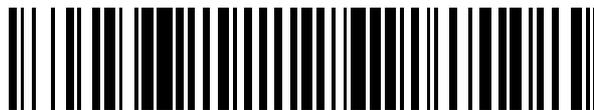


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 402 278**

21 Número de solicitud: 201131528

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.09.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.04.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**DE FRUTOS GÓMEZ, Mercedes;
DÍEZ MASA, José Carlos y
MORALES CID, Gabriel**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE ISOFORMAS DE GLICOPROTEÍNAS POR ELECTROFÓRESIS CAPILAR.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la purificación, concentración, separación y determinación de las isoformas de la α -1 - glicoproteína ácida (AGP), en muestras de suero sanguíneo humano, por electroforesis capilar. El nuevo procedimiento se basa en la inmunocaptura y preconcentración de la muestra dentro del capilar de separación, mediante el uso de una fase inmunoabsorbente magnéticamente inmovilizada en el interior del capilar de electroforesis, y la posterior desorción y separación de las isoformas de la glicoproteína tras la inducción de un efecto de enfoque. El nuevo procedimiento puede tener aplicaciones para el uso de la AGP como biomarcador de enfermedades tales como cáncer, enfermedades vasculares y enfermedades inflamatorias.

ES 2 402 278 A1

DESCRIPCIÓN**PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS DE ISOFORMAS DE GLICOPROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR.****SECTOR DE LA TÉCNICA**

5

La presente invención se refiere en general al campo del análisis de proteínas, al análisis de muestras por electroforesis capilar de inmunoafinidad en particular y específicamente al análisis de isoformas de glicoproteína por electroforesis capilar de inmunoafinidad. En un modo de realización particularmente preferido, se
10 refiere al análisis de isoformas de la α -1 glicoproteína ácida mediante electroforesis capilar de inmunoafinidad.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La α -1 glicoproteína ácida (AGP) u orosomucoide es una proteína con un pI de 2.8 a 3.8 y con un peso molecular comprendido entre 41 y 43 kDa. Las diferentes moléculas de la proteína debidas a variaciones en la glicosilación y/o en la secuencia peptídica se denominan formas y cada grupo de formas que migran en la misma banda de electroforesis se denomina isoforma. Los cambios en el perfil
20 electroforético de isoformas de AGP en las muestras biológicas se han relacionado con diferentes estados patológicos como cáncer, inflamación y enfermedades cardiovasculares y del hígado, entre otros [Duche, J. C., Urien, S., Simon, N., Malaurie, E., Monnet, I., Barre, J., *Clin Biochem* 2000, 33, 197-202; Hashimoto, S., Asao, T., Takahashi, J., Yagihashi, Y., Nishimura, T., Saniabadi, A.
25 R., Poland, D. C., van Dijk, W., Kuwano, H., Kochibe, N., Yazawa, S., *Cancer* 2004, 101, 2825-2836; Poland, D. C., Garcia Vallejo, J. J., Niessen, H. W., Nijmeyer, R., Calafat, J., Hack, C. E., Van het Hof, B., Van Dijk, W., *J Leukoc Biol* 2005, 78, 453-461; Budai, L., Ozohanics, O., Ludanyi, K., Drahos, L., Kremmer, T., Krenyacz, J., Vekey, K., *Anal Bioanal Chem* 2009, 393, 991-998]. La
30 comparación entre los perfiles electroforéticos de isoformas de AGP existentes en fluidos biológicos de individuos que sufren de diferentes enfermedades y los perfiles de individuos sanos podría ser potencialmente utilizada como biomarcador de la enfermedad con fines diagnósticos, pronósticos y de seguimiento terapéutico.

Las diferencias en la composición glucídica y/o en la secuencia peptídica entre las formas de la glicoproteína pueden dar lugar a diferencias en su relación carga/tamaño, siendo por tanto la electroforesis capilar en zona libre (CZE) una técnica adecuada para el análisis de las isoformas de la glicoproteína intacta, es decir sin hidrolizar. El análisis de isoformas de la glicoproteína por CZE requiere el aislamiento previo de la proteína a partir de la muestra biológica. La purificación de AGP a partir de suero humano consiste por lo general en un proceso largo y tedioso basado en el uso de columnas de intercambio iónico o mediante cromatografía de afinidad [Kishino, S., Miyazaki, K., *J Chromatogr B* 1997, 699, 371-381]. Se ha descrito un método de purificación por cromatografía de inmunoafinidad de AGP a partir de suero y plasma humanos que hace posible el análisis de sus isoformas por CZE (Ongay, S., Neusuess, C., Vaas, S.; Díez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, 31, 1796-1804). Este método permite realizar la preparación de la muestra para el posterior análisis por CZE y detección de las isoformas de la glicoproteína en un tiempo de 4 horas. Esta metodología se ha aplicado con éxito para la comparación de isoformas de AGP en las muestras de individuos sanos y de pacientes que sufren dos enfermedades vasculares, concretamente aneurisma aórtico abdominal (AAA) y aterosclerosis carotídea (ACT), mostrando un alto poder predictivo en los grupos sanos vs enfermos, sanos vs AAA, y sanos vs ACT [Puerta, A., Díez-Masa, J. C., Martín-Álvarez, P. J., Martín-Ventura, J. L., Barbas, C., Tuñón, J., Egido, J., de Frutos, M. *Analyst*, 2011, 136, 816–822]. Esta última contribución muestra la viabilidad de las isoformas de AGP analizadas por CZE como biomarcador de aterotrombosis.

25

A pesar de estos logros, el tratamiento de la muestra sigue contribuyendo de forma significativa al tiempo total de análisis. En este sentido, la electroforesis capilar de inmunoafinidad (IACE) empleando anticuerpos inmovilizados es una técnica híbrida que combina la inmunocaptura y la separación por CE. En la IACE en columna, un ligando de afinidad, concretamente un anticuerpo, unido a un soporte sólido o inmovilizado directamente en la pared capilar se fija en el interior del capilar de electroforesis en la zona próxima a la entrada. A continuación se introduce la muestra, y los antígenos de ésta son capturados y posteriormente eluidos y separados empleando un medio disociador de la unión antígeno-

anticuerpo, seguido de la aplicación de un alto voltaje [Guzman, N. A., Phillips, T. M., *Electrophoresis* 2011, 32, 1565-1578]. Esta técnica de IACE es la combinación “on-line” de una etapa de cromatografía de inmunoafinidad con una etapa de separación electroforética. La IACE se está convirtiendo en una

5 herramienta de gran alcance que tiene características únicas, que incluyen la automatización, cortos tiempos de preparación de muestra y la utilización de bajas cantidades de muestra y de reactivos. Por otra parte, un inconveniente del tratamiento de la muestra en el capilar de separación es que la matriz de la muestra se introduce directamente en los capilares, lo cual puede ocasionar la

10 adsorción de los componentes de la matriz en la pared capilar. Por lo general, los capilares se recubren con una sustancia química para evitar que los componentes de la matriz se adsorban en la pared de los capilares y para suprimir el flujo electroosmótico (EOF). Además, en la mayoría de los casos es necesario el uso de procedimientos de isotacoforesis (ITP) para aumentar la sensibilidad y la

15 resolución del método. Hasta el momento, no se había conseguido utilizar con éxito esta técnica de IACE en la separación de isoformas de glicoproteínas.

Teniendo en cuenta la utilidad del perfil electroforético de las isoformas de AGP y otras glicoproteínas como biomarcadores de diferentes enfermedades, se hace

20 necesario un método de análisis que permita de forma automática la preparación de la muestra biológica y la separación rápida y eficaz de las diferentes isoformas de estas proteínas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25

La presente invención describe un nuevo método de electroforesis capilar de inmunoafinidad, para el análisis de isoformas de glicoproteínas en muestras de fluidos biológicos, donde la preparación de la muestra se realiza, de forma mayoritaria, dentro del capilar.

30

El nuevo método combina la inmunocaptura y preconcentración de la muestra dentro de una columna de electroforesis capilar, mediante el uso de una fase inmunoabsorbente, y la inducción de una etapa de concentración, que permiten purificar, concentrar y separar las isoformas de la proteína al aplicar alto voltaje

con un mínimo de manipulación de la muestra. La fase inmunoabsorbente está formada por anticuerpos específicos frente a la glicoproteína de interés, unidos covalentemente a partículas magnéticas y se inmoviliza en el interior de la columna mediante un campo magnético.

5

El nuevo método permite la purificación, concentración, separación y determinación de las isoformas de la glicoproteína AGP, a partir de una muestra de fluido biológico, en un tiempo de unos 65 min, prácticamente la cuarta parte que los procesos previamente descritos. El proceso es reproducible y en la
10 mayoría de pasos automatizable. El consumo de muestra y reactivos también representa una mejora respecto a los procedimientos previamente descritos.

El análisis del perfil electroforético de isoformas de AGP obtenido mediante la utilización de esta metodología permitiría estudiar su potencial como biomarcador
15 de enfermedades tales como cáncer, inflamación o enfermedades vasculares y del hígado.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 FIGURA 1. La Fig. 1a muestra un esquema en perspectiva del dispositivo magnético formado por dos imanes (1) y un dispositivo de sujeción (3) que contiene un orificio (2) por el que puede pasar un capilar de electroforesis. La fig. 1b muestra un esquema frontal del mismo dispositivo.

25 FIGURA 2. La Fig. 2 es un electroforegrama de AGP de una muestra de suero analizada según el procedimiento on-line IACE donde se pueden distinguir las isoformas de la AGP. En la parte inferior derecha se muestra una ampliación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

En un primer aspecto, la presente invención describe un nuevo método de análisis, basado en electroforesis capilar, que permite la separación de al menos una isoforma de glicoproteína en una muestra de fluido biológico ya obtenida, mediante un proceso que comprende los siguientes pasos:

- (a) inyección en un capilar de electroforesis de una fase inmunoabsorbente de modo tal que permita la inmovilización de dicha fase inmunoabsorbente en dicho capilar de electroforesis,
- 5 (b) inyección en dicho capilar de electroforesis de la muestra de fluido biológico que contiene la glicoproteína a analizar de modo que permita la captura del antígeno (la glicoproteína) en la fase inmunoabsorbente descrita en el paso (a);
- 10 (c) inyección en dicho capilar de una disolución que contiene un agente disruptor de la unión anticuerpo-glicoproteína de modo que permita la desorción de la glicoproteína capturada en la fase inmunoabsorbente;
- (d) inyección en dicho capilar de una disolución que permita inducir un efecto de enfoque de la glicoproteína al aplicar un campo eléctrico;
- 15 (e) aplicación de un campo eléctrico a lo largo de dicho capilar de electroforesis de manera que permita separar al menos una isoforma de la glicoproteína, preferentemente se separan diferentes isoformas de la glicoproteína;
- 20 (f) detección de dicha(s) isoforma(s) descrita(s) en (e) de la glicoproteína en el extremo de salida del capilar de electroforesis y obtención de su perfil electroforético.

En una realización preferida de la presente invención, el método descrito se caracteriza porque la glicoproteína es la α -1 glicoproteína ácida.

- 25 Se entiende por muestra de fluido biológico ya obtenida, por ejemplo a partir de una muestra ya obtenida de sangre humana, se ha obtenido el plasma (por centrifugación) o el suero (por coagulación). Por tanto, en una realización preferente de la presente invención, el método descrito anteriormente se caracteriza porque la muestra de fluido biológico ya obtenida, es suero o plasma
- 30 sanguíneo.

Se entiende como fase inmunoabsorbente un anticuerpo unido covalentemente a un soporte sólido, como por ejemplo una partícula magnética. Por tanto, una realización preferente de la presente invención, se caracteriza porque la fase

inmunoadsorbente está formada por anticuerpos específicos frente a la glicoproteína de interés, unidos covalentemente a partículas magnéticas. Preferentemente, dichos anticuerpos son anti- α -1-glicoproteína ácida.

- 5 Se entiende como agente disruptor de la unión anticuerpo-glicoproteína un compuesto o mezcla de compuestos capaz de romper las interacciones anticuerpo-antígeno, como por ejemplo un tampón ácido.

En electroforesis capilar se entiende como efecto de enfoque, el confinamiento de
10 un analito en una banda estrecha del capilar debido a una discontinuidad en la velocidad de migración del analito en dos disoluciones diferentes.

La fase inmunoadsorbente se prepara mediante una reacción de acoplamiento entre una partícula magnética activada con grupos funcionales y un anticuerpo.
15 De forma preferida los grupos funcionales son grupos tosilo y el anticuerpo utilizado es anti- α -1-glicoproteína ácida humana desarrollado en cabra.

En una realización preferida la fase inmunoadsorbente descrita en el paso (a) se inmoviliza en el interior del capilar de electroforesis mediante la aplicación de un
20 campo magnético. En una realización más preferida, la inyección de la fase inmunoadsorbente del paso (a) se realiza a partir de una suspensión de 1 mg/mL de esta fase en un tampón fosfato salino durante un tiempo superior a los 100 segundos a una presión comprendida entre 50 y 150 mbar. En una realización aun más preferida la inyección se realiza durante 240 segundos a una presión de
25 100 mbares.

Para activar el anticuerpo de la fase inmunoadsorbente, en una realización preferida de la presente invención, el paso (a) también comprende la adición de un tampón ácido. En una realización más preferida, el tampón ácido consiste en
30 una mezcla de tricina 10 mM, cloruro de sodio 20 mM, acetato de sodio 10 mM, urea 7 M y putrescina 3,9 mM, ajustado a pH 4.5, preferentemente con ácido acético 2N.

En una realización preferida, la inyección de la muestra de fluido biológico que

contiene la glicoproteína en el paso (b) se realiza en un tiempo comprendido entre 100 y 900 s a una presión de 100 mbar. En una realización más preferida el tiempo de inyección de la muestra de fluido biológico es de 500 s.

- 5 En una realización preferida, de forma previa al paso (b), la muestra de fluido biológico se acidifica y se centrifuga para obtener el sobrenadante. En una realización más preferida la muestra de fluido biológico se acidifica con ácido tricloroacético 1M.
- 10 En una realización preferida se realiza un lavado entre las etapas (b) y (c). En una realización más preferida este lavado se realiza mediante la inyección de una disolución acuosa a una presión comprendida entre 0,1 y 4 bar y en un tiempo comprendido entre 1 y 600 segundos. En una realización aún más preferida, la solución acuosa es agua Milli-Q y se inyecta durante 60 segundos a una presión
- 15 de 1 bar.

El agente de desorción utilizado en el paso (c) es un tampón ácido o básico o una sustancia caotrópica. En una realización preferida, el agente de desorción es un tampón ácido formado por una mezcla de tricina 10 mM, cloruro de sodio 20 mM,

20 acetato de sodio 10 mM, urea 7 M y putrescina 3,9 mM, ajustado a pH 4.5. En una realización más preferida el agente disruptor se inyecta en sentido inverso desde el extremo de salida del capilar de electroforesis, preferentemente durante un tiempo de 480 s a 100 mbar de presión.

- 25 En una realización preferida el tampón utilizado como agente de desorción se emplea también como tampón de separación.

Para mejorar la resolución de la separación de las isoformas, en el paso (d) se realiza la adición de una disolución que permita inducir un efecto de enfoque. En

30 una realización preferida se utiliza una disolución de conductividad inferior a la disolución utilizada en el paso (c) que se emplea también como tampón de separación. En una realización más preferida la disolución del paso (d) es una mezcla metanol/agua en una relación 1/3 v/v.

En una realización preferida, la disolución utilizada en el paso (d) se inyecta de modo tal que cubra la fase inmunoabsorbente y el resto del capilar quede lleno de la disolución utilizada en el paso (c), que se emplea como tampón de separación. Ambos extremos del capilar están sumergidos en el tampón de separación. En
5 una realización más preferida, el tiempo de inyección de la disolución está comprendido entre 1 y 70 segundos y la presión está comprendida entre 1 y 100 mbares (milibares). En una realización aún más preferida, el tiempo de inyección es de 35 segundos y la presión de 50 mbares.

10 El campo eléctrico aplicado en el paso (e) es superior a 100 V/cm. En una realización preferida el campo eléctrico es de 333 V/cm.

La detección de las isoformas separadas se realiza próxima al extremo de salida del capilar. En una realización preferida, se realiza detección ultravioleta, en una
15 realización más preferida la detección ultravioleta se realiza a 214 nm.

En una realización preferida se realiza cuantificación de las isoformas. La cuantificación de las isoformas se realiza teniendo en cuenta la proporción de cada una de ellas. En una realización preferida la proporción considerada consiste
20 en el porcentaje de área de cada isoforma respecto al área total; en una realización más preferida, el porcentaje de área considerado es el porcentaje de área corregida teniendo en cuenta su velocidad electroforética aparente.

Para la realización de análisis sucesivos en el mismo capilar siguiendo el mismo
25 procedimiento y evitando problemas de contaminación en las partículas magnéticas de inmunoabsorbente, éstas se pueden retirar del capilar y emplear nuevas partículas para cada análisis. En una realización preferida la retirada de las partículas se realiza mediante la aplicación de una presión superior a 5 bares sin necesidad de interrumpir el campo magnético.

30

En un segundo aspecto de la presente invención, describe un aparato o sistema para el análisis de al menos una isoforma de una glicoproteína en una muestra de fluido biológico por electroforesis capilar a través del método anteriormente descrito; dicho aparato o sistema comprende:

- a) un capilar de electroforesis;
- b) una fase inmunoabsorbente que contiene anticuerpos específicos frente a la glicoproteína de interés;
- c) un dispositivo magnético capaz de inmovilizar la fase inmunoabsorbente en el interior del capilar de electroforesis.

El capilar de electroforesis utilizado es un capilar de sílice fundida no recubierto. En una realización preferida el capilar tiene unas medidas de 90 cm de longitud y 75 micras de diámetro interno.

10

En una realización preferida el dispositivo magnético está formado por uno o varios imanes y un dispositivo de sujeción que permite inmovilizar los imanes próximos al capilar. En una realización más preferida el dispositivo de sujeción mantiene dos imanes separados entre sí a una distancia comprendida entre 0.1 y 100 mm y sujeta el capilar entre los dos imanes. En una realización aun más preferida los dos imanes son de Nd-Fe-B con geometría de disco de 9 mm de diámetro y 5 mm de grosor, y se encuentran a una distancia entre sí de 1 mm y el capilar se dispone de forma equidistante entre ellos.

20 Las Figuras 1a y 1b muestran un ejemplo, en forma de esquema, del dispositivo magnético formado por dos imanes (1) y un dispositivo de sujeción (3). El dispositivo de sujeción contiene un orificio (2) que permite pasar un capilar de electroforesis y fijarlo entre los dos imanes.

25 En una realización preferida, el dispositivo magnético se sitúa a una distancia comprendida entre 1 y 16 cm de la entrada del capilar. En una realización más preferida, el dispositivo magnético se sitúa a una distancia de 8,5 cm.

En un tercer aspecto de la invención, la comparación del perfil electroforético de al menos una isoforma de la glicoproteína, obtenido utilizando el método o procedimiento descrito anteriormente, entre individuos sanos e individuos enfermos, se puede utilizar como biomarcador de diferentes enfermedades que causan cambios, a nivel fisiológico, en el perfil de isoformas de glicoproteínas. En una realización preferida, las enfermedades se comprenden entre cáncer,

enfermedades vasculares, inflamación y enfermedades del hígado. En una realización más preferida, las enfermedades son aneurisma aórtico abdominal y aterosclerosis carotidea.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las figuras y ejemplos incluidos se
10 proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

15 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de
20 la misma.

EJEMPLO 1

Métodos Experimentales

25

Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico o superior. La cantidad requerida de α -1-glicoproteína ácida humana estándar, adquirida a Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.), se disolvió en agua MILLI-Q (Millipore Corp., Madrid, España), para
30 obtener una disolución de 1 mg/ml que se almacenó a 4 °C. Se utilizó ácido tricloroacético (Merck, Darmstadt, Alemania) para la precipitación ácida correspondiente a la etapa de pretratamiento de la muestra. Las partículas magnéticas de 1,08 micras de diámetro activadas con grupos tosilo (MB) fueron

adquiridas a Dynabeads (Invitrogen, Oslo, Noruega). El anticuerpo policlonal anti- α -1-glicoproteína ácida humana desarrollado en cabra se adquirió a Inmune Systems Ltd (Paignton, Devon, Reino Unido).

- 5 Se utilizaron tricina (Sigma), cloruro de sodio (Merck), acetato de sodio (Merck), urea (Sigma), putrescina (Sigma) y ácido acético (Merck) para la preparación del tampón empleado como agente de desorción, para activar las partículas, y como tampón de separación electroforética. Se utilizó hidróxido de sodio (Merck) para el acondicionamiento capilar. Se utilizó metanol (Merck) para realizar un efecto de
- 10 enfoque. Se utilizó Brij 35 (Merck) para pasivar los dispositivos de filtración. Se utilizaron azida de sodio (JT Baker, Deventer, Holanda), cloruro de trizma (Sigma), fosfato disódico (Merck), fosfato monosódico monohidratado (Merck), cloruro de sodio (Merck) y sulfato amónico (Merck) en el acoplamiento MB-anticuerpo. Las muestras de suero de un donante sano fueron proporcionadas por
- 15 un Hospital, con el correspondiente consentimiento. Las alícuotas de suero fueron almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

Equipos

- 20 Las etapas de tratamiento de la muestra y separación electroforética de las isoformas de AGP realizadas dentro del capilar de electroforesis se llevaron a cabo empleando un equipo Agilent 7100 CE (Waldbronn, Alemania) con detección UV-Vis ($\lambda = 214\text{ nm}$) y una fuente de presión externa. Se utilizó el software Agilent ChemStation para controlar el instrumento y para adquirir y procesar los datos.
- 25 Los capilares de sílice fundida sin recubrir (90 cm de longitud total, 75 micras de diámetro interno, 375 micras de diámetro externo) fueron adquiridos a Polymicro technologies (Phoenix, Arizona, EE.UU).

- El campo magnético fue aplicado por dos imanes de disco de Nd-Fe-B, de 9 mm
- 30 de diámetro, 5 mm de espesor con magnetismo residual estimado de 1,40-1,46 T (Supermagnete, Zurich, Suiza). Se utilizó un dispositivo de metacrilato fabricado en el laboratorio para mantener los imanes con una separación de 1 mm entre ellos, y para fijar el capilar en la posición central entre los dos imanes. Este dispositivo se ubicó a una distancia de 8,5 cm del extremo de entrada del capilar.

Se utilizó un dispositivo de filtración con una membrana con tamaño de corte de 50 kDa (MICROCON® YM-50, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) empleado en una centrífuga Biofuge Stratos (Heraeus, Hanau, Alemania) para la preparación de anti-AGP. Se utilizó un tubo de baja adsorción de proteína de 0,5 mL LoBind (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) para llevar a cabo la reacción de acoplamiento anti-AGP-MB. Por último, se utilizó un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 800 UV/Vis (Brea, CA, EE.UU.) para el cálculo indirecto de la cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre las MBs.

10

Acoplamiento de los anticuerpos anti-AGP a las partículas magnéticas (MBs).

Se añadieron 100 µL de una suspensión comercial de MBs activadas con grupos tosilo (100 mg/mL) a un tubo de 0,5 mL LoBind (Eppendorf) y se lavó tres veces con 100 µL de tampón de recubrimiento (sulfato amónico 1 M en fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4).

Para preparar el anticuerpo para la reacción de acoplamiento, se acondicionó un filtro de centrífuga MICROCON® con una membrana de 50 kDa de corte nominal mediante tratamiento con un volumen de 500 µL de una disolución acuosa de Brij 35 al 5% (w:v), a 4 °C durante 24 horas. La disolución de Brij se descartó y el MICROCON® se enjuagó con agua Milli-Q (500 µL), y se lavó dos veces con 500 µL de agua haciéndolo pasar a través de la membrana por centrifugación a 14000 g durante 10 min. En el siguiente paso, el MICROCON® se invirtió y se centrifugó durante 3 min a 1000 g. Utilizando el MICROCON® así preparado se intercambié el disolvente de la solución de anticuerpo pasando de PBS-azida a tampón de recubrimiento. Para ello, se eliminó, por centrifugación (14000 g, 30 min), el disolvente de 400 µL de la solución de anti-AGP en PBS-azida (1 mg/mL). A continuación, se añadió sobre el anticuerpo retenido en la membrana un volumen de 400 µL del tampón de recubrimiento y se centrifugó a 14000 g durante 30 min. Posteriormente, el anticuerpo se recogió en un nuevo vial centrifugando el MICROCON®, boca abajo durante 3 minutos a 1000 g. Se midió el volumen de anticuerpo recogido y se adicionó tampón de recubrimiento hasta un volumen final

de 250 μ L. Esta solución de anti-AGP se adicionó al tubo que contenía 10 mg de MBs lavadas. En el siguiente paso, la mezcla se incubó durante 24 horas a 37 °C con agitación constante y homogénea (combinando inclinación y rotación). Se retiró el sobrenadante, y el material se lavó tres veces con PBS. Por último, los
5 grupos tosilo sin reaccionar se bloquearon con Tris HCl 0,2 M preparado en PBS y ajustado a pH 7,4 (12 horas de tiempo de reacción a 37 °C). Las MBs con anticuerpo unido (MB-Ab) fueron almacenadas a 4 °C en PBS a pH 7,4 (conteniendo azida sódica al 0,02% (w:v) como agente bacteriostático).

10 **Condiciones para la inmunocaptura en línea, preconcentración y separación de las isoformas de AGP.**

Cada capilar de electroforesis nuevo fue acondicionado, de forma secuencial, con
15 NaOH 1 M (10 min), agua Milli-Q (5 min) y tampón de separación (BGE) (10 min) a 1 bar. El BGE utilizado consistió en tricina 10 mM, cloruro sódico 20 mM, acetato sódico 10 mM, urea 7 M y putrescina 3,9 mM, ajustado a pH 4,5 utilizando ácido acético. Al comienzo de cada día, el capilar se acondicionó con NaOH 0,1 M (10 min), agua Milli-Q (5 minutos) y BGE (10 min). Entre análisis el capilar se
20 acondicionó a una presión de 1 bar con NaOH 0,1 M (270 s) y con agua Milli-Q (270 s).

A partir de muestras de suero humano se llevó a cabo una precipitación ácida para la purificación de AGP, que consistió en la adición de 10 μ L de ácido
25 tricloroacético 1 M a 50 μ L de suero (relación 1:5 v:v). A continuación, la mezcla se centrifugó (3000 g, 5 min) y el sobrenadante se analizó siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

El procedimiento de purificación dentro del capilar consistió en 8 pasos. Paso 1:
30 captura de las MB-Ab por el campo magnético; se inyecta una suspensión de 1 mg/ml MB-Ab durante 240 s a baja presión (100 mbar). Paso 2: lavado con BGE (300 s, 1 bar). Paso 3: aislamiento de la glicoproteína; la muestra sometida a pretratamiento ácido se inyecta durante 500 s a 100 mbar, quedando la AGP retenida en las MB-Ab. Paso 4: lavado con H₂O durante 60 s a 1 bar. Paso 5:

inyección de BGE desde el extremo de salida del capilar durante 480 s a 100 mbar. Paso 6: inyección de CH₃OH/H₂O (1:3 v/v), durante 35 segundos a 50 mbar. Paso 7: elución y separación por aplicación de 30 kV con polaridad directa (polaridad negativa a la salida) a 35 °C detectando las isoformas a 214 nm. Paso 5 8: eliminación de las MB-Ab a 5,5 bar empleando agua Milli-Q (30 s) y NaOH 0,1 M (30 s).

Los resultados obtenidos en el análisis por quintuplicado de una muestra de suero de un individuo sano, se resumen en la siguiente tabla. En ella se recoge el valor 10 medio del porcentaje de área corregida relativa para cada una de las isoformas (picos) de AGP observadas en el electroforegrama de la Fig. 2, junto con su desviación estándar relativa (RSD); la tabla incluye también los valores de RSD para el tiempo de migración de cada una de las isoformas. El área corregida se calcula multiplicando el área de pico por su velocidad electroforética aparente.

15

Nº de pico de AGP	Porcentaje de área (%)	RSD porcentaje de área (%)	RSD tiempo de migración (%)
1	0,8	11,2	3,9
2	2,0	2,8	3,7
3	5,0	0,9	3,6
4	13,1	0,5	3,5
5	22,7	0,3	3,4
6	25,4	0,5	3,3
7	18,8	0,4	3,2
8	8,7	1,1	3,1
9	2,8	3,9	3,1
10	0,8	8,8	3,0

REIVINDICACIONES

1. Un método para la separación y determinación de al menos una isoforma de una glicoproteína en una muestra de fluido biológico por electroforesis capilar,
5 dicho método caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - (a) inyección en un capilar de electroforesis de una fase inmunoabsorbente para la inmovilización de la fase inmunoabsorbente en el capilar de electroforesis;
 - (b) inyección de la muestra de fluido biológico que contiene la glicoproteína en
10 dicho capilar de electroforesis para la retención de la glicoproteína en la fase inmunoabsorbente;
 - (c) inyección de una disolución que contiene un agente disruptor de la unión anticuerpo-glicoproteína en dicho capilar de electroforesis para la desorción de la glicoproteína de la fase inmunoabsorbente;
 - 15 (d) inyección en dicho capilar de electroforesis de una disolución que permita inducir un efecto de enfoque de la glicoproteína al aplicar un campo eléctrico;
 - (e) aplicación de un campo eléctrico en dicho capilar de electroforesis para separar al menos una isoforma de la glicoproteína; y
 - 20 (f) detección de dicha(s) isoforma(s) de la glicoproteína.

2. El método según la reivindicación 1 caracterizado porque la glicoproteína es la α -1-glicoproteína ácida.

- 25 3. El método según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la muestra de fluido biológico es suero o plasma.

4. El método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la fase inmunoabsorbente está formada por anticuerpos específicos frente a la
30 glicoproteína de interés, unidos covalentemente a partículas magnéticas.

5. El método según la reivindicación 4, caracterizado porque los citados anticuerpos son anti- α -1-glicoproteína ácida.

6. El método según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque en el paso (a), la fase inmunoabsorbente se inmoviliza dentro del capilar de electroforesis mediante la aplicación de un campo magnético.
- 5 7. El método según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la inyección de la fase inmunoabsorbente del paso (a) se realiza a partir de una suspensión de 1 mg/mL de esta fase en un tampón fosfato salino durante un tiempo de 240 segundos y a una presión de 100 mbares.
- 10 8. El método según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el paso (a) también comprende la activación de los anticuerpos mediante la inyección de un tampón ácido.
9. El método según la reivindicación 8, caracterizado porque el citado tampón
15 ácido utilizado consiste en una mezcla de tricina 10 mM, cloruro de sodio 20 mM, acetato de sodio 10 mM, urea 7 M y putrescina 3,9 mM ajustado a pH 4,5.
10. El método según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la inyección de la muestra de fluido biológico que contiene la glicoproteína en el
20 paso (b) se realiza en un tiempo de 500 s a una presión de 100 mbar.
11. El método según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la muestra de fluido biológico que contiene la glicoproteína ha sido previamente acidificada y centrifugada antes de ser inyectada en el capilar de electroforesis.
25
12. El método según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque se realiza un lavado entre los pasos (b) y (c).
13. El método según las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el
30 agente disruptor utilizado en el paso (c) es un tampón ácido formado por una mezcla de 10 mM tricina, 20 mM cloruro de sodio, 10 mM acetato de sodio, urea 7 M y 3,9 mM putrescina, ajustado a pH 4,5.

14. El método según la reivindicación 13 caracterizado porque el citado agente disruptor se inyecta desde el extremo de salida del capilar de electroforesis.
15. El método según las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la disolución utilizada en el paso (d) tiene una conductividad inferior a la disolución utilizada en el paso (c).
16. El método según la reivindicación 15 caracterizado porque la disolución utilizada en el paso (d) es una mezcla metanol/agua en una relación 1/3 v/v.
- 10
17. El método según las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque el campo eléctrico aplicado en el paso (e) es de 333 V/cm.
18. El método según las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque la determinación de las isoformas de la glicoproteína se realiza cuantificando el porcentaje de área corregida de cada isoforma respecto al área total.
- 15
19. Un aparato para la separación de glicoproteínas según el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende los siguientes elementos:
- 20
- a) un capilar de electroforesis,
 - b) una fase inmunoabsorbente que contiene anticuerpos específicos frente a la glicoproteína de interés, y
 - c) un dispositivo magnético que permite inmovilizar la fase inmunoabsorbente en el interior del capilar de electroforesis.
- 25
20. El aparato según la reivindicación 19 caracterizado porque el capilar de electroforesis utilizado es un capilar de sílice fundida no recubierto.
- 30
21. El aparato según las reivindicaciones 19 y 20, caracterizado porque el citado capilar de electroforesis es de 90 cm de longitud y 75 micras de diámetro interno.

22. El aparato según las reivindicaciones 19 a 21, caracterizado porque el citado dispositivo magnético descrito en (c) está formado por dos imanes y un dispositivo de sujeción que mantiene los imanes separados entre sí a una distancia comprendida entre 0,1 y 100 mm y sujeta el capilar entre los dos
5 imanes.

23. El aparato según la reivindicación 22 caracterizado porque los dos imanes son imanes de disco de Nd-Fe-B, de 9 mm de diámetro y 5 mm de grosor.

10 24. Uso del perfil electroforético de al menos una isoforma de la glicoproteína obtenido utilizando el método descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, como biomarcador de enfermedades que causan cambios, a nivel fisiológico, en el perfil electroforético de dicha isoforma de la glicoproteína.

FIG. 1

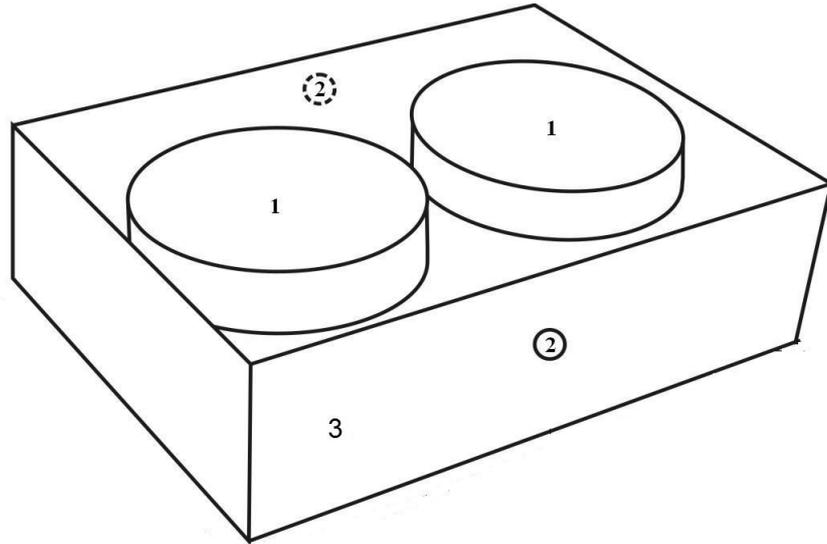


Fig. 1a

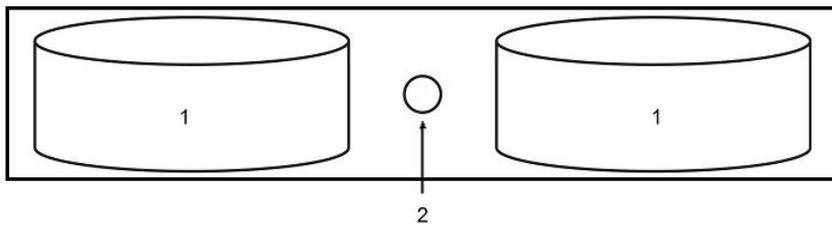
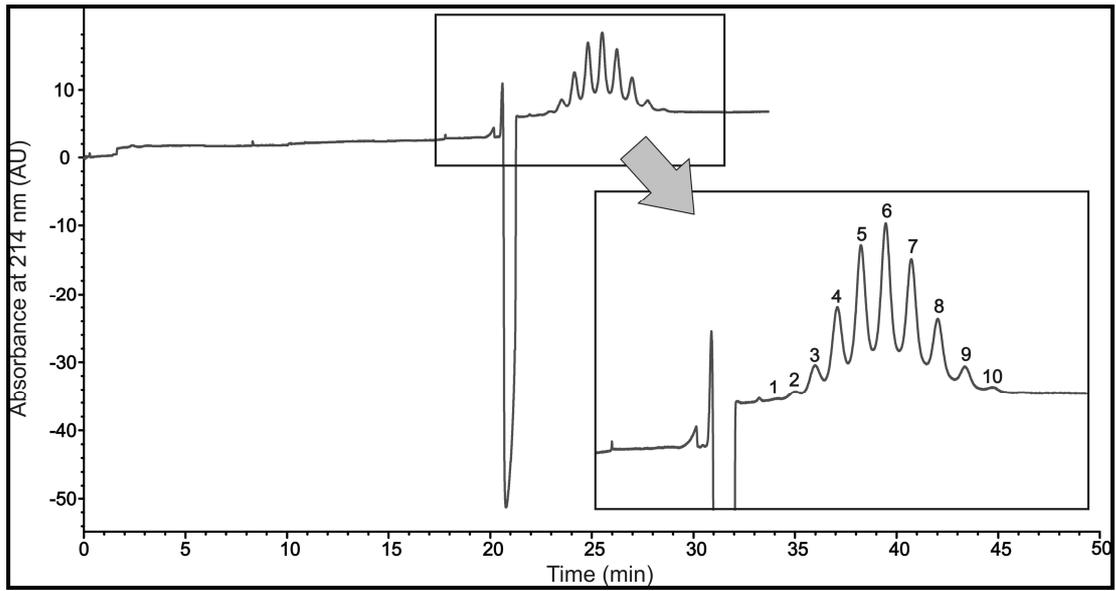


Fig. 1b

FIG. 2





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131528

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.09.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PUERTA A., DIEZ-MASA J. C., MARTÍN-ÁLVAREZ P. J., MARTÍN-VENTURA J. L., BARBAS C., TUÑÓN J., EGIDO J., DE FRUTOS M. "Study of the capillary electrophoresis profile of intact alpha-1-acid glycoprotein isoforms as a biomarker of atherothrombosis." Analyst (2011 Feb.) Vol. 136, páginas 816-822. Todo el documento.	1-24
A	ONGAY S., LACUNZA I., DIEZ-MASA J. C., DE FRUTOS M. "Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis." Analytica Chimica Acta (2010) Vol. 663, páginas 206-212. Todo el documento.	1-24
A	ES 2328172 T3 (PETER HERMENTIN) 16.07.2008, todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.12.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	PUERTA A., DIEZ-MASA J. C., MARTÍN-ÁLVAREZ P. J., MARTÍN-VENTURA J. L., BARBAS C., TUÑÓN J., EGIDO J., DE FRUTOS M. "Study of the capillary electrophoresis profile of intact alpha-1-acid glycoprotein isoforms as a biomarker of atherothrombosis." Analyst (2011 Feb.) Vol. 136, páginas 816-822. Todo el documento.	02.2011
D02	ONGAY S., LACUNZA I., DIEZ-MASA J. C., DE FRUTOS M. "Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis." Analytica Chimica Acta (2010) Vol. 663, páginas 206-212. Todo el documento.	2010
D03	ES 2328172 T3 (PETER HERMENTIN)	16.07.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento de separación y determinación de las isoformas de una glicoproteína en una muestra de fluido biológico mediante electroforesis capilar (reivindicaciones 1-18), el aparato para realizar dicho procedimiento (reivindicaciones 19-23) y el uso del perfil electroforético de las isoformas obtenido con dicho procedimiento (reivindicación 24).

El documento D01 consiste en un estudio sobre las diferencias en el perfil de electroforesis capilar de zona de las isoformas de alfa 1- glicoproteína ácida (AGP) intacta entre individuos sanos y pacientes con aterotrombosis (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en un estudio de la viabilidad de diferentes métodos para la purificación de la alfa 1- glicoproteína ácida (AGP) a partir de suero humano para el análisis de sus isoformas (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un procedimiento de caracterización de la calidad de las sialoglicoproteínas, y determinación de la biodisponibilidad de dichas sialoglicoproteínas mediante electroforesis capilar de zona que se basa en el número de isoformas. Dicho método puede utilizarse tanto para glicoproteínas endógenas como también glicoproteínas exógenas, como alpha-1-glicoproteína ácida humana (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1-24.

Ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-24. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por las reivindicaciones 1-24.

Por lo tanto, los documentos D01-D03 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.