia), los métodos proporcionados aquí pueden usarse además para monitorizar un tratamiento de gammapatía policlonal. Dichos métodos incluyen proporcionar una primera muestra del sujeto antes del tratamiento y una segunda muestra del sujeto durante o después del tratamiento. Las inmunoglobulinas pueden aislarse o enriquecerse de la primera y segunda muestras, y pueden someterse a una técnica de espectrometría de masas. La relación de las cadenas ligeras kappa y lambda se determina antes y después del tratamiento, y se compara. Un cambio de la relación frente al valor normal aceptado indica que el tratamiento puede ser eficaz para el sujeto; mientras que un cambio mayor o ningún cambio en la relación indica que el tratamiento puede ser ineficaz para el sujeto.

20 Las técnicas proporcionadas aquí también pueden usarse para diferenciar muestras humanas de las de otras especies de mamíferos basándose en la distribución relativa de las cadenas ligeras kappa y lambda. Dichos métodos pueden ser útiles para realizar un cribado previo de muestras biológicas usadas en, por ejemplo, pruebas antidopaje.

25 Además, los métodos proporcionados aquí son útiles para identificar el isotipo de las inmunoglobulinas de cadena pesada o ligera. En ciertas enfermedades, tales como el mieloma múltiple, hay un aumento en la cantidad de una inmunoglobulina monoclonal en el torrente sanguíneo. Si se detectan niveles altos de la inmunoglobulina monoclonal, se realizan pruebas adicionales para determinar los isotipos de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina monoclonal. Los métodos actuales utilizan anticuerpos anti-región constante para determinar el isotipo. Los métodos proporcionados aquí proporcionan una alternativa a los métodos actuales, y muestran una velocidad, sensibilidad, resolución, y robustez superiores a las pruebas de laboratorio convencionales.

30 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados aquí se pueden usar para diagnosticar enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC). Los ejemplos de enfermedades inflamatorias del SNC que pueden diagnosticarse usando los métodos proporcionados aquí incluyen esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, neurosarcoïdosis, panencefalitis esclerosante subaguda, y síndrome de Guillian-Barre. Los métodos proporcionados aquí pueden usarse para detectar inmunoglobulinas localizadas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto (por ejemplo, un paciente). En algunas realizaciones, el método incluye (a) proporcionar una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) que comprende una o más inmunoglobulinas; (b) someter la muestra de LCR a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra de LCR; y (c) identificar un pico de masa correspondiente a una o más cadenas ligeras en la muestra de LCR.

40 Antes de someter la muestra de LCR a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra de LCR, la muestra de LCR se puede diluir con una disolución (por ejemplo, amortiguador). Por ejemplo, la muestra de LCR se puede diluir hasta alrededor de 1:5, 1:3, 1:1, 3:1, o alrededor de 5:1 con amortiguador u otra disolución. En algunas realizaciones, la muestra de LCR se diluye hasta alrededor de 1:1 con amortiguador u otra disolución. Además, antes de someter la muestra de suero a una técnica de espectrometría de masas, las inmunoglobulinas en el suero se pueden enriquecer con un gel Melon como se describió anteriormente.

## EJEMPLOS

45 Métodos generales.

Suero y reactivos de inmunoglobulina: Se recogió suero de muestras residuales obtenidas del laboratorio clínico. IgG kappa e IgG lambda purificadas, procedentes de donantes normales, se adquirieron de Bethyl Laboratories (Montgomery, TX).

50 Reactivos: El bicarbonato de amonio, el ditiotreitól (DTT) y el ácido fórmico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Melon Gel se adquirió de Thermo-Fisher Scientific (Waltham MA). El agua, el acetonitrilo y el 2-propanol se adquirieron de Honeywell Burdick and Jackson (Muskegon, MI).

55 Suero: Se enriqueció un volumen de 50  $\mu$ l de suero para inmunoglobulinas usando Melon Gel siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del enriquecimiento de las inmunoglobulinas, 25  $\mu$ l de muestra se redujeron añadiendo 25  $\mu$ l de DTT 100 mM y 25  $\mu$ l de bicarbonato amónico 50 mM, y después se incubaron a 55°C durante 15 minutos antes de la inyección. Las muestras se colocaron en placas de PCR de 96 pocillos profundos (volumen de 300  $\mu$ l) a 9°C mientras se esperaba para la inyección.

Condiciones de LC: Se usó un Eksigent Ekspert 200 microLC (Dublin, CA) para la separación; la fase móvil A fue agua + 0,1% de ácido fórmico (FA), y la fase móvil B fue 90% de acetonitrilo + 10% de 2-propanol + 0,1% de FA. Se realizó una inyección de 2 µl en una columna de tamaño de partícula de 5 µm Poroshell 300SB-C3 de 1,0 x 75 mm que fluía a 25 µl/minuto mientras la columna se calentaba a 60°C. Se inició un gradiente de 25 minutos al 80% de A/20% de B, se mantuvo durante 1 minuto, se aumentó a 75% de A/25% de B durante 1 minuto, después se aumentó a 65% de A/35% de B durante 10 minutos, después se aumentó a 50% de A/50% de B durante 4 minutos, después se aumentó a 95% de A/5% de B durante 2 minutos, se mantuvo durante 5 minutos, después se elevó a 80% de A/20% de B durante 1 minuto, después se equilibró a 80% de A/20% de B durante 1 minuto.

ESI-Q-TOF MS: Los espectros se recogieron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo ABSciex TripleTOF 5600 (ABSciex, Vaughan ON, CA) en modo ESI positivo con una fuente de iones dual Turbo V con un sistema de suministro de calibrante automatizado (CDS). Las condiciones de la fuente fueron: IS: 5500, Temp: 500, CUR: 45, GS1: 35, GS2: 30, CE: 50±5. Los barridos de TOF MS se adquirieron de  $m/z$  600-2500 con un tiempo de adquisición de 100 ms. Los barridos de iones de fragmentos se adquirieron de  $m/z$  350-2000 con un tiempo de adquisición de 100 ms. El instrumento se calibró cada 5 inyecciones a través del CDS utilizando la disolución de calibración suministrada por el fabricante. Análisis de datos de MS: Para el control del instrumento se utilizó Analyst TF v1.6. Los datos se visualizaron utilizando Analyst TF v1.6 y PeakView v1.2.0.3. Se utilizaron centroides de picos de iones con carga múltiple para calcular la masa molecular promedio, y se usó el valor del área de pico para la cuantificación mediante el software BioAnalyst proporcionado con Analyst TF. La deconvolución de iones múltiples se realizó utilizando los siguientes parámetros específicos de BioAnalyst: intervalo de masas de 20.000 Da y 28.000 Da, aducto de hidrógeno, tamaño de etapa de 1, S/N de 20, y 20 iteraciones para cálculos de masa molecular de cadena ligera.

Análisis de datos bioinformáticos: La distribución normal usada para modelar el perfil de masa molecular de las cadenas ligeras kappa y lambda se generó utilizando secuencias de genes kappa y lambda de la ALBase de la Universidad de Boston. Las secuencias de genes se cargaron en la herramienta de alineación IMGT V-QUEST (Brochet, X et al. Nucleic Acids Res 2008; 36:W503-8), y cada secuencia se alineó desde la región variable (V) Marco 1 (término N) a través de la región de unión (J) hasta el comienzo de la región constante (C). Solo se utilizaron secuencias de genes que incluían toda la región V a través de la región J (46 kappa y 46 lambda). La secuencia del gen se tradujo después en la secuencia de aminoácidos correspondiente utilizando la herramienta ExPASy Translate. Esta secuencia de aminoácidos se convirtió después en masa molecular promedio usando la herramienta ExPASy Compute pI/Mw, y después se añadió a la masa molecular de la región constante del isotipo correspondiente. Cada masa molecular se colocó en intervalos de ancho de 100 Da, y se utilizó el paquete de software JMP 10.0.0 para producir histogramas y calcular la masa molecular media y modelar la distribución normal de masas moleculares calculadas.

### **Ejemplo 1 de Referencia - Monitorización de los repertorios de cadenas ligeras kappa y lambda en suero mediante espectrometría de masas**

Los inventores han descubierto distintos perfiles de masa molecular de cadenas ligeras kappa y lambda policlonales que se pueden usar para identificar y cuantificar cadenas ligeras kappa y lambda en muestras biológicas. La Figura 4 muestra un cromatograma de iones totales obtenido a partir de la inyección de 2 µl de suero combinado normal en purificado mediante Melon Gel y reducido con DTT, analizado por microLC-ESI-Q-TOF MS y usando los métodos descritos anteriormente. El área resaltada representa la ventana de tiempo de retención de 5,0 a 6,0 minutos en la que las cadenas ligeras comienzan a eluir de la columna de LC. La Figura 5 muestra el espectro de masas obtenido sumando los espectros recogidos durante esta ventana de 1 minuto con el estado de carga de las cadenas ligeras kappa policlonales esperadas que se muestran junto a la línea vertical resaltada. La Figura 5 también muestra una vista de cerca del estado de carga +11 para las cadenas ligeras kappa y lambda policlonales esperadas. La Figura 6 muestra el espectro de masas deconvolucionado de la Figura 5 transformado a masa molecular, y que muestra el perfil de masa molecular policlona kappa y lambda. El recuadro de la Figura 6 muestra el perfil de masa molecular normalmente distribuido calculado a partir de los datos de la secuencia de genes que muestra una coincidencia excelente con el perfil de masa molecular observado experimentalmente. La masa molecular media calculada para las cadenas ligeras policlonales kappa fue 23.433 Da, mientras que la masa molecular media para las cadenas ligeras lambda fue 22.819 Da. Esto se traduce en una diferencia de 614 Da, 19 Da (3%) menor que la diferencia calculada entre las cadenas ligeras kappa y lambda utilizando los datos de la secuencia genética.

### **Ejemplo 2 de Referencia - Confirmación del marcaje de isotipos de cadenas ligeras**

Para confirmar que los dos perfiles de masa molecular eran de hecho representativos de los isotipos de cadena ligera kappa y lambda, preparaciones de IgG kappa purificada e IgG lambda purificada comercialmente disponibles obtenidas de suero normal combinado se analizaron mediante microLC-ESI-Q-TOF MS y utilizando los métodos descritos anteriormente. La Figura 7 muestra los resultados que comparan los perfiles de masa molecular deconvolucionados para suero combinado normal (arriba), suero combinado normal purificado con IgG kappa (centro), y suero combinado normal purificado con IgG lambda (abajo). La figura muestra claramente la ausencia del perfil de masa molecular policlona lambda en el suero combinado normal purificado con IgG kappa y la ausencia del perfil de masa molecular policlona kappa en el suero combinado normal purificado con IgG lambda. Además, los isotipos de la muestra de suero purificado con IgG kappa y purificado con IgG lambda se confirmaron utilizando MS de arriba

hacia abajo como se describió anteriormente (Barnidge, DR et al. J Proteome Res 2014). Estas observaciones apoyan los hallazgos de que las cadenas ligeras kappa policlonales en suero tienen un perfil de masa molecular entre aproximadamente 23.200 Da y 23.800 Da, y de que las cadenas ligeras lambda policlonales en suero tienen un perfil de masa molecular entre aproximadamente 22.500 Da y 23.200 Da.

5 Además de proporcionar el perfil de masa molecular de las cadenas ligeras kappa y lambda, los métodos de microLC-ESI-Q-TOF MS proporcionados aquí también ofrecen la abundancia relativa de cada isotipo de suero enriquecido en inmunoglobulinas y reducido con DTT. En la Figura 6, se encontró que el área de pico calculada para las cadenas ligeras kappa era  $2,40 \times 10^5$ , mientras que el área de pico para las cadenas ligeras lambda fue  $7,51 \times 10^4$ , dando como resultado una relación kappa/lambda de 3,20 similar a los hallazgos publicados (Haraldsson, A et al. Ann Clin Biochem 1991; 28 (Pt 5):461-6).

**Ejemplo 3 de Referencia - Medidas de kappa y lambda en muestras de mamíferos no humanos**

15 Se realizaron experimentos adicionales en suero de otros cuatro mamíferos para evaluar las diferencias en las relaciones de expresión kappa/lambda. La Figura 8 muestra los resultados para muestras de suero combinadas derivadas de ovejas, cabras, vacas, y caballos. Estos perfiles de masa molecular ilustran que la oveja, la cabra, la vaca, y el caballo tienen perfiles de masa molecular de cadena ligera de inmunoglobulina policlonal que se encuentran en el intervalo de masa lambda. Se realizó una MS de arriba hacia abajo en la muestra de suero de oveja para confirmar que el perfil de masa molecular observado era de hecho un isotipo lambda (datos no mostrados). La observación de que las cadenas ligeras lambda son el isotipo predominante en los ungulados artiodáctilos y perisodáctilos está de acuerdo con observaciones previamente publicadas (Arun, SS et al. Zentralbl Veterinarmed A 1996; 43:573-6; Sun Y, et al. J Anim Sci Biotechnol 2012; 3:18; y Butler, JE et al Dev Comp Immunol 2009; 33:321-33)

**Ejemplo 4 de Referencia - Relaciones de cadenas ligeras kappa y lambda en pacientes con diversos trastornos**

25 Se examinaron muestras de suero de pacientes que tenían diversos trastornos utilizando los métodos descritos anteriormente. Específicamente, se analizaron los perfiles de cadenas ligeras de pacientes séricos con niveles elevados de inmunoglobulinas séricas totales, a las que a menudo se hace referencia como gammapatía policlonal o hipergammaglobulinemia. La Figura 9 muestra los iones de cadenas ligeras kappa y lambda en estado de carga +11 observados del suero tomado de un paciente con hipergammaglobulinemia (traza superior) en comparación con un suero de control normal (traza inferior). Los espectros de masas se adquirieron sumando todos los espectros del tiempo de elución de las cadenas ligeras de inmunoglobulina (datos no mostrados). Al realizar la comparación, se puede ver que la abundancia global de cadenas ligeras es aproximadamente 2 veces mayor en el suero del paciente con hipergammaglobulinemia en comparación con el suero del control normal. Además, los espectros del paciente con hipergammaglobulinemia exhiben distintas cadenas ligeras monoclonales presentes sobre el fondo policlonal, lo que da como resultado un aspecto oligoclonal al espectro.

35 Se analizaron varias otras muestras de suero de pacientes con hipergammaglobulinemia que mostraban una relación de masa molecular de cadena ligera kappa/lambda sesgada. La Figura 10 muestra los iones del estado de carga +11 observados del suero de control normal (arriba), un paciente con una respuesta inflamatoria crónica de origen desconocido (centro), y un paciente con síndrome de Sjögren, un trastorno autoinmune que involucra las glándulas salivales y lagrimales (abajo). El perfil en el centro, del paciente con inflamación crónica, muestra que la abundancia total de cadenas ligeras lambda es mayor que la abundancia de cadenas ligeras kappa. Se encontró que el área de pico calculada de las cadenas ligeras kappa era  $4,05 \times 10^5$ , mientras que se encontró que las cadenas ligeras lambda eran  $7,44 \times 10^5$ , dando como resultado una relación kappa/lambda de 0,54 o 35:65, casi lo opuesto a la relación kappa/lambda observada en el suero de control normal. El perfil del paciente con síndrome de Sjögren muestra el predominio de cadenas ligeras kappa. Se encontró que el área de pico calculada de las cadenas ligeras kappa era  $1,05 \times 10^5$ , mientras que se encontró que el área de pico calculada para las cadenas ligeras lambda era  $2,10 \times 10^4$ , dando como resultado una relación kappa/lambda de 5 u 83:17.

**Ejemplo 5 de Referencia - Identificación de cadenas ligeras en muestras con un anticuerpo monoclonal**

45 También se realizaron experimentos usando suero normal a la que se añade el anticuerpo terapéutico monoclonal recombinante HUMIRA® (adalimumab) que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG. La Figura 11 muestra la respuesta observada para la cadena ligera a partir de un análisis de LC-MS realizado como se describe anteriormente. La parte superior de la figura muestra los iones de cadena ligera con carga múltiple con los iones de cadena ligera kappa de HUMIRA con carga múltiple con sus diferentes estados de carga resaltados. La parte inferior de la Figura 11 muestra las masas moleculares que se encuentran cuando los iones con carga múltiple en el espectro m/z se convierten en su masa molecular exacta en Daltons (Da). Los hallazgos demuestran que la cadena ligera kappa de HUMIRA añadido a suero normal a 0,01 g/dl (100 mg/l) se puede identificar por encima del fondo policlonal a una masa molecular de 23.407 Da. Esta masa molecular coincide con la masa de la cadena ligera kappa de HUMIRA.

**Ejemplo 6 de Referencia - Muestra de un paciente con gammapatía monoclonal**

También se realizaron experimentos con suero de un paciente con una cadena ligera libre monoclonal lambda conocida y que también había sido tratado con el anticuerpo terapéutico monoclonal recombinante REMICADE®

(infliximab), que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG. La Figura 12 muestra la respuesta observada para las cadenas ligeras de un análisis de LC-MS realizado como se describe anteriormente. La parte superior de la figura muestra los iones de cadena ligera con carga múltiple de la cadena ligera lambda monoclonal endógena y la cadena ligera kappa de REMICADE. La parte inferior de la Figura 12 muestra las masas moleculares que se encuentran cuando los iones con carga múltiple en el espectro m/z se convierten en su masa molecular exacta en Daltons (Da). Los hallazgos demuestran que la cadena ligera lambda monoclonal endógena (22.606 Da) y la cadena ligera kappa del REMICADE administrado (23.433 Da) son claramente visibles por encima del fondo policlonal. Además, la cadena ligera lambda endógena se encuentra dentro de la distribución de masas moleculares de lambda, mientras que la cadena ligera kappa de Remicade está dentro de la distribución de masas moleculares de kappa con la masa molecular correcta (24.433 Da).

#### **Ejemplo 7 de Referencia - Identificación de cadenas pesadas en muestras a las que se añade un anticuerpo monoclonal**

Los experimentos se realizaron usando suero normal al que se añade el anticuerpo terapéutico recombinante monoclonal HUMIRA® (adalimumab), que tiene una cadena ligera kappa y una cadena pesada IgG. La Figura 13 muestra la respuesta observada para la cadena pesada a partir de un análisis de LC-MS realizado como se describe anteriormente. La parte superior de la figura muestra los iones de cadena pesada con carga múltiple con los iones de cadena pesada de HUMIRA con carga múltiple con sus diferentes estados de carga resaltados. La parte inferior de la Figura 13 muestra las masas moleculares que se encuentran cuando los iones con carga múltiple en el espectro m/z se convierten en su masa molecular exacta en Daltons (Da). Los hallazgos demuestran que la cadena pesada IgG de HUMIRA añadido a suero normal a 0,5 g/dl (5 g/l) se puede identificar por encima del fondo policlonal a una masa molecular de 50.636 Da, que se correlaciona con la masa de la cadena pesada de HUMIRA con glicosilación. La forma no glicosilada también se observa a 47.140 Da. El método se centra en identificar una inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal, siempre que se observe una glicofoma asociada con la inmunoglobulina monoclonal por encima del fondo policlonal; el método es capaz de isotipar la cadena pesada por masa molecular.

#### **Ejemplo 8 de Referencia**

Una muestra de suero de un paciente infectado por el VIH se analizó usando un método como se proporciona aquí que demostró una respuesta inmune oligoclonal (Figura 15). Este tipo de distribución de clones no es posible mediante la caracterización actual de inmunoglobulinas basada en gel.

#### **Ejemplo 9 de Referencia**

30 Muestras de suero y LCR. Se recolectaron muestras residuales del ensayo de OCB del Clinical Immunology Laboratory.

Ensayo de OCB mediante electroforesis en gel de isoelectroenfoque seguida de inmunotransferencia de IgG (IgG IEF). Se siguieron los procedimientos operativos estándar para realizar el ensayo de OCB mediante IgG IEF desarrollado por el Clinical Immunology Laboratory, y se utilizaron conjuntos de reactivos de Helena Laboratories (Beaumont, TX).

35 Reactivos. El bicarbonato de amonio, el ditiotreitól (DTT), y el ácido fórmico se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Melon Gel se adquirió de Thermo-Fisher Scientific (Waltham MA). El agua, el acetonitrilo y el 2-propanol se adquirieron de Honeywell Burdick and Jackson (Muskegon, MI). Las cadenas ligeras monoclonales kappa y lambda purificadas de orina humana se adquirieron de Bethyl Laboratories (Montgomery, TX).

40 Preparación de LCR para el ensayo de espectrometría de masas. Un volumen de 20 µl de LCR se redujo añadiendo 20 µl de DTT 200 mM solubilizado en amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,0, después se incubó a 55°C durante 30 minutos. Las muestras se colocaron en placas de PCR de 96 pocillos profundos (volumen de 300 µl) a 9°C, mientras se esperaba para la inyección.

45 Preparación de suero para ensayo de espectrometría de masas. Un volumen de 20 µl de suero se enriqueció en inmunoglobulinas usando 180 µl de Melon Gel, y después 20 µl de muestra se redujeron añadiendo DTT como se describió previamente. Véase Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, et al. Using Mass Spectrometry to Monitor Monoclonal Immunoglobulins in Patients with a Monoclonal Gammopathy. J Proteome Res. 2014 Feb 11.

50 Cromatografía de líquidos. Se utilizó un EksigentMicroLC 200 Plus System (Foster City, CA) para separar las inmunoglobulinas antes de la ionización y la detección en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo ABSciex TripleTOF 5600 (ABSciex, Vaughan ON, Canadá) como se describió anteriormente. Véase Barnidge DR, Dasari S, Botz CM, et al. Using Mass Spectrometry to Monitor Monoclonal Immunoglobulins in Patients with a Monoclonal Gammopathy. J Proteome Res. 2014 Feb 11.

55 Análisis de datos de MS. Para el control del instrumento se utilizó Analyst TF v1.6. Los datos se visualizaron utilizando Analyst TF v1.6 y PeakView v1.2. Los espectros de masas usados para el análisis se obtuvieron sumando todos los espectros de masas a lo largo de los tiempos de retención de LC conocidos para las cadenas ligeras. El centroide de los picos del valor m/z de los estados de carga específicos se utilizó para evaluar la abundancia de una inmunoglobulina monoclonal específica en el LCR y suero como se describió previamente. Véase Barnidge DR, Dasari

S, Ramirez-Alvarado M, et al. Phenotyping polyclonal kappa and lambda light chain molecular mass distributions in patient serum using mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2014 Nov 7; 13(11):5198-205. Se realizaron cálculos moleculares precisos deconvolucionando todos los iones con carga múltiple de la proteína usando BioAnalystTM.

5 Resultados. La Figura 16 ilustra las etapas en los ensayos de OCB basados en gel y basados en espectrometría de masas. El ensayo en gel (parte superior de la Figura 16) utilizó electroforesis en gel de IEF (1), seguida de transferencia pasiva en nitrocelulosa (2) de anticuerpos anti-IgG, y anticuerpos secundarios para visualizar las IgG (3). El procedimiento es manual y tarda varias horas en completarse. El ensayo de espectrometría de masas utiliza Melon Gel para enriquecer muestras de suero en IgG mientras las muestras de LCR se diluyen 1:1 (1). Ambas muestras se reducen con DTT antes del análisis por microLC-ESI-Q-TOF MS (3). Todo el procedimiento es automatizable y tarda 10 1 hora. La Figura 17 muestra los resultados de miRAMM para LCR y suero coincidentes adquiridos de un paciente que fue negativo para OCB mediante IgG IEF. La figura muestra las distribuciones de masa molecular policlonal kappa y lambda normalmente distribuidas para el estado de carga +11 de las cadenas ligeras reducidas. La Figura 18 muestra los resultados de miRAMM para LCR y suero coincidentes de un paciente con OCB de LCR y suero coincidentes mediante IgG IEF. Se observan múltiples cadenas ligeras kappa y lambda por encima del fondo policlonal en ambas 15 muestras. La banda grande detectada en la región de la cadena ligera kappa del LCR tenía una masa molecular calculada de 23.529,37 Da, mientras que la cadena ligera encontrada en el suero tenía una masa molecular calculada de 23.528,75 Da, una diferencia de 0,62 Da. Estos hallazgos demuestran la excepcional especificidad de miRAMM para "bandas" coincidentes en LCR y suero. La capacidad de miRAMM para identificar clones específicos de LCR se muestra en la Figura 19 y la Figura 20. La Figura 19 muestra los resultados de miRAMM para suero y LCR coincidentes de un paciente con bandas OCB de kappa exclusivas de LCR mediante IgG IEF, mientras que la Figura 20 muestra 20 los resultados de miRAMM para suero y LCR coincidentes de un paciente con bandas OCB de lambda exclusivas de LCR mediante IgG IEF. Las dos figuras demuestran claramente la presencia de múltiples picos de cadenas ligeras clonales en la muestra de LCR que no están presentes en la muestra de suero.

25 Se analizó una cohorte de 56 pacientes mediante miRAMM para comparar su comportamiento con las OCB mediante IgG IEF. Si se identificaron de forma única múltiples cadenas ligeras clonales en el LCR con una relación señal/ruido superior a 3, la muestra se denominó positiva. La cohorte contenía 24 resultados positivos y 32 negativos de OCB mediante IgG IEF. Cuando los pacientes se analizaron con ocultación por miRAMM, los mismos pacientes fueron registrados como: 22 positivos, 34 negativos. Los 2 discordantes tenían cadenas ligeras clonales aparentes en el LCR por miRAMM, pero la abundancia de estas cadenas ligeras estaba ligeramente por debajo del corte de S/N de 3.

30 miRAMM también se puede utilizar para cuantificar inmunoglobulinas. Los patrones de cadena ligera kappa y lambda monoclonales purificados se diluyeron en un LCR positivo para OCB. Se realizaron series de diluciones utilizando la cadena ligera kappa o lambda que oscilan de 1 a 50 µg/ml. Las áreas de pico para los patrones de kappa y lambda se diluyeron linealmente con valores R2 de 0,999 y 0,992. La precisión interdiaria e intradiaria se calculó utilizando un LCR positivo para OCB, y la precisión intradiaria de 20 réplicas fue 8,1%, mientras que la precisión interdiaria calculada 35 durante 10 días fue 12,8%. El espectro de masas en la Figura 21 muestra espectros de masas superpuestos de cuatro concentraciones diferentes de patrón de cadena ligera kappa añadidas a una muestra de LCR. El pico del patrón de cadena ligera kappa que se muestra en la traza verde es el patrón de 12,5 µg/ml, mientras que la traza azul representa el patrón de 1,5 µg/ml. El cambio en la abundancia de cada patrón de cadena ligera kappa se observa junto a la abundancia fija de las propias cadenas ligeras kappa del paciente.

#### 40 **Ejemplo 10.**

Métodos. Quinientas cincuenta y seis (556) muestras de suero que habían sido previamente analizadas mediante ensayos clínicos PEL/IFE de rutina se evaluaron mediante MADLI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonics). Antes del análisis, las inmunoglobulinas intactas del se aislaron suero con resina de afinidad Capture Select™ (Hu)LC-kappa y 45 LC-lambda (Life Technologies), y se redujeron con hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl, Thermo Scientific). Se prepararon muestras purificadas para el análisis MALDI-TOF utilizando el método de gotitas secas y ácido α-ciano-4-hidroxicinámico como matriz. El análisis de masas se realizó en modo de ion positivo con la suma de 500 disparos de láser.

Resultados. Para el análisis espectral, la distribución iónica de los estados de carga MH+1 y MH+2 de la cadena ligera se comparó con el espectro del suero normal. Se distinguió cualquier anomalía monoclonal del patrón normal. De las 50 556 muestras analizadas, se identificaron patrones anormales en 406 de 421 muestras (96%) que fueron positivas por IFE. También se observaron anomalías en 23 de 126 muestras (18%) que fueron negativas por IFE. De las 9 muestras que fueron indeterminadas por IFE, se observaron anomalías en 2.

#### **Ejemplo 11.**

Los espectros de masas se generaron analizando proteínas eluidas de fragmentos de anticuerpo de dominio único con afinidad por diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Brevemente, los espectros de masas usados para derivar 55 las distribuciones m/z específicas de isotipo para cada isotipo se generaron a partir de 43 muestras de suero de adultos sanos. Las muestras se diluyeron 10 veces con 1X PBS (100 µl de muestra del paciente + 900 µl de 1X PBS). Se añadieron 10 µl de cada fragmento de anticuerpo de dominio único (dirigido a la región constante IgG, IgA, IgM, kappa y lambda) acoplado a perlas de agarosa (50% de perlas + 50% de 1X PBS) a 200 µl de la muestra diluida, y se

5 incubaron durante 30 minutos a RT. El sobrenadante se eliminó de las perlas. Después, las perlas se lavaron dos veces en 200  $\mu$ l de 1X PBS, y después dos veces en 200  $\mu$ l de agua. A continuación, se añadieron a las perlas 80  $\mu$ l de ácido acético al 5% con TCEP 50 mM, y se incubaron durante 5 minutos a RT. A continuación, se vertieron 0,6  $\mu$ l de sobrenadante en cada pocillo de una placa MALDI de 96 pocillos que se salpicaron con 0,6  $\mu$ l de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico). Posteriormente, se colocaron otros 0,6  $\mu$ l de matriz encima de la muestra. El análisis de masas se realiza en modo de ion positivo con la suma de 500 disparos de láser utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF. Se adquiere un intervalo de masa/carga (m/z) de 9.000 a 32.000 m/z. A continuación, se superpuso el espectro de masas generado para cada SDAF, y las proteínas M se detectaron y se isotiparon por la presencia de picos distintos con regiones m/z específicas ocupadas por el repertorio de cadenas ligeras y pesadas.

10 OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar cadenas ligeras de inmunoglobulina, cadenas pesadas de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas en una muestra, comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar una muestra que comprende una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, o mezclas de las mismas;
- b) inmunopurificar la muestra con un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo anti-IgG humana, un anticuerpo anti-IgA humana, un anticuerpo anti-IgM humana, un anticuerpo anti-IgD humana, un anticuerpo anti-IgE humana, un anticuerpo anti-kappa humana, un anticuerpo anti-lambda humana, y combinaciones de los mismos, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo de dominio único; y
- 10 c) someter la muestra inmunopurificada a una técnica de espectrometría de masas para obtener un espectro de masas de la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa d) cuantificar la cantidad de una o más cadenas ligeras de inmunoglobulina o cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende una inmunoglobulina monoclonal exógena.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el fragmento de anticuerpo de dominio único se selecciona de manera que el espectro de masas generado en la etapa c) para el fragmento de anticuerpo de dominio único no se solapa con el espectro de masas generado en la etapa c) para la cadena ligera de inmunoglobulina o cadena pesada de inmunoglobulina.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además isotipar una o más de las cadenas ligeras de inmunoglobulina y/o cadenas pesadas de inmunoglobulina en la muestra.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además identificar una proteína M en la muestra, y opcionalmente determinar el emparejamiento de cadenas pesadas de inmunoglobulina y cadenas ligeras de inmunoglobulina en la proteína M en la muestra.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la relación de las cadenas ligeras kappa y lambda se determina midiendo el área de pico de uno o más picos de iones con carga múltiple correspondientes a cada cadena, en particular en el que las cadenas ligeras kappa y lambda se cuantifican convirtiendo el área de pico de los picos de iones con carga múltiple en una masa molecular.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que las cadenas ligeras de inmunoglobulina se desacoplan de las cadenas pesadas de inmunoglobulina antes de la etapa c).
- 30

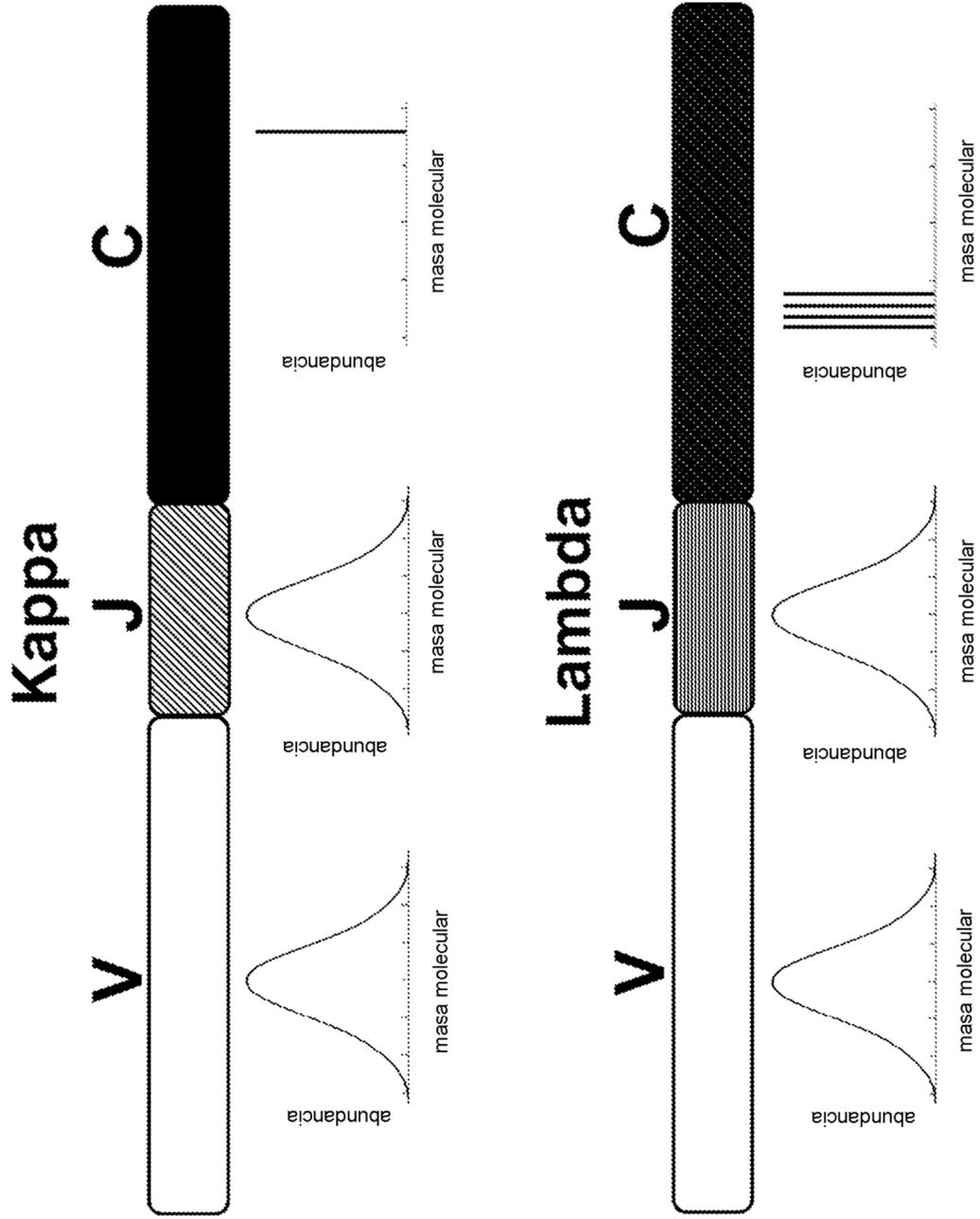


FIG. 1

**Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera kappa**

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

105 aminoácidos

Masa molecular promedio: 11608,86 Da

**Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera lambda: L1, L2, L3 y L7**

L1 OPKAA~~PS~~VT~~LF~~PPS~~EE~~LOANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  
 L2 OPKAA~~PS~~VT~~LF~~PPS~~EE~~LOANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD~~SP~~VKAGVETTKPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  
 L3 OPKAA~~PS~~VT~~LF~~PPS~~EE~~LOANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD~~SP~~VKAGVETTKPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  
 L7 OPKAA~~PS~~VT~~LF~~PPS~~EE~~LOANKATLVCL~~IS~~DFYPGAVTVAWKADGSP~~FK~~GVETTKPSKQSNKKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

105 aminoácidos

Masa molecular promedio de L1: 11290,61 Da

Masa molecular promedio de L2: 11236,52 Da

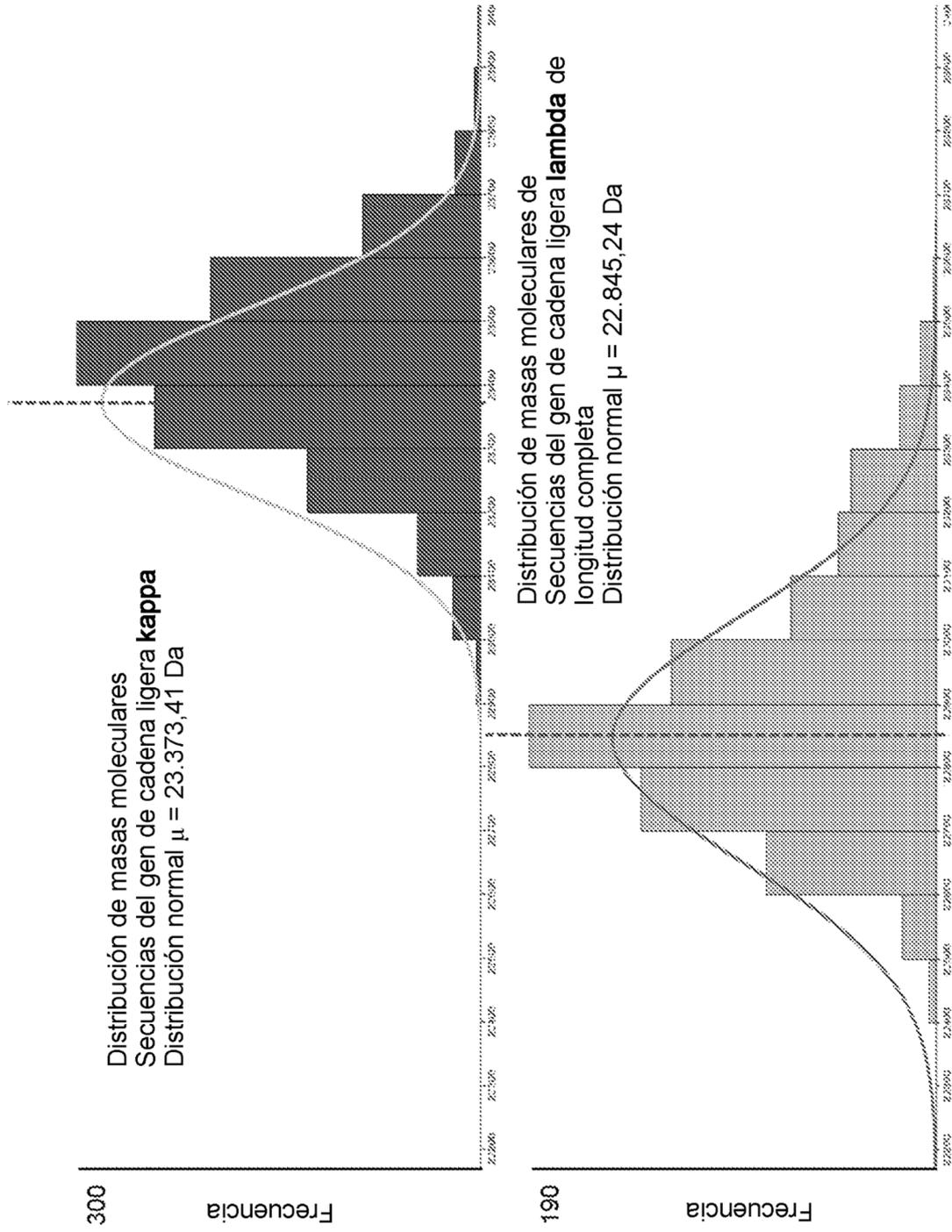
Masa molecular promedio de L3: 11208,50 Da

Masa molecular promedio de L4: 11245,62 Da

Masa molecular promedio: 11.245,31 Da

Diferencia de masas entre regiones constantes kappa y lambda = 363,55 Da

**FIG. 2**



**FIG. 3**

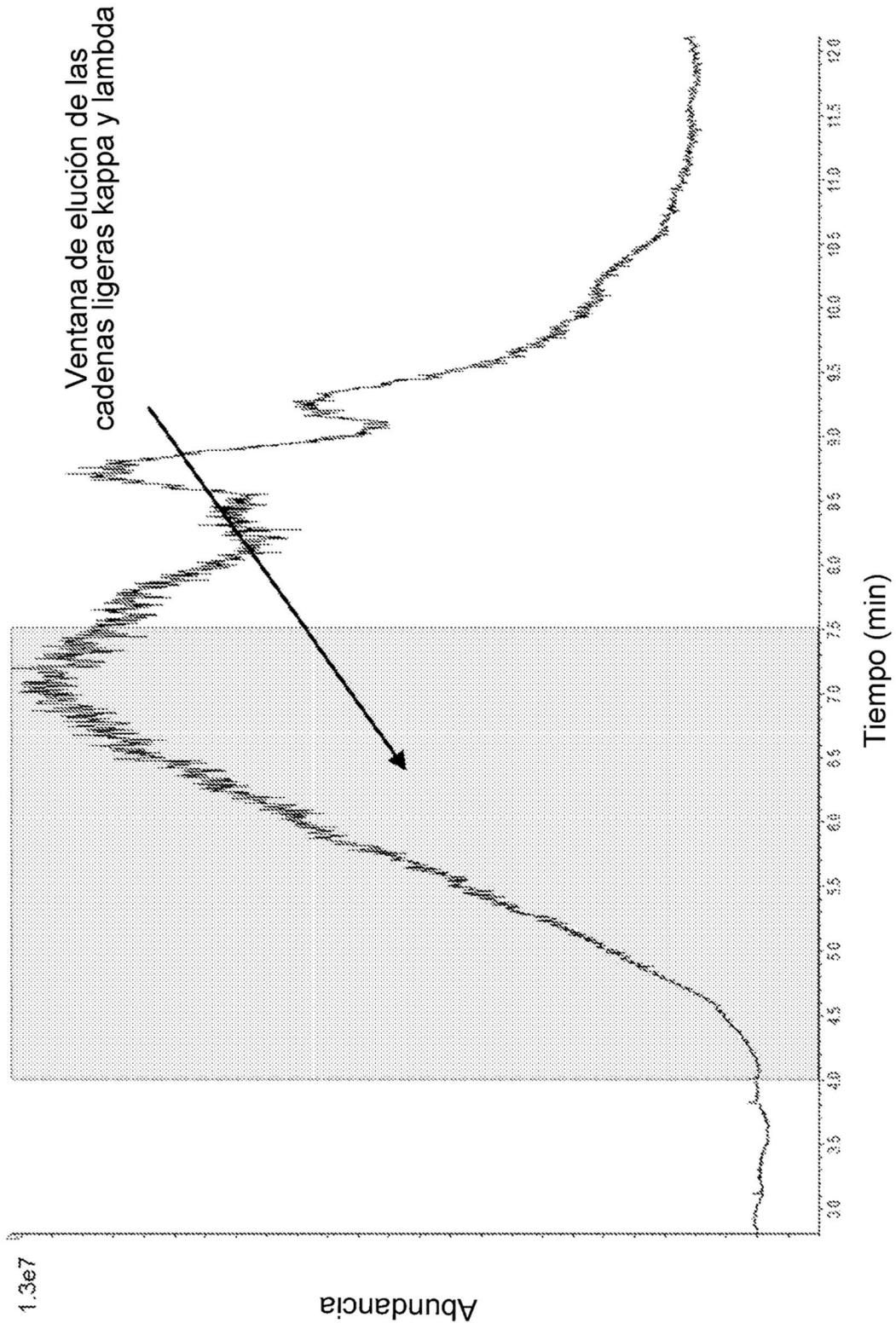


FIG. 4

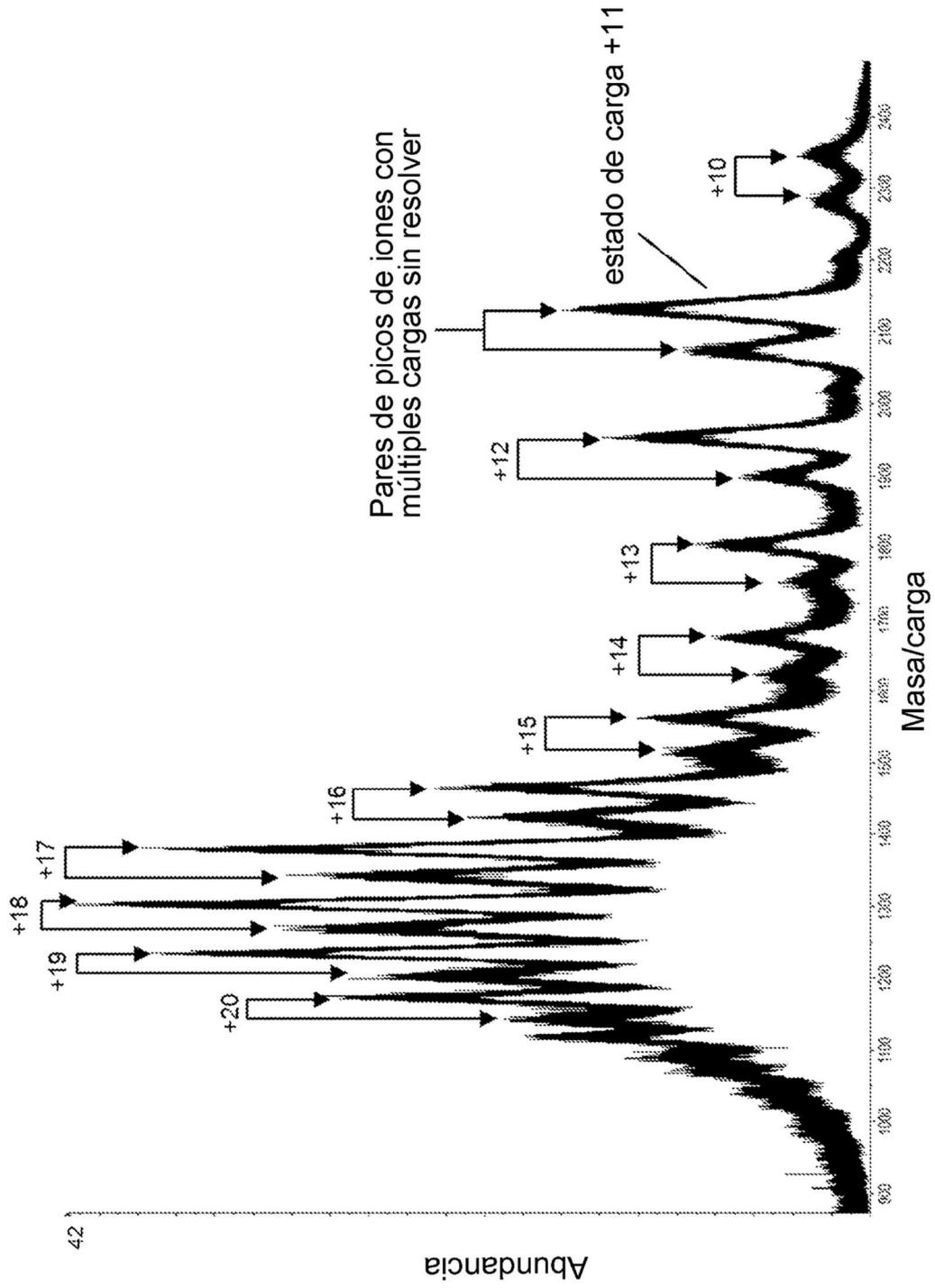


FIG. 5

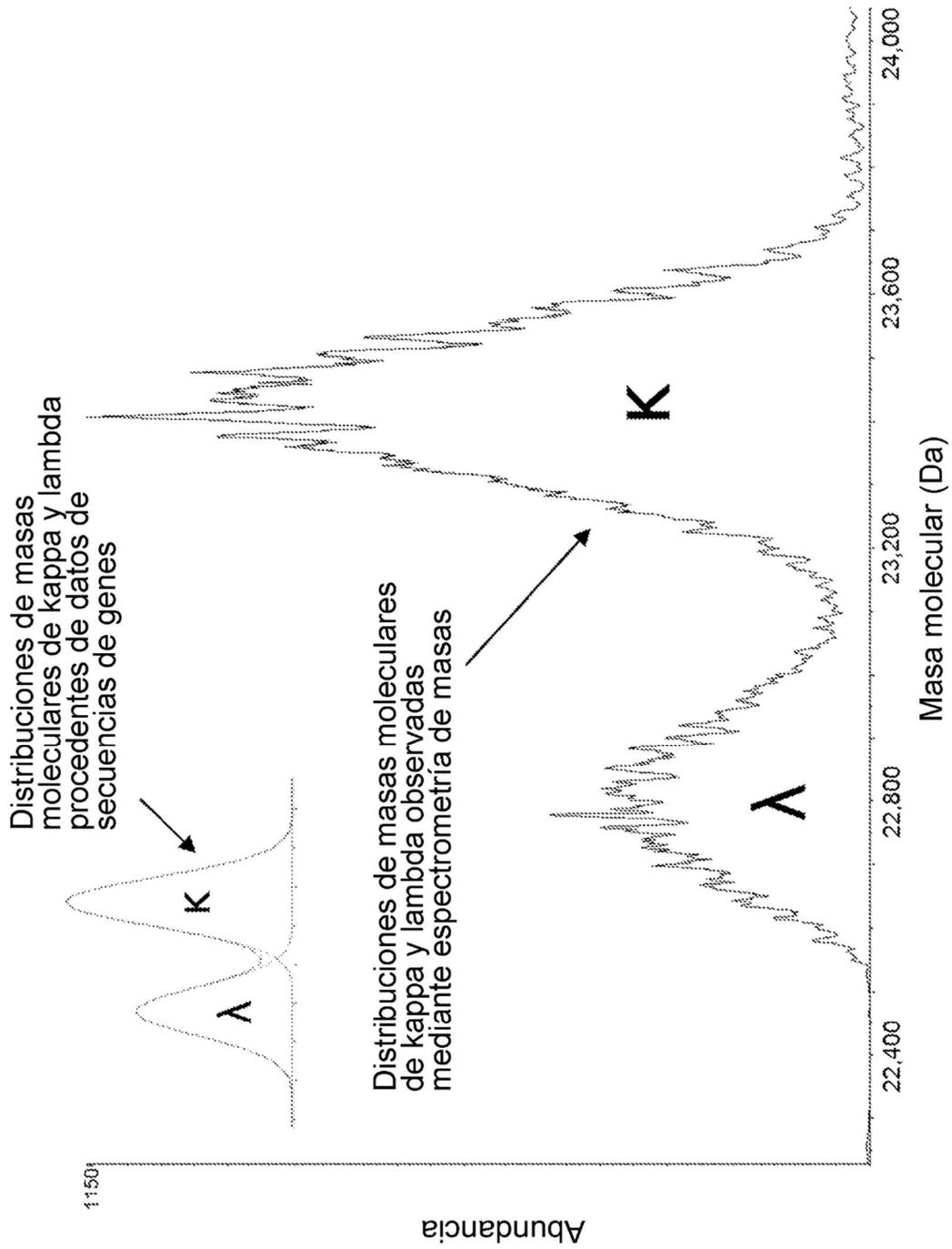


FIG. 6

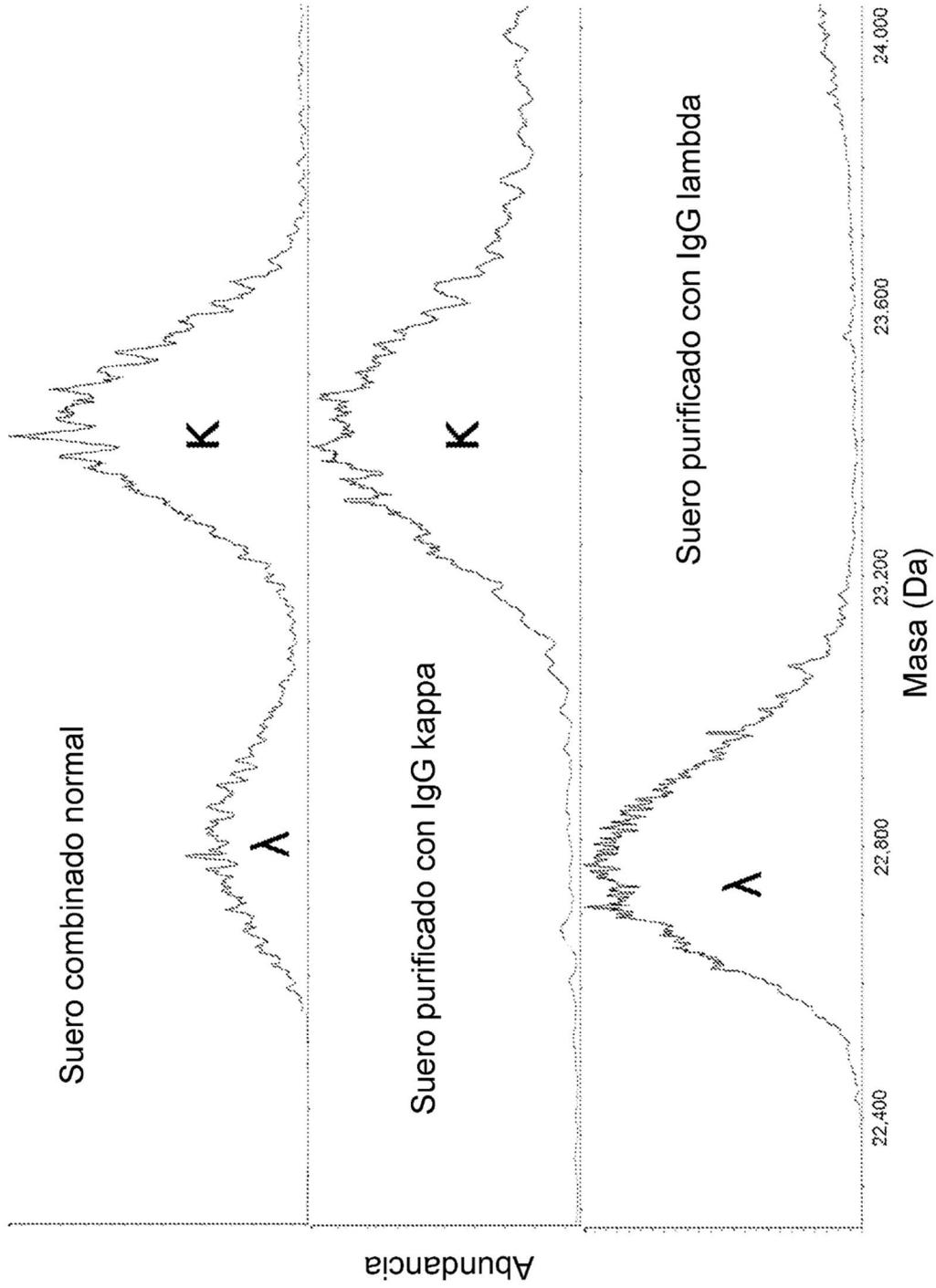
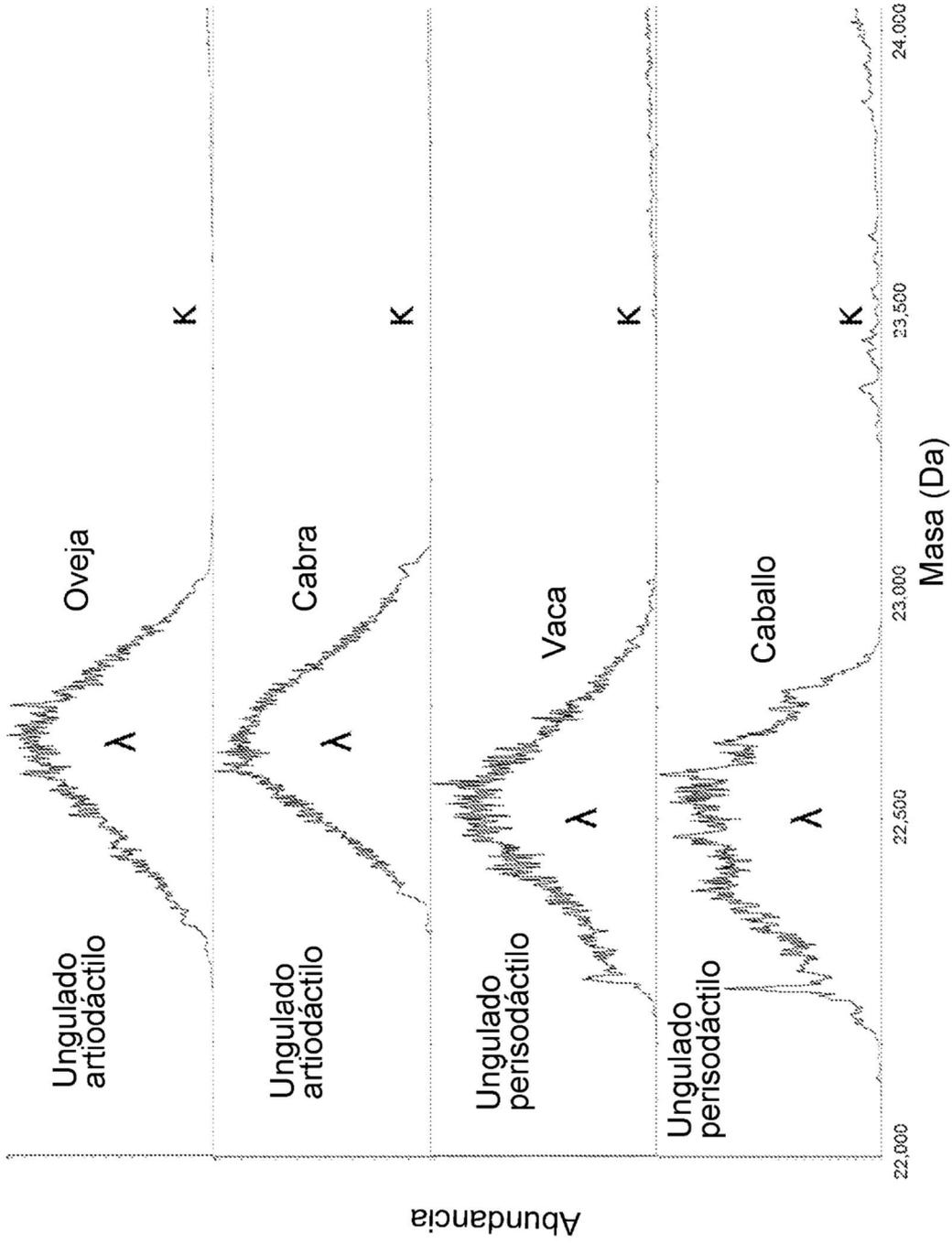
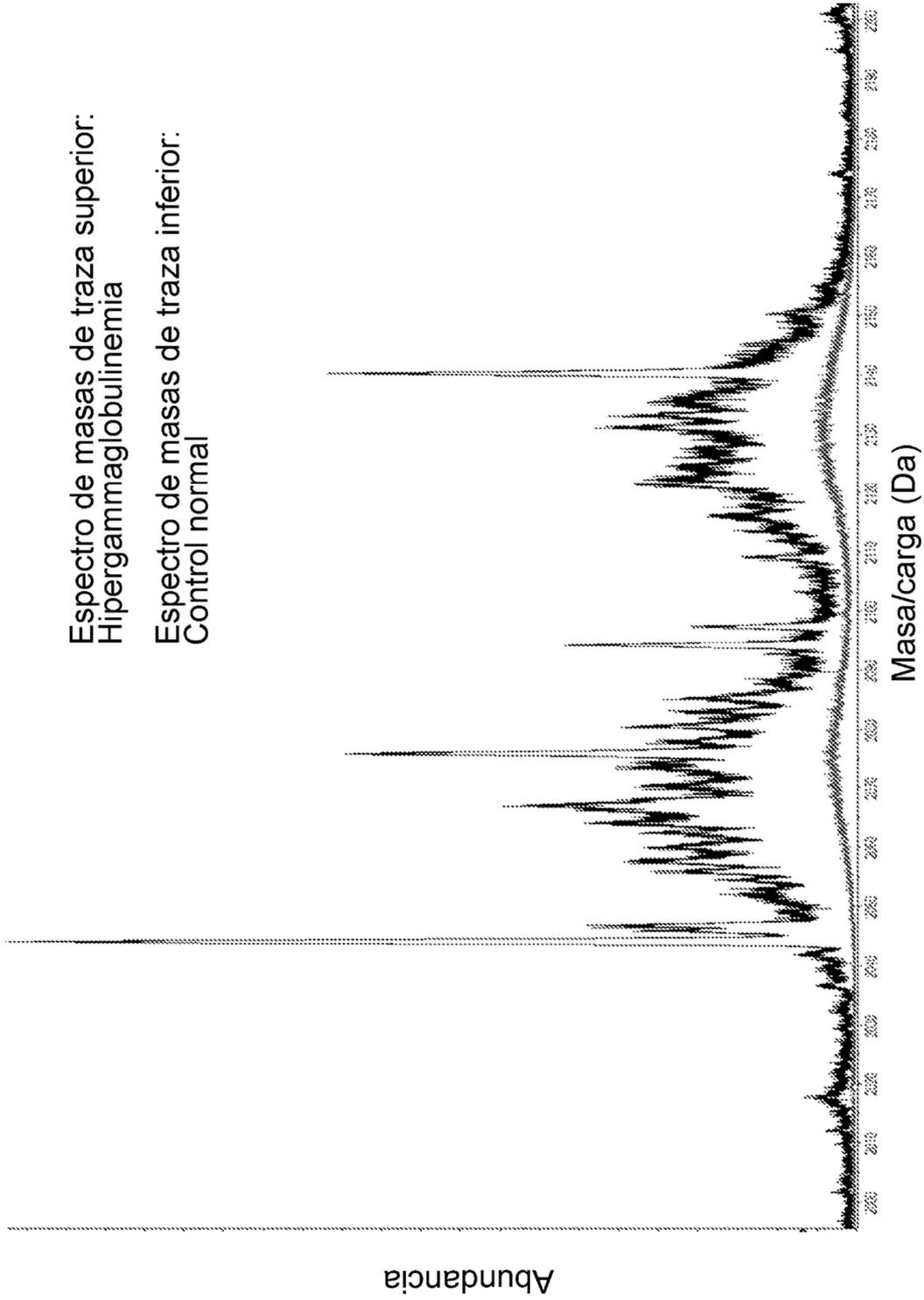


FIG. 7



**FIG. 8**



**FIG. 9**

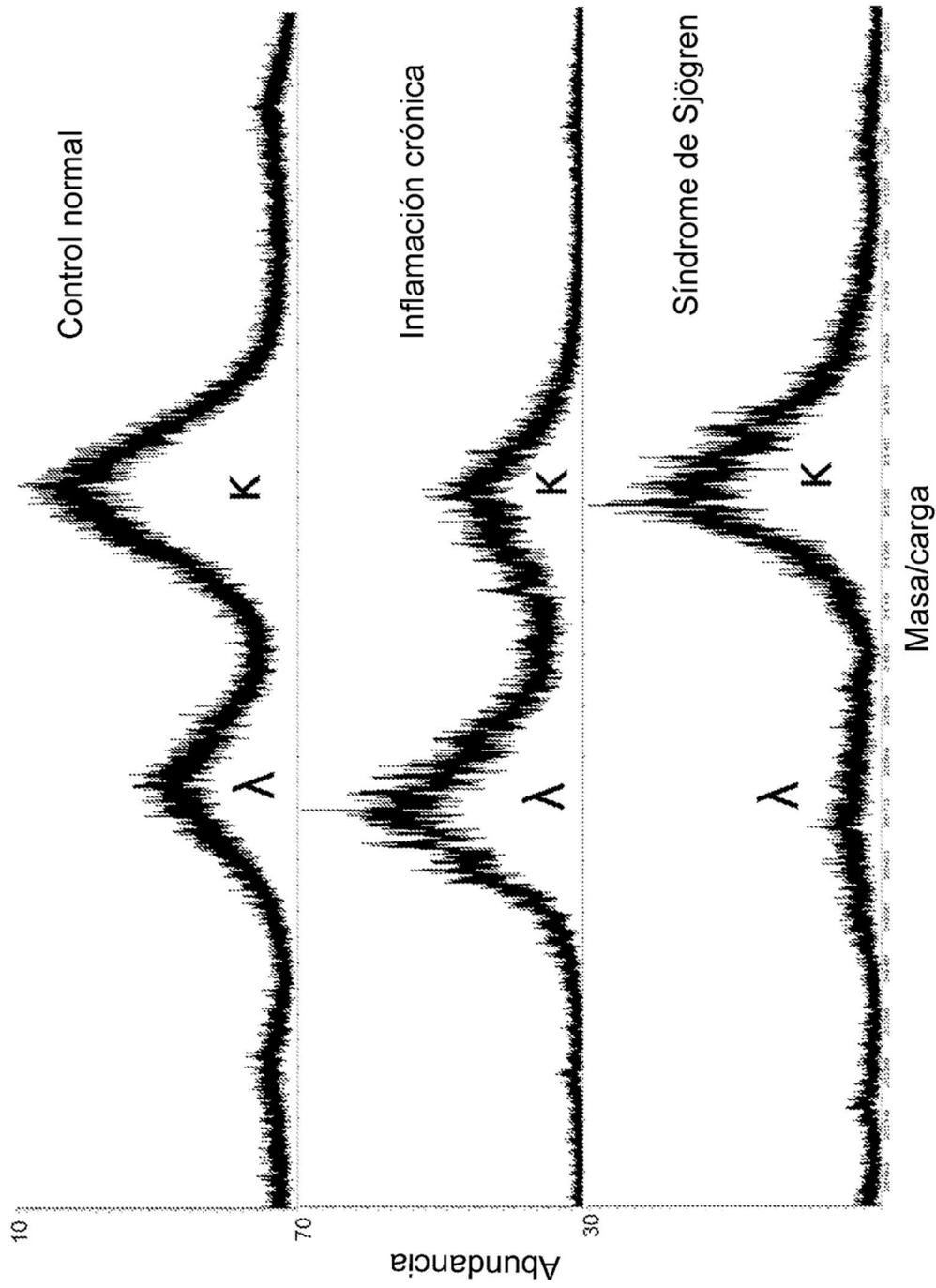


FIG. 10

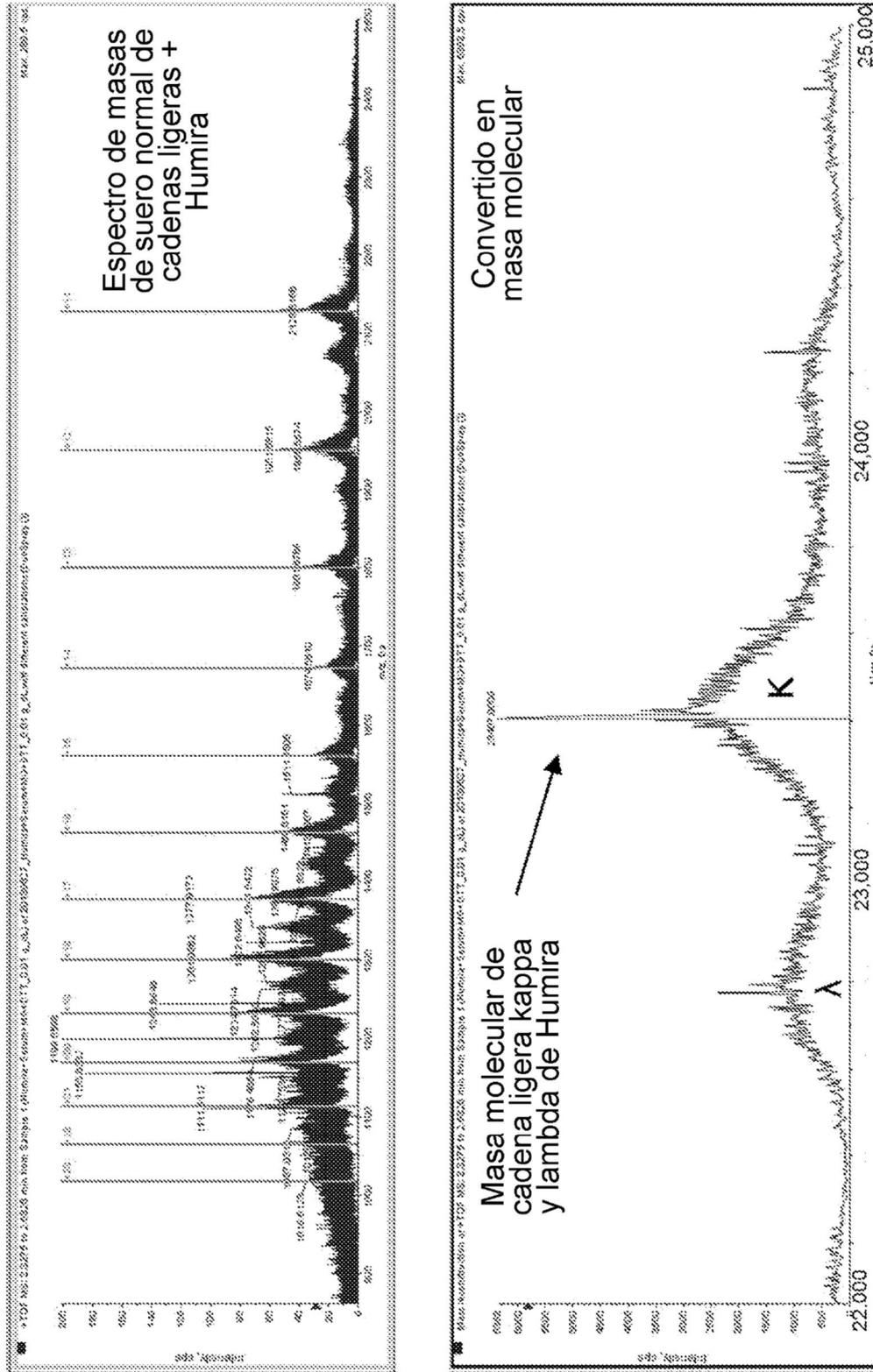


FIG. 11

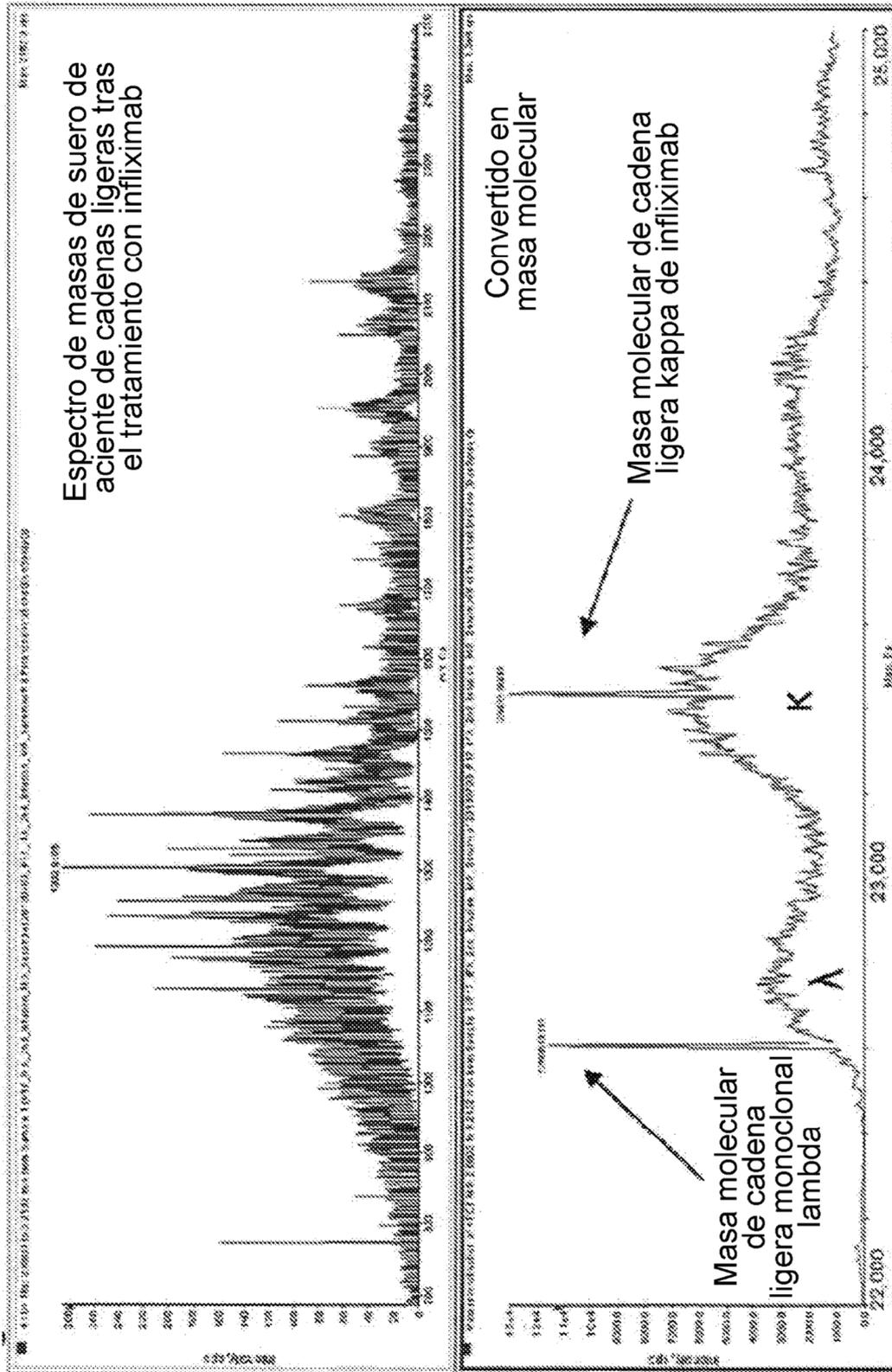


FIG. 12



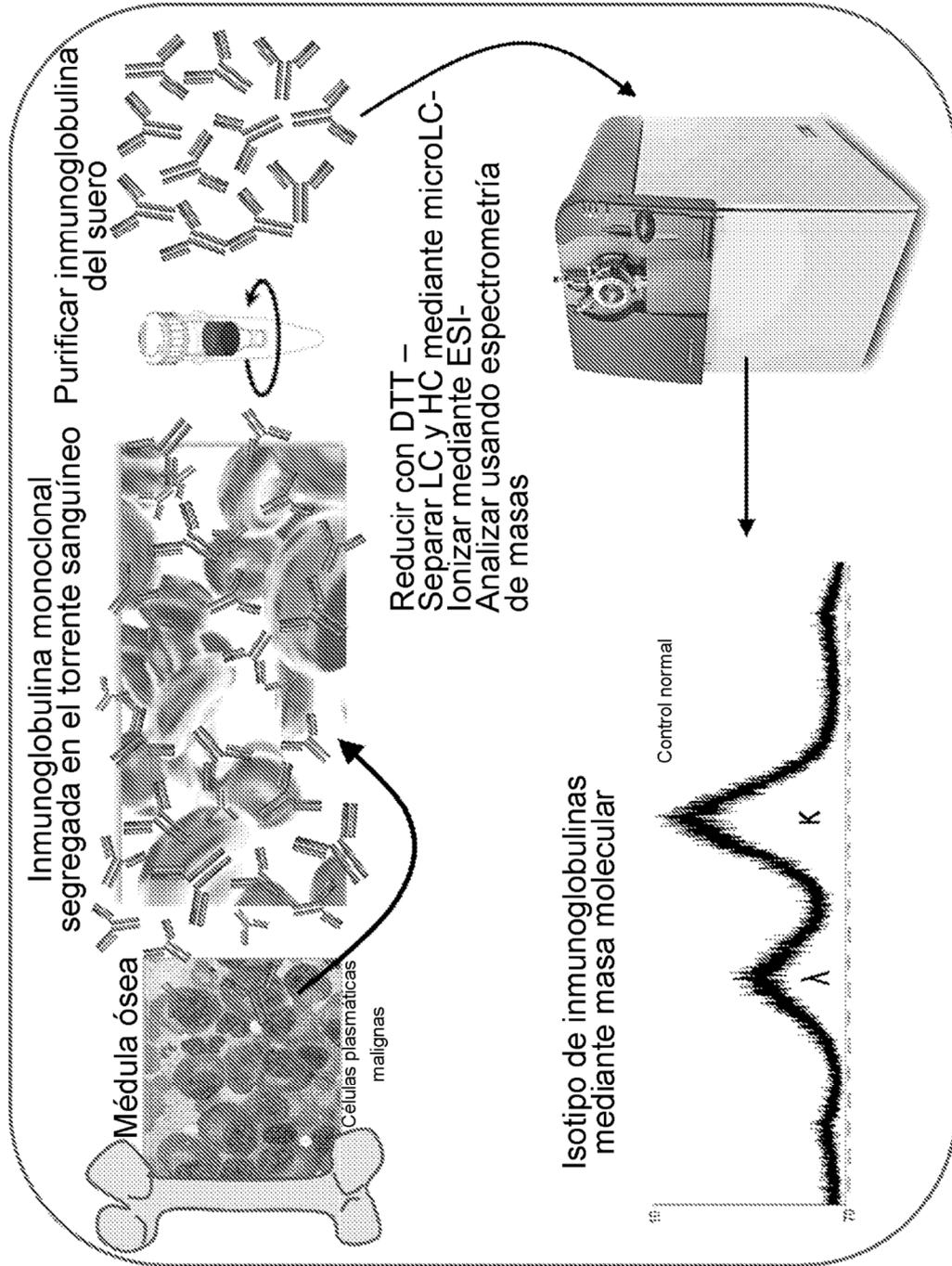
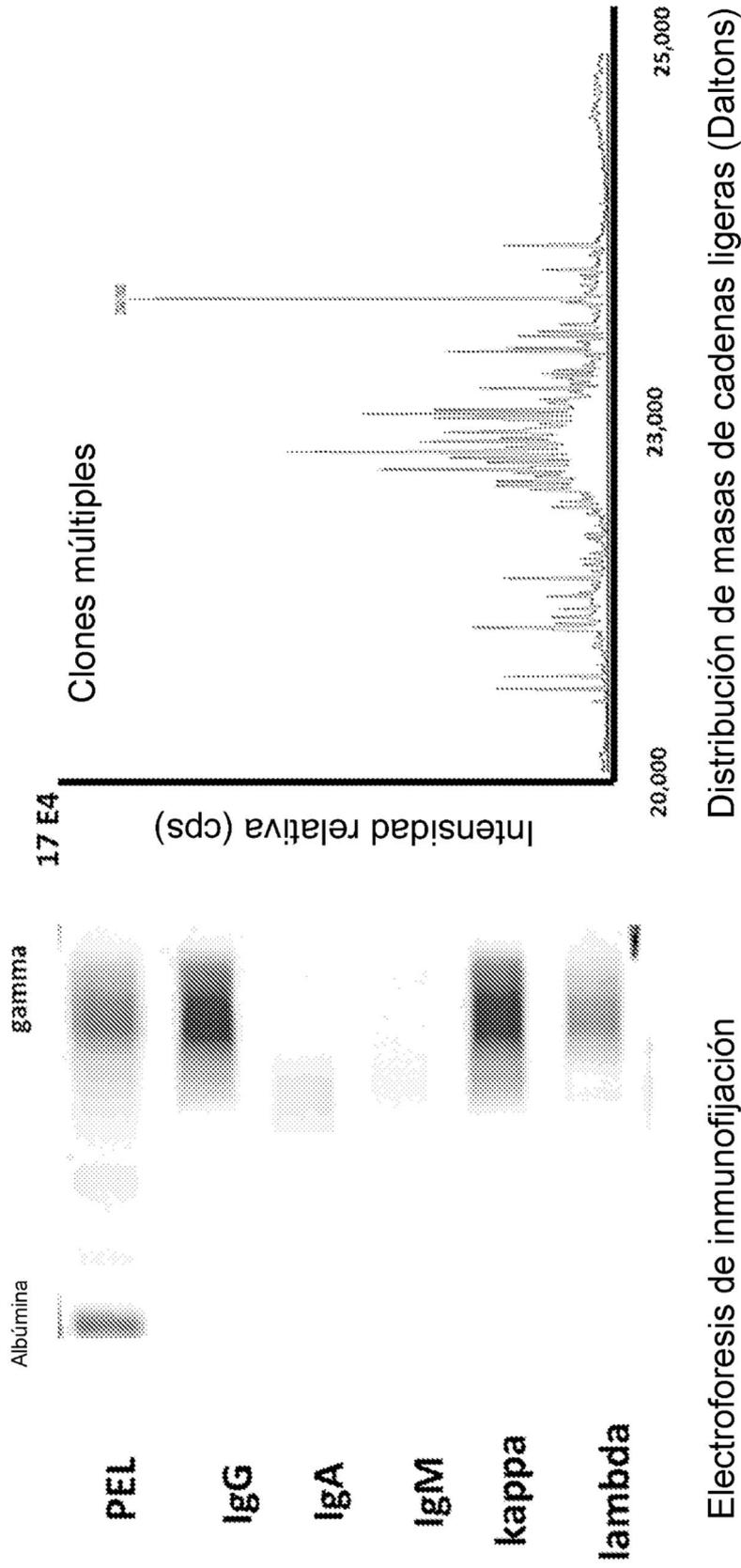
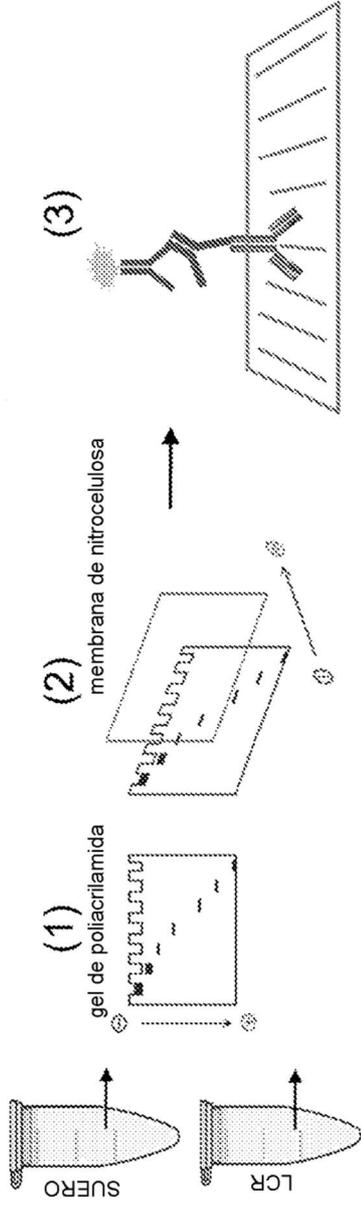


FIG. 14



**FIG. 15**

Ensayo de OCB a base de gel



Ensayo de OCB a base de miRAMM

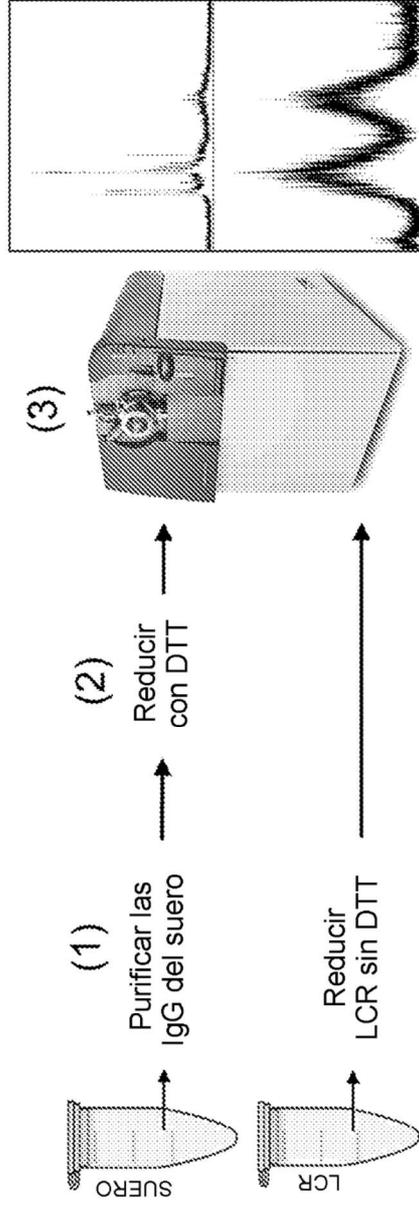


FIG. 16

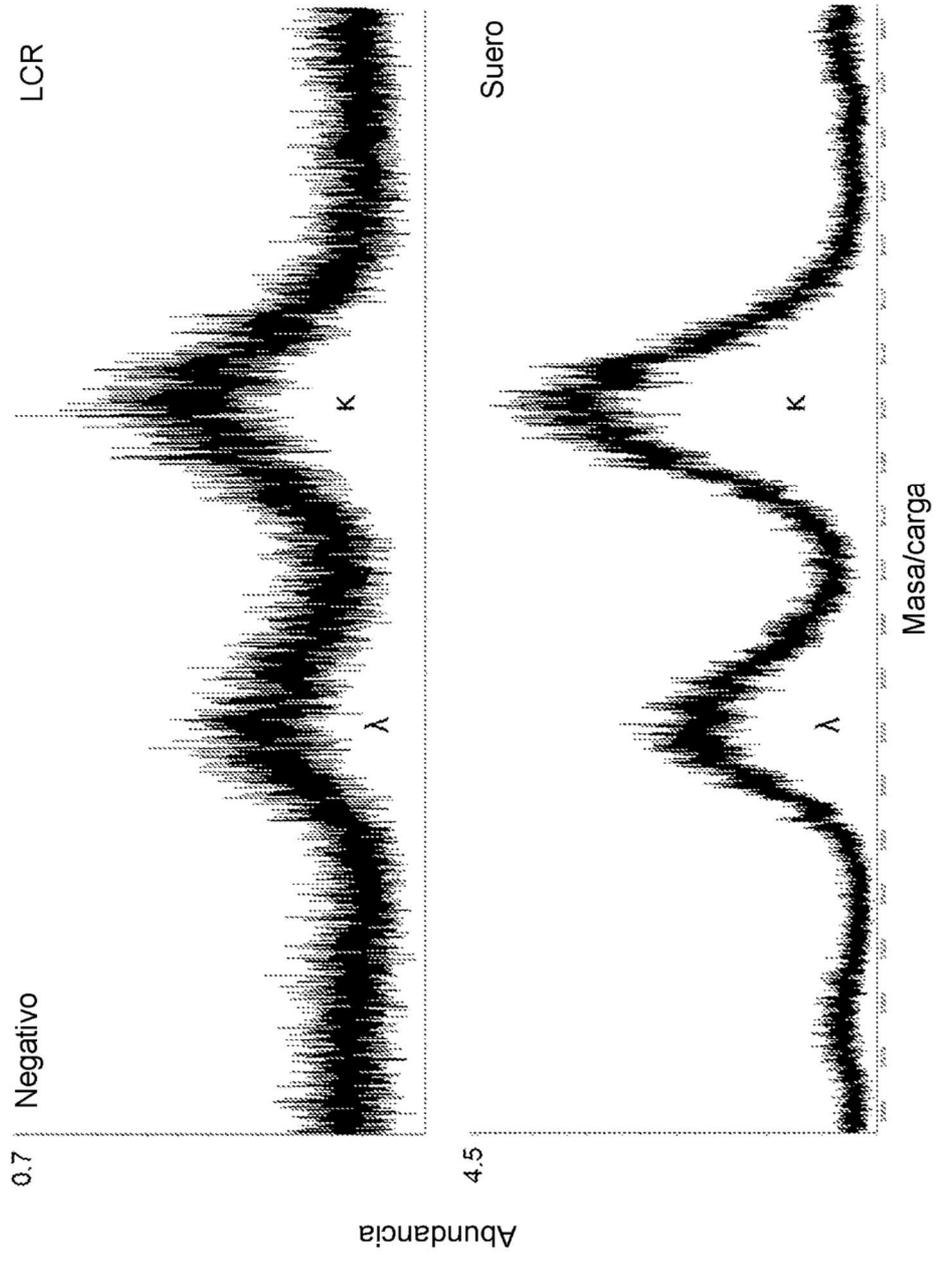


FIG. 17

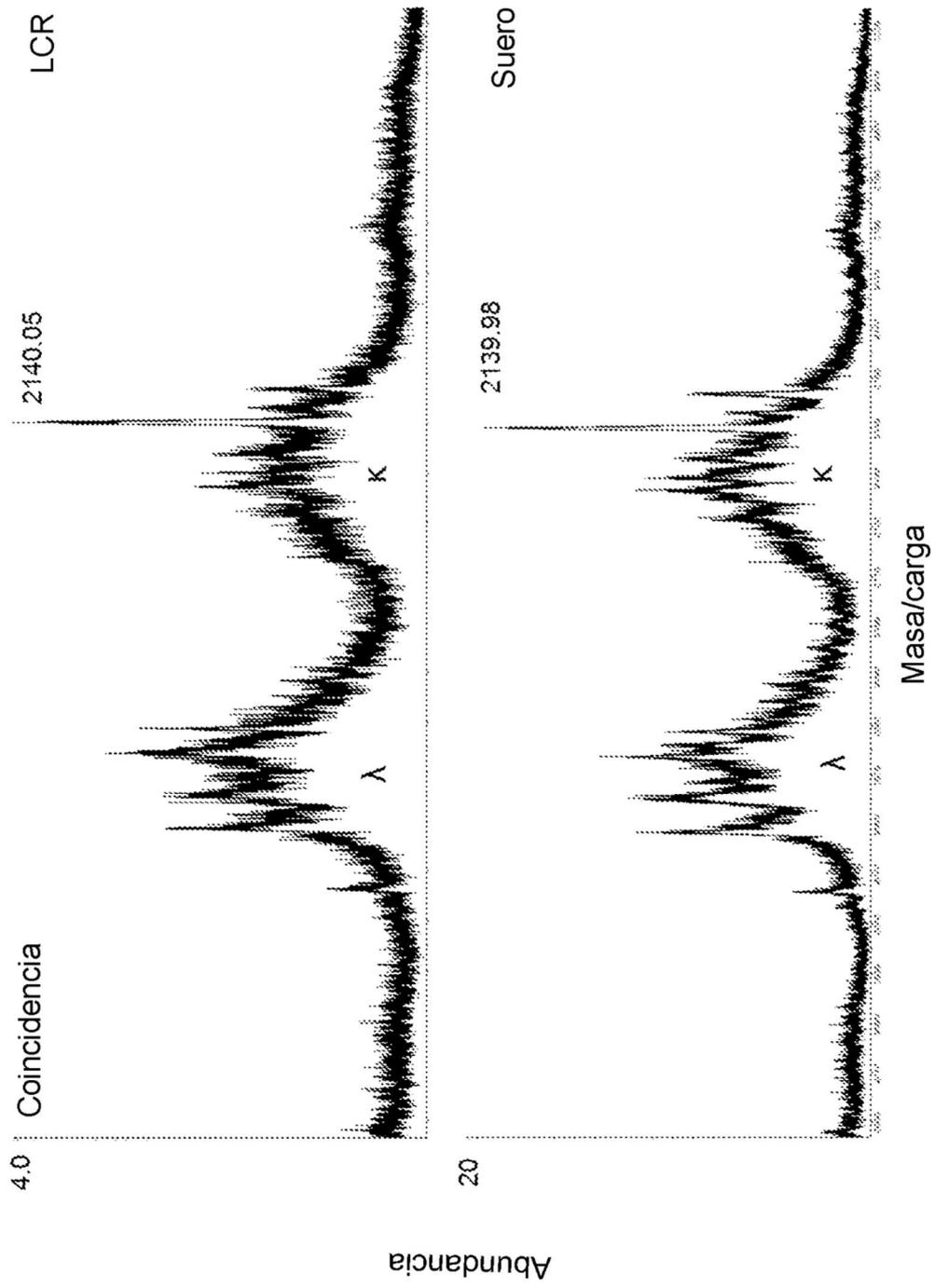


FIG. 18

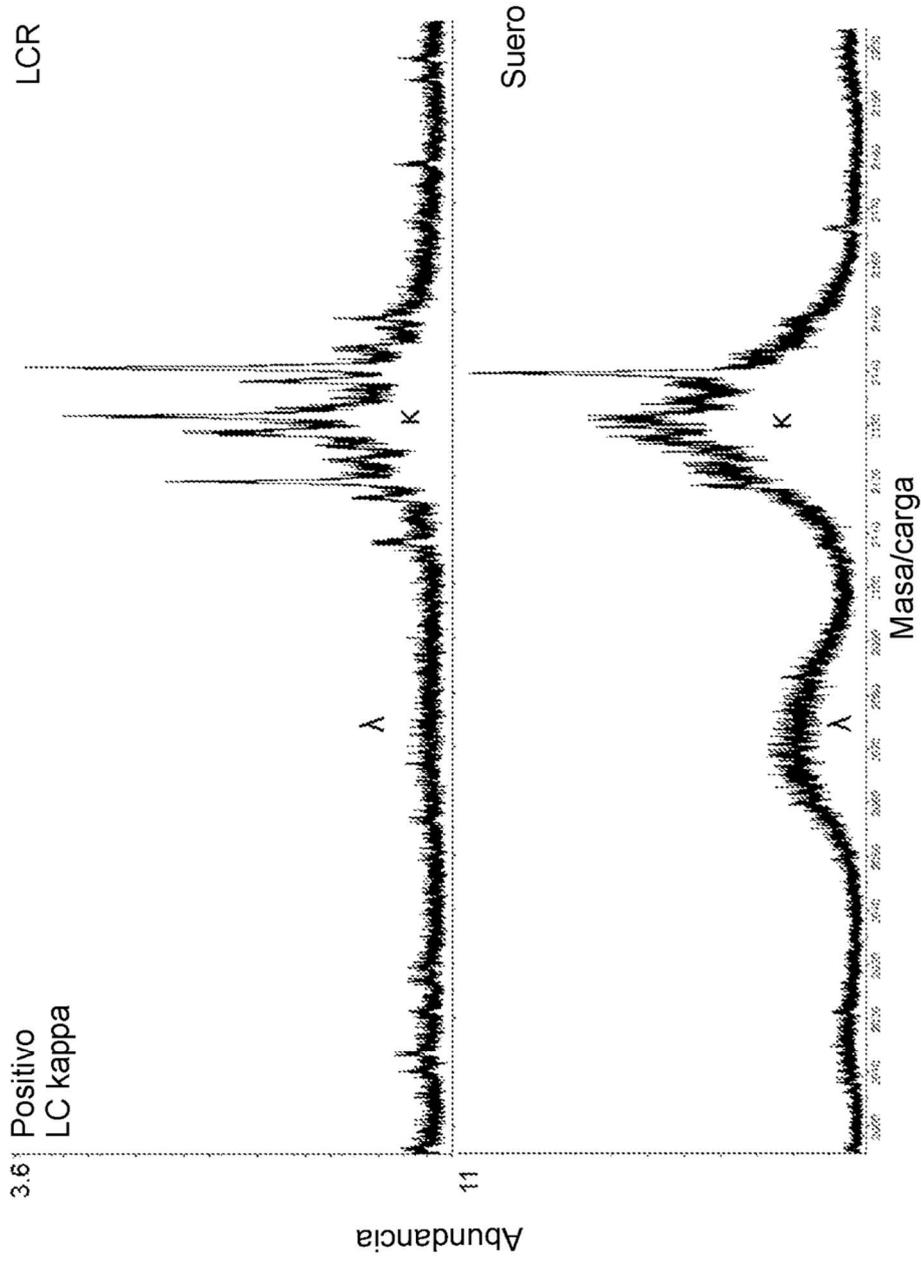
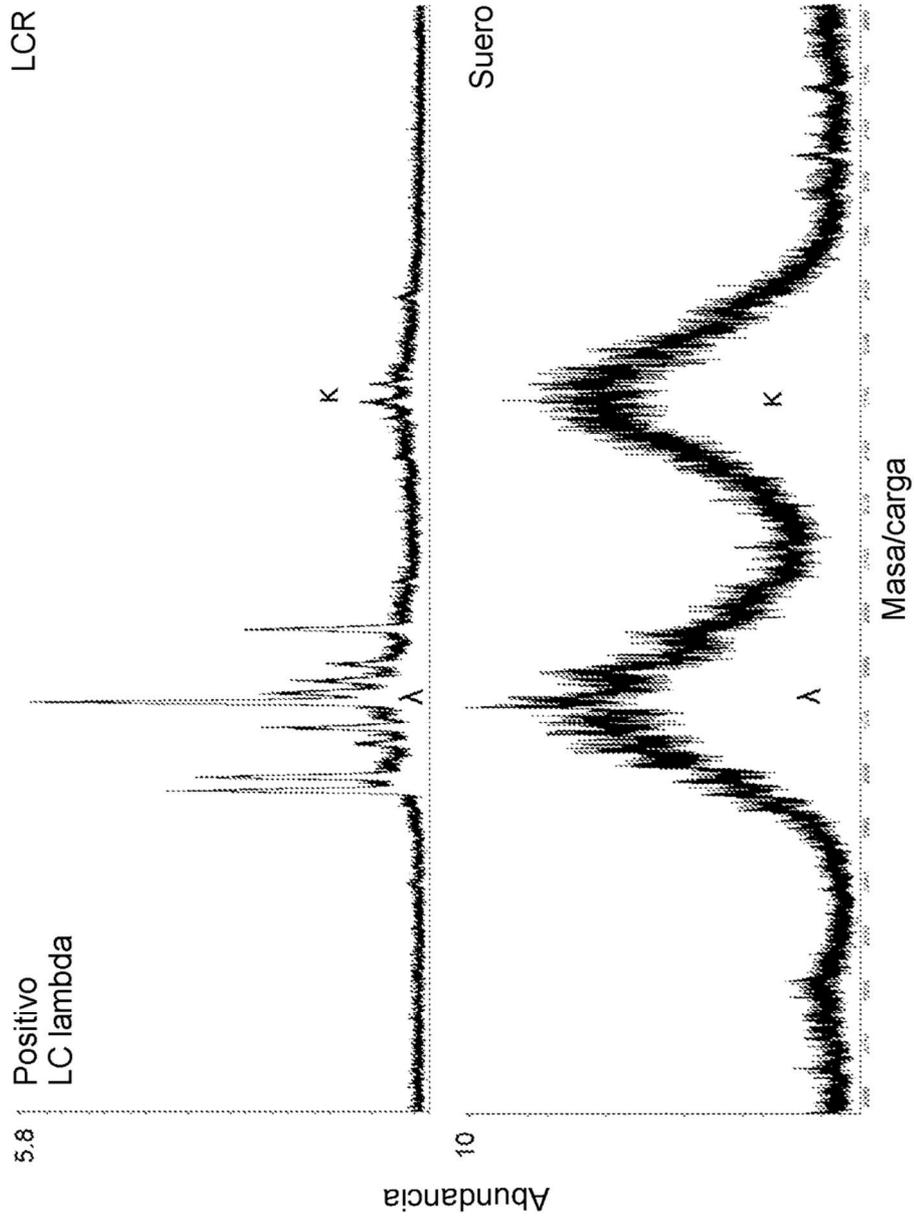


FIG. 19



**FIG. 20**

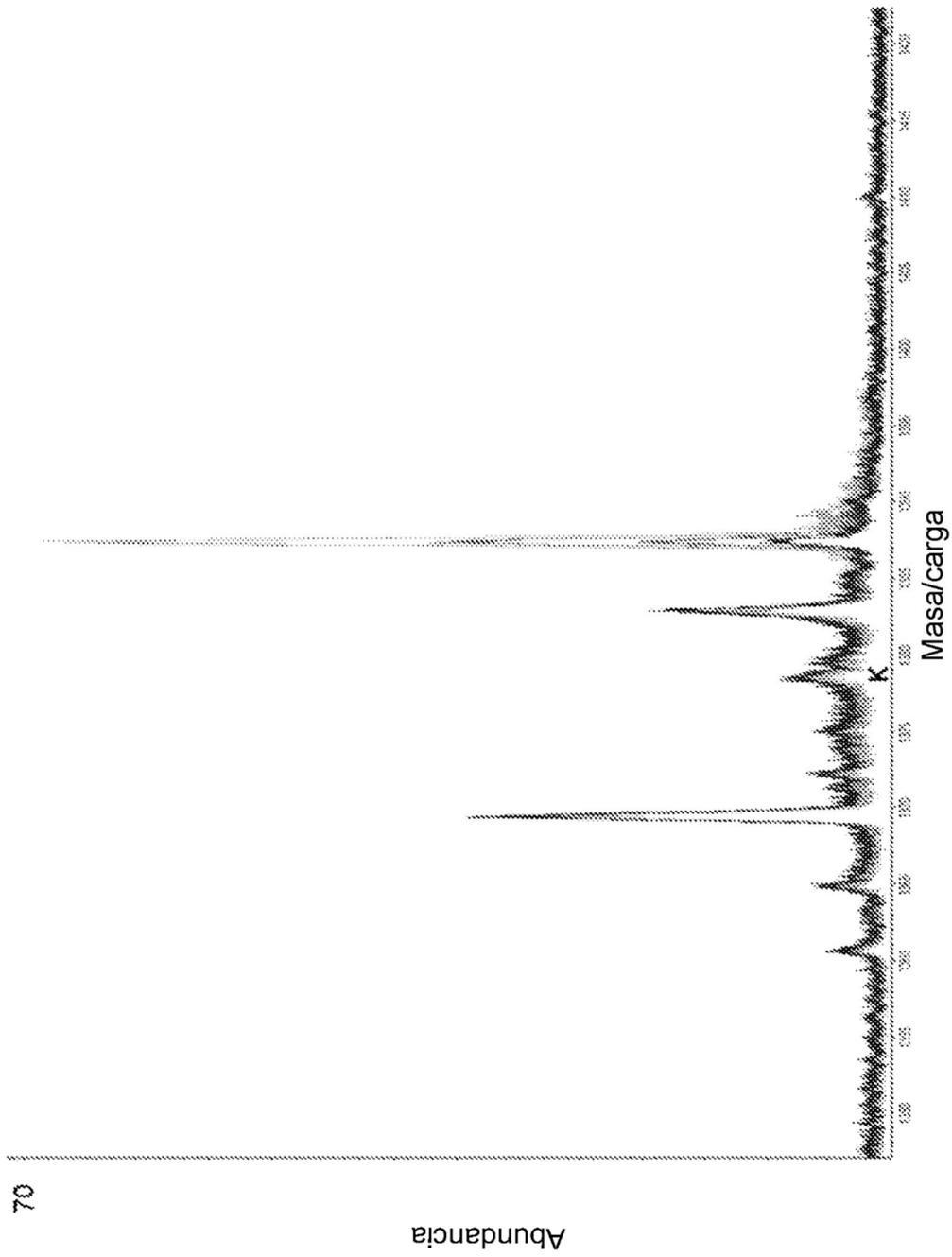


FIG. 21