

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 606**

51 Int. Cl.:
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09726947 .6**
96 Fecha de presentación: **31.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2274624**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **ENSAYO DE FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA PEGILADO.**

30 Prioridad:
03.04.2008 EP 08006768

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
LANG, Kurt;
SCHAUBMAR, Andreas;
SCHLEYPEN, Julia y
SCHLOTHAUER, Tilman

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 375 606 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ensayo de factor de crecimiento tipo insulina pegilado.

Descripción

5 La presente invención pertenece al campo de los inmunoensayos, de modo más preciso se refiere a un inmunoensayo para la detección y cuantificación de factor de crecimiento tipo insulina pegilado por la formación y la determinación de un complejo de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y a una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina.

Antecedentes de la invención

10 Los factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF I y IGF II) son miembros de la superfamilia de las hormonas de la insulina, factores de crecimiento y neuropéptidos, cuyas acciones biológicas se consiguen por la unión a receptores de la superficie de la célula, por ejemplo, el receptor I del factor de crecimiento tipo insulina o el receptor II del factor de crecimiento tipo insulina. El eje del factor de crecimiento tipo insulina y la hormona de crecimiento (GH) juegan un importante papel en la regulación del crecimiento somático y fetal de la infancia. Varias décadas de investigación básica y clínica han demostrado que también es crítico para el mantenimiento del crecimiento neoplásico

15 (Khandwala, H.M., y otros, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 215-244). Las acciones del factor de crecimiento tipo insulina son reguladas por proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP), que actúan como transportadoras de factores de crecimiento tipo insulina, protegiéndolos contra la degradación, limitando o inhibiendo su unión a receptores y manteniendo una "reserva" de factor de crecimiento tipo insulina biológicamente inactiva (Martin, J.L., y Baxter, R.C., proteínas de unión a IGF como moduladores de las acciones de IGF, en Rosenfeld, R.G., y Roberts, CT. (eds.), *The IGF system, Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications* (1999), Humana Press, Totowa, 227-255; Jones, J.L., y Clemmons, D.R., *Endocr. Rev.* 12 (1995) 10-21; Khandwala, H.M., y otros, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 215-244; Hwa, V., y otros, *The IGF binding protein superfamily*, en Rosenfeld, R.G., y Roberts, CT. (eds.), *The IGF system, Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications* (1999), Humana Press, Totowa, pp. 315-327). Prácticamente, cada nivel de respuesta en tejidos tumorales mediadas por el sistema del factor de crecimiento

20 tipo insulina (receptores IGF, IGFBP, IGF) puede ser objetivo de enfoques terapéuticos (Khandwala, H.M., y otros, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 215-244; Fanayan, S., y otros, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39146-39151; Imai, Y., y otros, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18188-18194). También se debe mencionar que la proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina tiene efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos independientes del factor de crecimiento tipo insulina (Wetterau, L.A., y otros, *Mol. Gen. Metab.* 68 (1999) 161-181; Butt, A.J., y otros, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39174-39181). El factor de crecimiento tipo insulina I es una hormona circulante relacionada estructuralmente a la insulina. El factor de crecimiento tipo insulina I es considerado tradicionalmente el mediador principal de las acciones de la hormona de crecimiento sobre tejidos periféricos. El factor de crecimiento tipo insulina I consiste en 70 aminoácidos y se llama también Somatomedina C y está definido por SwissProt No. PO 1343. Su utilización, actividad y producción son mencionadas, por ejemplo, por le Bouc, Y., y otros, *FEBS Lett.* 196 (1986) 108-112; de Pagter-Holthuizen, P., y otros, *FEBS Lett.* 195 (1986) 179-184; Sandberg Nordqvist, A.C., y otros, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 12 (1992) 275-277; Steenbergh, P.H., y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 507-514; Tanner, J.M., y otros, *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* 84 (1977) 681-696; Uthne, K., y otros, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39 (1974) 548-554; EP 0 123 228; EP 0 128 733; US 5.861.373; US 5.714.460; EP 0 597 033; WO 02/32449; WO 93/02695.

40 La regulación de la función del factor de crecimiento tipo insulina I es muy compleja. En la circulación, solamente existe un nivel marginal de 0,2% a 1,0% de factor I de crecimiento tipo insulina en forma libre, mientras que la mayoría está unida a proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina, que tiene afinidades muy grandes con los factores de crecimiento tipo insulina y modulan la función del factor de crecimiento I tipo a la insulina. El factor puede ser liberado localmente por los mecanismos que liberan el factor I de crecimiento tipo insulina, tal como proteólisis de proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina por proteasas.

El factor I de crecimiento tipo insulina juega un papel paracrino en el cerebro en desarrollo y madurez (Werther, G.A., y otros, *Mol. Endocrinol.* 4 (1990) 773-778). Estudios *in vitro* indican que el factor I de crecimiento tipo insulina es un potente agente trópico no selectivo para varios tipos de neuronas en el CNS (Knusel, B., y otros, *J. Neurosci.* 10(1990) 558- 570; Svrzic, D., y Schubert, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1990) 54-60), incluyendo las neuronas dopaminérgicas (Knusel, B., y otros, *J. Neurosci.* 10 (1990) 558-570) y oligodendrocitos (McMorris, F. A., y Dubois-Dalcq, M., *J. Neurosci. Res.* 21 (1988) 199-209; McMorris, F. A., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 822-826; Mozell, R.L., y McMorris, F.A., *J. Neurosci. Res.* 30 (1991) 382-390). El documento US 5.093.317 menciona que la supervivencia de células neuronales colinérgicas es reforzada por la administración del factor II de crecimiento tipo insulina. Se sabe además que el factor I de crecimiento tipo insulina estimula la regeneración de nervios periféricos (Kanje, M., y otros, *Brain Res.* 486 (1989) 396-398) y mejora la actividad de la ornitina descarboxilasa (US 5.093.317). Los documentos US 5.861.373 y WO 93/02695 mencionan un método de tratamiento de lesiones o enfermedades del sistema nervioso central que afectan predominantemente a células glía y/o células neuronales no colinérgicas al incrementar la concentración o concentraciones activas de factor I de crecimiento tipo insulina y/o análogos del mismo, en el sistema nervioso central del paciente. El documento WO 02/32449 está dirigido a métodos para reducir o prevenir el daño isquémico en el sistema nervioso central de un

mamífero, por administración, a la cavidad nasal del mamífero, de un compuesto farmacéutico que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de factor I de crecimiento tipo insulina o variantes biológicamente activas del mismo. El factor I de crecimiento tipo insulina es absorbido a través de la cavidad nasal y transportado al sistema nervioso central del mamífero en una cantidad efectiva para reducir o impedir daños isquémicos asociados con un evento isquémico. En el documento EP 0 874 641 se da a conocer la utilización de un factor I de crecimiento tipo insulina o un factor II de crecimiento tipo insulina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de daños neuronales en el sistema nervioso central.

La reducción de niveles en el cerebro y en el suero de factor libre I de crecimiento tipo insulina han sido relacionados con la patogénesis de formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Alzheimer. Por otra parte, el factor I de crecimiento tipo insulina protege las neuronas contra la neurotoxicidad inducida por A β (Niikura, T., y otros, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1902-1910; Dore, S., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4772-4777; Dore, S., y otros, *Ann. NY Acad. Sci.* 890 (1999) 356-364). Recientemente, se ha demostrado que el factor II de crecimiento tipo insulina administrado periféricamente es capaz de reducir los niveles de A β en el cerebro en ratas y ratones (Carro, E., y otros, *Nat. Med.* 8 (2002) 1390-1397). Además, el estudio ha demostrado que en el tratamiento prolongado con factor I de crecimiento tipo insulina del modelo de un ratón transgénico AD reducía significativamente la carga de placas amiloides en el cerebro. Estos datos apoyan firmemente la idea de que el factor I de crecimiento tipo insulina es capaz de reducir los niveles de A β en el cerebro y demencia del cerebro asociada a placas al eliminar A β del cerebro.

El factor I de crecimiento tipo insulina y el factor II de crecimiento tipo insulina son polipéptidos de cadena única, idénticos al 67%, de 70 y 67 aminoácidos, respectivamente, que comparten con la insulina, aproximadamente, el 40% de identidad de secuencia y de supuesta homología estructural. Los primeros 29 residuos de los factores de crecimiento tipo insulina son homólogos en la cadena B de insulina (región B, 1-29), seguido por 12 residuos que son análogos al péptido C de proinsulina (región C, 30-41), y una región de 21 residuos que es homóloga de la cadena A de la insulina (región A, 42-62). El octapéptido con terminal carboxi (región D, 63-70) no tiene equivalente en la insulina y proinsulina (Murray- Rust, J., y otros, *BioEssays* 14 (1992) 325-331; Baxter, R.C., y otros, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 60-65). Los factores de crecimiento tipo insulina son los únicos miembros de la superfamilia de la insulina en la que la región C no es eliminada proteolíticamente después de traslación.

Las proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (proteínas 1 a 6 de unión al factor de crecimiento tipo insulina) son proteínas de 216 a 289 residuos, consistiendo, la proteína 5 de unión al factor maduro de crecimiento tipo insulina en 252 residuos (Wetterau, L.A., y otros, *Mol. Gen. Metab.* 68 (1999) 161-181; ver un resumen, por ejemplo en Rajaram, S., y otros, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 801-831). Todas las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina comparten una organización de dominio común. La conservación más elevada se encuentra en el terminal N (residuos 1 hasta, aproximadamente, 100) y el terminal C (desde el residuo 170) que son dominios ricos en cisteína. Se encuentran doce cisteínas conservadas en el dominio N terminal y seis en el dominio C terminal. La parte central conservada débilmente (dominio L), contiene la mayor parte de sitios de división para proteasas específicas (Chernausek, S. D., y otros, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11377-11382). Varios fragmentos diferentes de proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina han sido descritos y caracterizados bioquímicamente hasta el momento ((Mazerbourg, S., y otros, *Endocrinology* 140 (1999) 4175-4184). Estudios de mutagénesis sugieren que la alta afinidad de un sitio de unión a factor de crecimiento tipo insulina está situada en el dominio del terminal L (Wetterau, L.A., y otros, *Mol. Gen. Metab.* 68 (1999) 161-181; Chernausek, S. D., y otros, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11377-11382) y que, como mínimo, la proteína 3 de unión al factor de crecimiento tipo insulina y la proteína 2 de unión al factor de crecimiento tipo insulina contienen dos determinantes de unión, uno en el dominio del terminal N y uno en el dominio del terminal C (Wetterau, L. A., y otros, *Mol. Gen. Metab.* 68 (1999) 161-181). Recientemente, un grupo de proteínas relacionadas con proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP-rPs), que unen factores de crecimiento tipo insulina con afinidad más baja que las proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina han sido descritas (Hwa, V., y otros, *The IGF binding protein superfamily* en Rosenfeld, R.G., y Roberts, CT. (eds.), *The IGF system, Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications* (1999), Humana Press, Totowa, pp. 315-327). Las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina y las proteínas IGFBP-rPs comparten el dominio de terminal N rico en cisteína altamente conservado, que parece ser crucial en varias acciones biológicas, incluyendo su unión a factores de crecimiento tipo insulina y con una unión de alta afinidad a la insulina (Hwa y otros, 1999). Los fragmentos del terminal N de proteína 3 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, generados, por ejemplo, por digestión de plasma, se unen también a la insulina, y fisiológicamente son igualmente relevantes para la acción de la insulina. Más allá del dominio de terminal N, hay una carencia de similitud de secuencia entre las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina y las IGFBP-rPs.

Resumen de la invención

El primer aspecto de la presente invención es un inmunoensayo para la detección de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, que comprende un anticuerpo de captación y un anticuerpo trazador, de manera que dicho anticuerpo de captación es un anticuerpo monoclonal anti-poli(etilenglicol), siendo el anticuerpo trazador un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina, y dicho factor de crecimiento de tipo insulina pegilado es detectado como complejo con una proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina digoxigenilado, de manera que la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo

insulina digoxigenilado tiene es de 12 a 24 horas a temperatura ambiente con una concentración de dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos.

5 En una realización, dicho anticuerpo anti-poli(etilenglicol) está conjugado a una la fase sólida, y dicho anticuerpo anti-digoxigenina está conjugado a un marcador detectable. En otra realización, dicha conjugación es una conjugación química. En otra realización, dicha marcador detectable es seleccionada entre enzimas, antígenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes, y complejos de quelato metálico. En otra realización, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es un factor de crecimiento I de tipo insulina con SEQ ID NO: 1 o una variante pegilado del mismo. En otra realización, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es monopegilado. En otra realización adicional, dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina es la proteína 3 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, o proteína 5 de unión al factor de crecimiento de tipo insulina. En otra realización, el inmunoensayo de acuerdo con la invención se caracteriza porque la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es de 18 a 22 horas, preferentemente 20 horas. En otra realización adicional, el inmunoensayo, según la invención, se caracteriza porque la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado se encuentra con una concentración de dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 a 5,0 µg/ml o de 0,1 µg/ml a 1,0 µg/ml.

El segundo aspecto de la presente invención consiste en un método para la determinación de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) preparar una muestra a analizar,
- b) incubar un anticuerpo de anti-poli(etilenglicol) conjugado a una la fase sólida con dicha muestra para formar un complejo de anticuerpo anti-poli(etilenglicol)/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
- c) incubar dicho complejo formado en b) con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado para formar un segundo complejo que comprende el complejo formado en b) a temperatura ambiente de 12 a 24 horas con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos,
- 25 d) incubar dicho complejo formado en c) con peroxidasa de rábano conjugada con un anticuerpo anti-digoxigenina para formar un tercer complejo que comprende el complejo formado en c),
- e) determinar el factor de crecimiento tipo insulina pegilado por incubación del complejo formado en d) con ABTS y por detección de la formación de un producto dotado de color.
- 30

En una realización de dicho método, se lleva a cabo una fase de lavado, después de las etapas b), y/o c), y/o d). En una realización, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es un factor de crecimiento I tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo. En otra realización, la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es de 18 a 22 horas. En otra realización, la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado tiene lugar con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml a 5,0 µg/ml.

35

Un tercer aspecto de la presente invención es un método para la determinación cuantitativa de la cantidad de factor de crecimiento I tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo en una muestra, comprendiendo las siguientes etapas:

40

- a) preparar una muestra a analizar,
- b) preparar, como mínimo, dos muestras de referencia, conteniendo cada una cantidad definida, pero distinta, de factor de crecimiento I tipo insulina pegilado,
- c) incubar separadamente un anticuerpo de anti-poli(etilenglicol) conjugado a una la fase sólida con dicha muestra y con dichas, como mínimo, dos muestras de referencia que contienen diferentes cantidades de factor de crecimiento I tipo insulina pegilado para formar un complejo de anticuerpo de anti-poli(etilenglicol)/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
- 45 d) incubar separadamente dicho complejo formado en c) en cada una de las muestras y muestras de referencia con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado para formar un segundo complejo que comprende el complejo formado en c), de manera que la incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado tiene lugar durante 12 a 24 horas a temperatura ambiente con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos,
- 50

e) incubar separadamente dicho complejo formado en d) en cada una de las muestras y muestras de referencia con un anticuerpo de anti-digoxigenina conjugada de peroxidasa de rábano para formar un tercer complejo que comprende el complejo formado en d),

5 f) incubar separadamente el complejo formado en e) en cada una de las muestras y muestras de referencia con ABTS de 5 a 15 minutos y determinar la cantidad de producto dotado de color que se ha formado,

g) determinar cuantitativamente la cantidad de factor de crecimiento I tipo insulina pegilado o de una variante pegilado del mismo en dicha muestra, con una curva de calibrado calculada basándose en la cantidad de producto de color formado en las muestras de referencia.

10 Un cuarto aspecto de la presente invención es la utilización de un método, según la invención, para el seguimiento de un paciente al que se le ha administrado un factor de crecimiento de tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo.

Una realización de los aspectos de la presente invención es que dicho anticuerpo de captación es una mezcla de dicho anticuerpo de anti-polietilenglicol, que comprende, como mínimo, dos de dichos anticuerpos de anti-polietilenglicol que difieren en el lugar del anticuerpo en el que se conjugan a la fase sólida, y dicho anticuerpo trazador es una mezcla de dicho anticuerpo de anti-digoxigenina, que comprende, como mínimo, dos de dichos anticuerpos de anti-digoxigenina que difieren en el lugar del anticuerpo en el que se conjugan a el marcador detectable. En otra realización, la conjugación del anticuerpo a su asociado de conjugación es llevada a cabo por la unión química a través del terminal N y/o grupos funcionales de ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de diferentes lisinas, grupos funcionales carboxi, sulfidril, hidroxil y/o fenólicos del núcleo del aminoácido del anticuerpo y/o grupos azúcar alcohol de la estructura de carbohidrato del anticuerpo. En una realización de los aspectos de la invención, la mezcla del anticuerpo de captación o mezcla de anticuerpo trazador comprende los respectivos anticuerpos conjugados a través de un grupo amino y a través de una estructura de carbohidrato a su asociado de conjugación. En otra realización, la conjugación del anticuerpo de captación a la fase sólida se lleva a cabo por adsorción pasiva, o por medio de un par de unión específica. En una realización de la invención, el par de unión específica (primer componente/segundo componente) se selecciona a partir de Estreptavidina o Avidina/biotina, o anticuerpo/antígeno, o lecitina/polisacárido, o esteroide/proteína de unión a esteroide, o de hormona/receptor de hormona, o de enzima/sustrato, o de IgG/proteína A y/o G. En otra realización, el anticuerpo de captación está conjugado a la biotina, y la conjugación a la fase sólida es llevada a cabo vía Avidina o Estreptavidina inmovilizada. En otra realización, el anticuerpo de captación es un anticuerpo de anti-polietilenglicol de clase IgM. En otra realización adicional de los aspectos de la invención, el anticuerpo trazador está conjugado a el marcador detectable a través de un par de unión específica. Otra realización de los aspectos de la corriente invención es que, la proporción de anticuerpo de captación a anticuerpo trazador es de 1:10 a 50:1 (la proporción significa proporción de moléculas de anticuerpo con independencia del peso molecular de los conjugados, que pueden ser diferentes).

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención está dirigida a un inmunoensayo para la determinación de factor de crecimiento tipo insulina pegilado o una variante pegilada del mismo utilizando un anticuerpo de captación y un anticuerpo trazador, de manera que dicho anticuerpo de captación es un anticuerpo de anti-polietilenglicol, y dicho anticuerpo trazador es un anticuerpo de anti-digoxigenina, en el que dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es determinado como complejo formado entre dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y una proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina, de manera que la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina digoxigenilado es de 12 a 24 a temperatura ambiente con una concentración de dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 $\mu\text{g/ml}$, o menos.

45 Los inmunoensayos son bien conocidos para los expertos en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como aplicaciones prácticas y procedimientos prácticos están resumidos en los libros de texto relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados Tijssen, P., Preparation of enzyme- antibody or other enzyme-macromolecule conjugates (en: "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990), 221-278, Eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam) y varios volúmenes de "Methods in Enzymology" (Eds. S. P. Colowick, N.O. Caplan, Academic Press), que tratan de métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

55 Los anticuerpos contienen como proteínas una serie de fracciones reactivas, tales como, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteína, y metionina), grupos de ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico), y grupos azúcar alcohol. Estos pueden ser utilizados para el acoplamiento a un miembro de unión, tal como una superficie, una proteína, un polímero (tal como, por ejemplo, PEG, celulosa o poliestirol), una enzima, o un miembro de un par de unión (ver, por ejemplo, Aslam M., y Dent, A., Bioconjugation MacMillan Ref. Ltd. (1999) 50-100).

Uno de los grupos reactivos más comunes de proteínas es la ϵ -amina alifática del aminoácido lisina. En general, casi todos los anticuerpos contienen abundante lisina. Las aminas de lisina son nucleófilos razonablemente satisfactorios

por encima de pH 8,0 ($pK_a=9,18$) y, por lo tanto, reacciona de manera fácil y clara con una serie de reactivos para formar enlaces estables. Otro grupo de reactivos común en los anticuerpos es el residuo de tiol del aminoácido cistina que contiene azufre y su producto de reducción cisteína (o semicistina). La cisteína contiene un grupo tiol libre que es más nucleofílico que las aminas, y que es, generalmente, el grupo funcional más reactivo de una proteína. Los tioles son, en general, reactivos a pH neutro, y por lo tanto, pueden ser selectivamente acoplados a otras moléculas en presencia de aminas. Dado que los grupos sulfhidrilo libres son relativamente reactivos, las proteínas con estos grupos existen frecuentemente con ellos en su forma oxidada como grupos disulfuro o enlaces de disulfuro. Además de cistina y cisteína, algunas proteínas tienen también el aminoácido metionina, que contiene azufre en un enlace tioéter. La literatura indica la utilización de varios reactivos reticulantes tiolantes, tales como el reactivo de Traut (2 iminotiolano), succinimidil (acetiltio) acetato (SATA), o 6-sulfosuccinimidil [3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoato (Sulfo-LC- SPDP) para proporcionar formas eficaces de introducción de grupos sulfhidrilo múltiples a través de grupos amino reactivos. Los ésteres reactivos, particularmente ésteres de N hidroxisuccinimida (NHS), se encuentran entre los reactivos más comúnmente utilizados para la modificación de grupos amina. El pH óptimo para la reacción en un entorno acuoso es pH 8,0 a 9,0. Los isotiocianatos son reactivos modificados por aminas y forman enlaces tiourea con proteínas. Reaccionan con aminas de proteínas en solución acuosa (de manera óptima a pH 9,0 a 9,5). Los aldehídos reaccionan en condiciones acuosas suaves con aminas alifáticas y aromáticas, hidracinas e hidrazidas, para formar un intermediario de imina (base de Schiff). Una base de Schiff puede ser reducida selectivamente con agentes reductores suaves o fuertes (tales como, borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico) para obtener un enlace de alquil amina estables. Otros reactivos que han sido utilizados para modificar aminas son los anhídridos de ácidos. Por ejemplo, el anhídrido dietilenetriaminopentaacético (DTPA) es un agente quelante bifuncional que contiene dos grupos anhídrido reactivos con amina. Puede reaccionar con grupos N terminal y ϵ -amina de proteínas para formar enlaces amida. El anillo de anhídrido se abre para crear brazos multivalentes, quelatantes de metales, capaces de unirse firmemente a metales en un complejo de coordinación.

Otro grupo reactivo común en anticuerpos son los ácidos carboxílicos (ácido aspártico, ácido glutámico). Las proteínas contienen grupos de ácido carboxílico en la posición del terminal C y dentro de las cadenas laterales de ácido aspártico y ácido glutámico. Para la conjugación, el grupo de ácido carboxílico es usualmente convertido en un éster reactivo por la utilización de una carbodiimida soluble en agua, y reacciona con un agente nucleofílico, tal como una amina, hidrazida, o hidracina. El reactivo que contiene amina debe ser débilmente básico, a efectos de reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico activado en presencia de otras aminas en la proteína. La reticulación de la proteína puede tener lugar cuando el pH es aumentado por encima de 8,0.

Se puede utilizar periodato sódico para oxidar la parte de alcohol de un azúcar dentro de una fracción de carbohidrato, pasando a aldehído. Cada grupo aldehído puede ser obligado a reaccionar con una amina, hidrazida o hidracina, tal como se ha descrito para los ácidos carboxílicos. Dado que la fracción de carbohidrato se encuentra predominantemente en la región del fragmento cristalizable (Fc) de un anticuerpo, se puede conseguir la conjugación a través de la modificación dirigida a un lugar específico del carbohidrato alejado del lugar de unión del antígeno.

Los reactivos que reaccionan a tiol son los que se acoplarán a grupos tiol en las proteínas, formando productos acoplados por tioéter. Estos reactivos reaccionan rápidamente para condiciones ligeramente ácidas hasta pH neutro y, por lo tanto, pueden ser llevados a reaccionar selectivamente en presencia de grupos amina. Los derivados de haloacetilo, por ejemplo, iodoacetamidas, forman enlaces tioéter y son reactivos para la modificación de tiol. En anticuerpos, la reacción tiene lugar en grupos de cisteína que están intrínsecamente presentes o que resultan de la reducción de disulfuros de cistina en varias posiciones del anticuerpo. Otros reactivos útiles son las maleimidias. La reacción de maleimidias con reactivos que reaccionan a tiol es esencialmente la misma que con yodoacetamidas. Las maleimidias reaccionan rápidamente a un pH ligeramente ácido hasta pH neutro.

Las aminas, hidrazidas, e hidracinas son reactivos que reaccionan a aldehídos y a ácido carboxílico (formación de amida, hidrazona, o enlaces alquil amina). Las aminas, hidrazidas, e hidracinas pueden ser acopladas a ácidos carboxílicos de proteínas después de la activación del grupo carboxi por una carbodiimida soluble en agua. El reactivo que contiene la amina debe ser débilmente básico, de manera que reaccione selectivamente con la proteína activada por carbodiimida, en presencia de las ϵ -aminas de lisina más altamente básicas para formar un enlace amida estable. En la reacción con grupos de aldehído, que se puede generar en anticuerpos por oxidación por periodato de residuos de carbohidrato en el anticuerpo, se forma un intermediario de base de Schiff, que puede ser reducida a una alquil amina a través de la reducción del intermediario con agentes reductores solubles en agua de cianoborohidruro sódico (suave y selectivo) o borohidruro sódico (fuerte).

El término "inmunoensayo" que se utiliza en la presente invención indica un método de determinación inmunológica, es decir, un método in vitro. Con un inmunoensayo es posible una determinación directa de la presencia y/o la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado o de una variante pegilado del mismo en una muestra (ver, por ejemplo, The Immunoassay Handbook, editado por David Wild, M Stockton Press, 1994). En general, los inmunoensayos comprenden una o varias, en una realización dos moléculas diferentes de unión que se unen específicamente a la molécula a analizar en la muestra. En una realización, el inmunoensayo, según la invención, comprende dos anticuerpos diferentes que se unen a diferentes epítopos no solapados en un factor de crecimiento tipo insulina pegilado. En otra realización, el inmunoensayo, según la invención, comprende un anticuerpo que se

5
10
15
20
25

une específicamente al factor de crecimiento tipo insulina pegilado o a su variante pegilado y una muestra de unión a un epítipo no solapante de la molécula a detectar. A efectos de su detección, como mínimo, una de las moléculas de unión es marcadora con un marcador detectable, que incluye, por ejemplo, radioisótopos, enzimas, o colorantes, que pueden ser detectados por desintegraciones radiactivas, producción de color catalizada enzimáticamente, emisión o inhibición de fluorescencia, o emisión quimioluminiscente. Los métodos de determinación inmunológica incluyen métodos tales como, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA), inmunoensayo fluorescente (FIA), y ensayos quimioluminiscentes (CLA). El inmunoensayo, de acuerdo con la presente invención, es, en una realización, un inmunoensayo heterogéneo. En este ensayo es posible eliminar moléculas no unidas presentes en la muestra a analizar del complejo que comprende el anticuerpo de captación y el analito, que está unido a una la fase sólida. La separación puede ser llevada a cabo por centrifugación, filtrado, separación magnética o aspiración del fluido de la muestra desde la la fase sólida, y en una realización, es seguido de un lavado repetido del complejo unido a la fase sólida con un tampón. En una realización, el inmunoensayo es un inmunoensayo sándwich (ver, por ejemplo, *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay*, John E. Butler, CRC Press, 1991). En este inmunoensayo, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es unido, en una primera etapa, a un anticuerpo inmovilizado de fase sólida que se une específicamente a un primer epítipo del factor de crecimiento tipo insulina pegilado. Después de la formación del complejo, la muestra es retirada y el complejo es lavado repetidamente con un tampón. Posteriormente, una molécula de detección que se une a un epítipo del factor de crecimiento tipo insulina pegilado que es un epítipo no solapante con respecto al primer epítipo, se añade al complejo. Dicha molécula de detección es conjugada, en general, a un marcador detectable, de forma directa (por ejemplo, un grupo fluorescente, una radiomarcador, o un quelato metálico), o indirectamente (por ejemplo, un primer asociado de un par de unión). El factor de crecimiento tipo insulina pegilado es dispuesto en "sándwich" entre el anticuerpo y la molécula de detección. Una segunda etapa de lavado puede ser llevada a cabo para eliminar moléculas de detección no unidas. Finalmente, el marcador detectable es detectada con un agente de detección adecuado. En una realización del inmunoensayo y métodos, según la invención, el anticuerpo se une a la parte de polietilenglicol, y la molécula de detección se une a la parte de factor de crecimiento tipo insulina del factor de crecimiento tipo insulina pegilado o su variante pegilado.

30

El término "muestra", tal como se utiliza dentro de esta invención, indica, sin que ello sea limitativo, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o que, anteriormente, era un ser vivo. Estos seres vivos incluyen, sin que ello sea limitativo, humanos, ratones, monos, ratas, conejos, y otros animales. En una realización, la muestra del inmunoensayo o método, según la invención, se obtiene a partir de un ratón, rata, perro, cynomolgus, o humano. En otra realización, la muestra del inmunoensayo o método, según la invención, procede de cynomolgus o humano. Estas muestras incluyen, sin que ello sea limitativo, sangre completa, suero o plasma de un individuo, que son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras en rutinas clínicas.

35
40
45
50

El término "fase sólida", tal como se utiliza en esta solicitud de patente, indica una sustancia no fluida, y comprende partículas (incluyendo macropartículas y gránulos) realizadas a partir de materiales tales como polímeros, metales (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas) cristal, y cerámica; sustancias gel, tales como sílice, alúmina, y geles de polímeros; capilares que pueden estar realizados a base de un polímero, metal, cristal y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación, placas sólidas; y cubetas, tubos, u otros contenedores de muestras para espectrómetros. Un componente de fase sólida de un ensayo se distingue de superficies sólidas inertes, con las que el ensayo puede encontrarse en contacto, por el hecho de que una "fase sólida" contiene, como mínimo, una fracción en su superficie, que está destinada a interactuar con la molécula de captación utilizada en el ensayo. Una la fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, placa, cubeta, o placa de microtitulación, o puede consistir en componentes no estacionarios, tales como gránulos y micropartículas. Las micropartículas pueden ser utilizadas también como fase sólida para formatos de ensayo homogéneos. Se puede utilizar una serie de micropartículas que permiten la unión no covalente o covalente de proteínas y otras sustancias. Estas partículas incluyen partículas de polímeros, tales como poliestireno y poli(metilmetacrilato); partículas de oro, tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas cerámicas, tales como partículas de sílice, de cristal, y de óxidos metálicos. Ver por ejemplo Martin, C. R., y otros, *Analytical Chemistry- News & Features* (1998) 322A-327A. Se describen ampliamente, en el estado de la técnica, soportes sólidos para los inmunoensayos de la invención (ver, por ejemplo, Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23).

55

Son ejemplos de "marcadores detectables", los cromógenos (grupos fluorescentes o luminiscentes y colorantes), enzimas, grupos activos NMR o partículas metálicas, haptenos, por ejemplo, digoxigenina. El marcador detectable puede ser también un grupo reticulante fotoactivable, por ejemplo, un grupo azido o un grupo azirina. Un quelato metálico, que puede ser detectado por electroquimioluminiscencia, es, en una realización, el marcador detectable, dándose especial preferencia a los quelatos de rutenio, por ejemplo, (bispiridil)₃²⁺ quelato de rutenio. Se describen, por ejemplo, grupos de marcadores adecuados de rutenio en EP 0 580 979, WO 90/005301, WO 90/11511 y WO 92/14138.

60

Para una detección directa, el grupo de marcadores puede ser seleccionado a partir de cualquier grupo detectable, tal como colorantes, grupos de marcadores luminiscentes (tal como, grupos quimioluminiscentes, por ejemplo ésteres o dioxetanos de acridinio), o colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, cuomarina, rodamina, oxacina, resorufina, cianina, y derivados de los mismos. Otros ejemplos de grupos de marcadores son complejos de metales luminiscentes (tales como, complejos de rutenio o de europio), enzimas (por ejemplo, tal como se utiliza

para ELISA o para CEDIA (Cloned Enzyme Donor Immunoassay, por ejemplo, EP-A-O 061 888)), y radioisótopos.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección es marcado con un primer asociado de un par de unión que tiene bioafinidad. Son ejemplos de pares de unión adecuados: hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lecitina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo, receptor de hormona esteroide/hormona esteroide. De manera preferente, los miembros del primer par de unión comprenden hapteno, antígeno, y hormona. Son especialmente preferentes haptenos, tales como digoxina y biotina, y análogos de los mismos. El segundo asociado de dicho par de unión, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., es usualmente marcado para permitir la detección directa, por ejemplo, por las marcadores que se han mencionado anteriormente.

En los métodos de detección inmunológica, según la presente invención, se escogen condiciones de reactivo que permiten la unión de los reactivos empleados, por ejemplo, para la unión de un anticuerpo al factor de crecimiento tipo insulina pegilado. Los expertos en la materia se refieren al resultado de dicho evento de unión utilizando el término "complejo". El complejo formado en un método de ensayo, según la presente invención, puede ser utilizado, o bien para determinar la presencia o para determinar la concentración, es decir, para cuantificar la cantidad.

El término "factor de crecimiento tipo insulina" tal como se utiliza en esta solicitud, indica una proteína de la SED ID NO: 1 (factor de crecimiento I tipo insulina) o SEQ ID NO: 2 (factor de crecimiento II de tipo insulina) o una variante de los mismos. Una variante del factor de crecimiento tipo insulina es, en una realización, un factor de crecimiento tipo insulina de la SEQ ID NO: 1, con la lisina en posición 27 sustituida por un aminoácido polar, y ya sea la lisina en posición 65 o la lisina en posición 68 sustituidas por un aminoácido polar. El término "aminoácido polar" indica arginina, glutamina, y asparagina, es decir, la lisina es sustituida por arginina, glutamina, o asparagina. En una realización, dicho aminoácido polar es arginina. En otra realización, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es factor de crecimiento tipo insulina monopegilado, con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1, con la lisina en posiciones 27 y 65 sustituida por un aminoácido polar y un residuo PEG unido covalentemente al aminoácido en posición 68. En otra realización, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es un factor de crecimiento tipo insulina monopegilado con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1, con la lisina en la posición 27 y 68 sustituida por un aminoácido polar y un residuo PEG unido de forma covalente a la posición de aminoácido 65. En otra realización adicional, dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es un factor de crecimiento tipo insulina monopegilado con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1, con la lisina en posición 27 o con la lisina en posición 27 y 65 y/o 68 sustituida por un aminoácido polar y un residuo PEG unido de forma covalente al terminal amino de dicho factor.

El primer aspecto de la presente invención es un inmunoensayo para la detección de factor de crecimiento tipo insulina pegilado que comprende un anticuerpo de captación, un complejo de factor de crecimiento tipo insulina/proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina y un anticuerpo trazador, en el que

- a) dicho anticuerpo de captación es un anticuerpo monoclonal anti-polietilenglicol,
- b) dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es detectado como complejo con una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado,
- c) dicho anticuerpo trazador es un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina.

El anticuerpo contra polietilenglicol (PEG) es biotinilado y, en una realización, unido a una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. El factor de crecimiento tipo insulina pegilado o su variante pegilado, ya sea como referencia estándar o de las muestras de prueba, se une al anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida en una primera etapa de incubación. El término "factor de crecimiento tipo insulina pegilado" tal como se utiliza en esta solicitud de patente, indica un "factor de crecimiento tipo insulina", al que se fija, de modo covalente, un residuo de polietilenglicol. Después de ello, el reactivo de detección digoxigenilado, en una realización, una proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado, que se presenta en exceso, se une en una segunda etapa de incubación al complejo formado en primer lugar. En una muestra derivada de un mamífero, el factor de crecimiento tipo insulina formará, en general, un complejo con la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina endógena. Para determinar el factor de crecimiento tipo insulina pegilado, la proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina endógena tiene que ser sustituida por la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado del ensayo que, por lo tanto, es añadido en exceso. Se utilizan como sistema de detección, anticuerpos de anti-digoxigenina conjugados a peroxidasa de rábano y solución ABTS.

En una realización, el anticuerpo de captación es un anticuerpo completo, es decir, comprende una cadena ligera y una cadena pesada, de manera que la cadena ligera comprende un dominio variable y un dominio constante y de manera que la cadena pesada comprende un dominio variable, un C_H1, a C_H2, a C_H3, y opcionalmente un dominio C_H4, así como una región charnela. El anticuerpo de captación puede ser seleccionado, en una realización distinta, a partir de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, un fragmento Fab, Fab', F(ab)₂, o F(ab')₂ de dicho

anticuerpo anti-poli(etil)englicol, es decir, es, o bien la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, el fragmento Fab, o Fab', o F(ab)₂, o F(ab')₂ de dicho anticuerpo anti-poli(etil)englicol.

5 Dependiendo de la secuencia de aminoácido de la región constante de la cadena pesada, se asignan inmunoglobulinas de diferentes clases: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM. Algunas de estas clases son divididas, además, en subclases (isotipos), es decir, IgG en IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, o IgA en IgA1 e IgA2. En una realización, el anticuerpo de captación es un anticuerpo múltiplo, por ejemplo, un IgM.

La conjugación de un trazador y/o anticuerpo de captación a su asociado de conjugación, se puede llevar a cabo por diferentes métodos, tales como adsorción pasiva, unión química, o unión a través de un par de unión específico. El término "asociado de conjugación" tal como se utiliza en esta descripción, indica, por ejemplo, una fase sólida, un polipéptido, un marcador detectable, o un miembro de un par de unión específico. En una realización, la conjugación del anticuerpo de captación y/o trazador a su asociado de conjugación es llevada a cabo, independientemente de uno u otro, por unión química con intermedio del terminal N y/o grupos ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos carboxi, sulfhidrilo, hidróxilo, y/o fenólicos funcionales del núcleo del aminoácido del anticuerpo y/o grupos azúcar alcohol de la estructura de carbohidrato del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo de captación y/o trazador son/es conjugado a su asociado de conjugación con intermedio de un par de unión específico. En una realización, el anticuerpo de captación es conjugado con biotina y se lleva a cabo la inmovilización de un soporte sólido con intermedio de avidina o estreptavidina inmovilizada en una fase sólida. En una realización, el anticuerpo trazador es conjugado de peroxidasa de rábano y es un anticuerpo contra la digoxigenina. El anticuerpo de captación es conjugado en otra realización, a la fase sólida por adsorción pasiva. Un anticuerpo conjugado a la fase sólida por adsorción pasiva comprende una mezcla de anticuerpos conjugados a la fase sólida con intermedio de diferentes lugares de anticuerpo. De este modo, el anticuerpo de captación conjugado con la fase sólida por adsorción pasiva es una mezcla de dos o más conjugados distintos, en la que los conjugados difieren del lugar del anticuerpo, es decir, el residuo de aminoácido del anticuerpo con el que se efectúa la conjugación a la fase sólida. La adsorción pasiva es descrita, por ejemplo, por Butler, J.E., "Solid Phases in Immunoassay", página 205-225 en Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (Editors): Immunoassay (1996), Academic Press, San Diego. En una realización de la invención, el anticuerpo de captación es inmovilizado con intermedio de un par de unión específico. Este par de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (ver, por ejemplo, Hermanson, G.T., y otros, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), lecitina/polisacárido, esteroide/proteína de unión a esteroide, hormona/receptor de hormona, enzima/sustrato, IgG/proteína A y/o G y/o L, etc. En una realización, el anticuerpo de captación es conjugado a biotina, y la inmovilización es llevada a cabo con intermedio de avidina o estreptavidina inmovilizada. En otra realización, el anticuerpo trazador es conjugado de un marcador electroquimioluminiscente, tal como un complejo de rutenio bispíridilo.

El inmunoensayo, según la invención, utiliza la interacción específica del factor de crecimiento tipo insulina con proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina. La proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina se une específicamente al factor de crecimiento tipo insulina, y el complejo formado de factor de crecimiento tipo insulina/proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina es detectado. El complejo no puede ser detectado directamente y, por lo tanto, se requieren asociados de unión adicionales. Por lo tanto, el inmunoensayo, de acuerdo con la invención, comprende como elementos de núcleo:

- 40 a) un anticuerpo de captación que se une específicamente al factor de crecimiento tipo insulina,
- b) un anticuerpo trazador que se une específicamente a la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina.

Por lo tanto, el inmunoensayo, de acuerdo con la invención, para la detección de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, comprende los siguientes compuestos (ver también figura 1):

- 45 - una la fase sólida,
- un anticuerpo de captación que se une específicamente a poli(etil)englicol y que es conjugado de la fase sólida,
- una proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina, que es conjugada directamente a un marcador detectable, o que es conjugada a un primer asociado de un par de unión,
- 50 - opcionalmente, si la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina está conjugada a un primer asociado de un par de unión, una molécula trazadora que comprende el segundo asociado de dicho par de unión.

El anticuerpo anti-poli(etil)englicol conjugado a la fase sólida se une específicamente al residuo de poli(etil)englicol de los compuestos pegilados. Si una muestra que contiene compuestos pegilados se pone en contacto con el anticuerpo anti-poli(etil)englicol conjugado a la fase sólida, los compuestos pegilados serán unidos por el anticuerpo anti-poli(etil)englicol, y de este modo se conjugarán a la fase sólida con intermedio del anticuerpo anti-poli(etil)englicol. El anticuerpo anti-poli(etil)englicol es, en una realización, un anticuerpo monoclonal, y puede ser cualquier clase de

inmunoglobulina. En otra realización, dicho anticuerpo anti-poli(etil)englicol es un anticuerpo anti-poli(etil)englicol monoclonal de la clase IgM. Se indican anticuerpos anti-poli(etil)englicol a título de ejemplo en los documentos US 7.320.791 o WO 2002/094853. La conjugación del anticuerpo anti-poli(etil)englicol a la fase sólida puede ser covalente o por medio de un par de unión específico o mediante interacciones físicas.

- 5 La fase sólida es, en una realización, un pocillo de una placa de microtitulación. La conjugación de dicho anticuerpo de captación anti-poli(etil)englicol a la fase sólida tiene lugar, en una realización, mediante un par de unión específico, por ejemplo, con intermedio del par de unión específico estreptavidina/biotina, de manera que el anticuerpo anti-poli(etil)englicol es enlazado a la biotina con intermedio de un enlace covalente, y la fase sólida es enlazada a estreptavidina con intermedio de un enlace covalente.
- 10 El término "proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina" comprende, en la presente invención, las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina: proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 1, proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 2, proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 3, proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 4, proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 5, y proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 6. Las secuencias de las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina 1 a 6 se describen en detalle en la base de datos SwissProt (<http://www.expasy.ch>) y se identifican por los números de acceso siguientes:

Nombre	No. de Acceso
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 1	P 08833
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 2	P 18065
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 3	P 17936
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 4	P 22692
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 5	P 24593
proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina 6	P 24592

La proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina, en el inmunoensayo, según la invención, es, en una realización, la proteína 3 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, o la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, o la proteína 5 de unión a factor de crecimiento tipo insulina.

En muestras derivadas de mamíferos, por ejemplo, muestras humanas, el factor de crecimiento tipo insulina formará un complejo con una de las proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina endógenas 1 a 6, mientras que la proteína 3 de factor de crecimiento tipo insulina es la más abundante (Rajaram, S., y otros, *Endocr. Rev.* 18 (1997) 801-831). En una realización, la proteína de unión de factor de crecimiento tipo insulina en el inmunoensayo o método según la invención, es la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina de la SEQ ID NO: 3. El marcador detectable que es conjugado a la proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina es conjugado con intermedio de un enlace covalente. En una realización, el marcador detectable seleccionado a partir de enzimas, antígenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes, complejos metal-quelato, y grupos electroquimioluminiscentes. En otra realización, el marcador detectable seleccionado de digoxigenina y los complejos de bispíridilo de rutenio.

El siguiente aspecto de la presente invención es un método para la determinación de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, que comprende las siguientes etapas:

- a) disponer una muestra a analizar,
- b) incubar un anticuerpo anti-poli(etil)englicol conjugado a una la fase sólida con dicha muestra para formar un complejo anticuerpo anti-poli(etil)englicol/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
- c) incuba dicho complejo formado en b) con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado para formar un complejo que comprende el complejo formado en b),
- d) incubar dicho complejo formado en c) con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa para formar un complejo que comprende el complejo formado en c),
- e) determinar el factor de crecimiento tipo insulina pegilado por incubación del complejo formado en d) con ABTS y por formación de producto dotado de color.

En la determinación del factor de crecimiento tipo insulina pegilado con el método según la invención, se llevan a cabo cuatro etapas. En la primera etapa, un anticuerpo anti-poli(etil)englicol, que está conjugado a una fase sólida,

por ejemplo, con intermedio del par de unión específico estreptavidina/biotina, es incubado con una muestra en cuestión de la que se sospecha que contiene polipéptidos pegilados, especialmente que contiene factor de crecimiento tipo insulina pegilado. En una realización, la muestra es suero de sangre procedente de ratón, rata, perro, cynomolgus, o humano. La primera etapa de incubación, en una realización es de 0,5 horas a 5 horas, por ejemplo, una hora aproximadamente. El anticuerpo anti-polietilenglicol se une específicamente a polipéptidos pegilados contenidos en la muestra, y conjuga de esta manera el polipéptido pegilado también a la fase sólida con intermedio del anticuerpo anti-polietilenglicol. Después de la primera etapa de incubación, la fase sólida es opcionalmente lavada con una solución tamponada.

En la segunda etapa de incubación, el complejo que consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida y el polipéptido pegilado formado en la primera etapa de incubación es incubado con la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado. Se forma un segundo complejo adicional solamente si el polipéptido pegilado contenido en el complejo obtenido en la primera etapa de incubación es un factor de crecimiento tipo insulina pegilado. Para la determinación del factor de crecimiento tipo insulina pegilado, se añade un exceso de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina, para sustituir la proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina endógena formando complejo con el factor de crecimiento tipo insulina pegilado de la muestra. El segundo complejo consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado en la fase sólida, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado unido al mismo y la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado unido al mismo. La segunda etapa de incubación, en una realización, es de 12 a 24 horas, en otra realización, de 18 a 22 horas. Después de la segunda etapa de incubación, la fase sólida es lavada opcionalmente con una solución tamponada.

En la tercera etapa de incubación, el complejo que consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado y la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es incubado con un anticuerpo anti-digoxigenina que está conjugado a peroxidasa de rábano, y se forma un tercer complejo. El tercer complejo consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida. El factor de crecimiento tipo insulina pegilado unido a aquél, la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina tipo digoxigenilado unido al mismo, y el anticuerpo anti-digoxigenina unido a aquél, conjugado a peroxidasa de rábano. La tercera etapa de incubación, en una realización, es de 0,5 horas a 5 horas, por ejemplo, una hora aproximadamente. Después de la tercera etapa de incubación, la fase sólida es lavada opcionalmente con una solución tamponada.

En la cuarta etapa de incubación, el complejo que consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado, la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado y el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa de rábano es incubado con ácido 2,2' azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), un sustrato para la enzima de peroxidasa de rábano, que se convierte por la enzima, en un producto dotado de color con una absorbancia máxima en 405 nm. La concentración del compuesto de color es proporcional a la cantidad de peroxidasa de rábano y, por lo tanto, a la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en la muestra analizada. Por lo tanto, es posible una determinación cuantitativa si se analizan, como mínimo, dos muestras de referencia con una concentración conocida de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, se determina una curva en función de suavización/calibrado, y con ella, se calcula la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado.

La cuarta etapa de incubación se interrumpe, en una realización, cuando la densidad óptica (OD) de la solución a 405 nm, reducida por la densidad óptica de la solución a 490 nm (longitud de onda de referencia, en blanco), está comprendida entre 1,9 y 2,1. En otra realización, la cuarta etapa de incubación está comprendida entre 5 y 15 minutos, en una realización adicional, de 8 a 12 minutos.

Se ha descubierto que algunos parámetros del inmunoensayo tienen que ser escogidos cuidadosamente. Uno de esos parámetros es el tiempo de incubación de la segunda etapa de incubación del complejo, que consiste en el anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida y el factor de crecimiento tipo insulina pegilado con la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado. Se ha descubierto que un tiempo de incubación más largo tiene como resultado un ensayo con susceptibilidad reducida, por ejemplo, para otros componentes del suero humano o por competencia de proteínas de unión a factor de crecimiento tipo insulina (figuras 3 y 4). Por lo tanto, en una realización, el tiempo de incubación en la segunda etapa de incubación del ensayo, según la invención, es de 12 a 24 horas. Otro parámetro es la temperatura de incubación en la segunda etapa de incubación. Se ha descubierto que una temperatura de incubación, en la segunda etapa de incubación, de 20 a 25°C, es decir, temperatura ambiente (figura 5), es favorable en comparación con una temperatura baja, por ejemplo, 4°C (figura 6). Otro parámetro que tiene que ser tenido en cuenta, es la concentración de la proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado utilizado. Se ha descubierto que dicha concentración tiene que ser de 5,0 µg/ml, o inferior. En una realización, la concentración de proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado está comprendida de 0,1 µg/ml a 5,0, en otra realización de 0,1 µg/ml a 1,0 µg/ml.

Se tiene que observar que si la muestra que se ha dispuesto no contiene factor de crecimiento tipo insulina pegilado, no se forma complejo en la segunda etapa de incubación y, por lo tanto, no se forma producto dotado de coloración en la cuarta etapa de incubación.

El tercer aspecto de la presente invención es un método para la determinación cuantitativa de la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en una muestra, comprendiendo las siguientes etapas:

- 5 a) disponer una muestra a analizar,
- b) disponer muestras de referencia que contengan cantidades conocidas de factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
- 10 c) incubar separadamente un anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a la fase sólida con cada una de dichas muestras y, como mínimo, dos muestras de referencia que contienen diferentes cantidades de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, para formar un complejo de anticuerpo anti-polietilenglicol/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
- d) incubar dicho complejo formado en c) en cada una de las muestras y muestras de referencia con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado, para formar un segundo complejo que comprende el complejo formado en c), de manera que el tiempo de incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es de 12 a 20 horas,
- 15 e) incubar dicho complejo formado en d) en cada una de las muestras y muestras de referencia con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa de rábano, para formar un tercer complejo que comprende el complejo formado en d),
- f) incubar el complejo formado en e) en cada una de las muestras y muestras de referencia con ABTS durante 5 a 15 minutos, y determinar la cantidad de producto de color que se ha formado,
- 20 g) determinar cuantitativamente la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado de la muestra, basándose en una curva de calibrado o una función de suavización calculada basándose en la cantidad de producto de color formado en las muestras de referencia.

El cuarto aspecto de la presente invención es la utilización del método, según la invención, para el seguimiento de un paciente al que se ha administrado factor de crecimiento tipo insulina pegilado.

25 Los siguientes ejemplos, lista de secuencias y figuras se facilitan para llevar a cabo la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance es el determinado por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

30 **Figura 1** Esquema del inmunoensayo, según la invención, a base de un ejemplo de factor I de crecimiento tipo insulina y proteína 4 de unión al factor de crecimiento tipo insulina; 1: placa de microtitulación recubierta con estreptavidina, 2: anticuerpo anti-polietilenglicol biotinilado monoclonal, 3: factor I de crecimiento tipo insulina pegilado, 4: proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado, 5: anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa de rábano monoclonal.

Figura 2 Curva estándar obtenido con muestras de referencia (ejemplo 2); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media.

35 **Figura 3** Curvas estándar obtenidas con muestras i) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (diamante), ii) con la aplicación de 5% (v/v) de suero humano y cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (triángulos) y iii) con la aplicación de 10 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, 5% (v/v) de suero humano y cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (cuadrados); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media; condiciones de ensayo: anticuerpo anti-polietilenglicol de clase IgM, proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado a una concentración de 0,1 µg/ml, conjugado de peroxidasa de rábano-anticuerpo anti-digoxigenina a 50 mU/ml, todos los tiempos de incubación: 1 hora, temperatura ambiente, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es una mezcla de proteína pegilado en el terminal N y en la posición 68.

45 **Figura 4** Curvas estándar obtenidas con muestras i) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (diamante), ii) con la aplicación de 5% (v/v) de suero humano y cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (triángulos) y iii) con la aplicación de 10 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, 5% (v/v) de suero humano y cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado (cuadrados); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media; condiciones de ensayo: anticuerpo anti-polietilenglicol de clase IgM, proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado a una concentración de 0,1 µg/ml, conjugado de peroxidasa de rábano-anticuerpo anti-digoxigenina a 50 mU/ml, todos los tiempos de incubación: 1 hora, excepto para la incubación de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado que es de 20 horas, temperatura

ambiente, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es una mezcla de proteína pegilado en el terminal N y en la posición 68.

Figura 5 Curvas estándar obtenidas con muestras i) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml (diamantes), ii) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml (triángulos); iii) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,5 µg/ml (cuadrados); iv) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 1,0 µg/ml (cuadrados pequeños); v) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml (guiones); vi) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 10,0 µg/ml (triángulos pequeños); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media; condiciones de ensayo: anticuerpo anti-polietilenglicol de clase IgM, conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-peroxidasa de rábano a 50 mU/ml, todos los tiempos de incubación: 1 hora, excepto para la incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado que es de 20 horas, temperatura ambiente, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es una mezcla de proteína pegilado en el terminal N y en la posición 68.

Figura 6 Curvas estándar obtenidas con muestras i) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml (diamantes), ii) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml (triángulos); iii) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,5 µg/ml (cuadrados); iv) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 1,0 µg/ml (cuadrados pequeños); v) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml (guiones); vi) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, 20 ng/ml de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina y una concentración de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 10,0 µg/ml (triángulos pequeños); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media; condiciones de ensayo: anticuerpo anti-polietilenglicol de clase IgM, conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-peroxidasa de rábano a 50 mU/ml, todos los tiempos de incubación: 1 hora, excepto la incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado que es de 20 horas, 4°C, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es una mezcla de proteína pegilado en el terminal N y en la posición 68.

Figura 7 Comparación de curvas estándar obtenidas con muestras i) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y 5% (v/v) de suero humano (triángulos), ii) con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y 5% (v/v) de suero de ratón (triángulos); eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media; condiciones de ensayo: anticuerpo anti-polietilenglicol de clase IgM, conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-peroxidasa de rábano a 25 mU/ml, todos los tiempos de incubación: 1 hora, excepto la incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado que es de 20 horas, temperatura ambiente, el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es una mezcla de proteína pegilado en el terminal N y en la posición 68.

Figura 8 Curva estándar obtenida con muestras de referencia con la aplicación de cantidades de referencia de factor de crecimiento tipo insulina pegilado y 5% (v/v) de plasma humano; eje X: concentración de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en ng/ml, eje Y: señal de absorción media.

Descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos de factor I de crecimiento tipo insulina humano (aminoácidos 49 a 118 de SwissProt ID P01343).

5 **SEQ ID NO: 2** Secuencia de aminoácidos de factor II de crecimiento tipo insulina humano (aminoácidos 25 a 91 de SwissProt ID P01344).

SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina humano (aminoácidos 22 a 258 de SwissProt ID P022692).

Ejemplo 1:10 **Preparación de anticuerpo anti-poli(etilenglicol) conjugado a una placa de microtitulación**

Una solución de anticuerpo anti-poli(etilenglicol) biotilado con una concentración final de anticuerpo de 2 µg/ml fue añadida a los pocillos de una placa de microtitulación (MicroCoat) de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina con 100 µg/ml en cada pocillo. Posteriormente, las soluciones incubadas a temperatura ambiente a 500 rpm durante una hora. Posteriormente, la solución es eliminada y los pocillos son lavados tres veces, cada uno con 300 µg/ml de tampón de lavado (1x PBS (solución salina con tampón fosfato) suplementado con 0,05% (w/v) de n-octilglicósido).

15

Ejemplo 2:**Preparación de muestras**

a) Muestra estándar

20 Se preparó una solución base de factor I de crecimiento de tipo insulina pegilado (para la preparación de factor I de crecimiento tipo insulina pegilado, ver, por ejemplo el documento WO 2006/066891) con una concentración de 2 ng/ml en tampón PBS (solución salina con tampón de fosfato) suplementada con 0,5% (w/v) de albúmina 1 de plasma bovino. La solución base fue diluida a las siguientes concentraciones:

2.00 ng/ml
1.00 ng/ml
0.50 ng/ml
0.25 ng/ml
0.13 ng/ml
0.06 ng/ml
0.03 ng/ml
0.00 ng/ml

b) Muestra de referencia con suero o plasma

25 Se preparó una solución base de factor I de crecimiento tipo insulina pegilado (para la preparación de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, ver, por ejemplo WO 2006/066891) con una concentración de 2 ng/ml en 5% de suero de ratón acumulado, en blanco, o 5% de suero humano acumulado, en blanco, o 5% de plasma humano acumulado, en blanco, en tampón PBS (solución salina con tampón de fosfato) suplementada con 0,5% (p/v) de albúmina 1 de plasma bovino. La solución base fue diluida a las siguientes concentraciones:

2.00 ng/ml
1.00 ng/ml
0.50 ng/ml
0.25 ng/ml
0.13 ng/ml
0.06 ng/ml
0.03 ng/ml
0.00 ng/ml

c) Muestra de pruebas

La muestra del suero de prueba desconocido es diluido con 1:20 con 5% de suero de ratón acumulado, en blanco, en solución salina con tampón de fosfato con, 5% (p/v) de albúmina 1 de plasma bovino.

5 **Ejemplo 3****Inmunoensayo**

A los pocillos de una placa de microtitulación obtenida, según el ejemplo 1, se añadieron 100 μ l de cada una de las referencias y muestras de pruebas por duplicado. Los pocillos fueron incubados durante una hora con agitación a 500 rpm. Posteriormente, la solución es eliminada y cada pocillo es lavado tres veces, cada vez con 300 μ l de solución salina con tampón de fosfato, suplementada con 0,05% (p/v) de n-octilglicósido. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 μ l de una solución de proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado a 100 ng/ml y se incubó durante 12-24 horas, preferentemente 20 horas, con agitación a 500 rpm. Posteriormente, la solución fue eliminada y cada pocillo fue lavado tres veces, cada vez con 300 μ l de solución salina con tampón de fosfato con suplemento de 0,05% (p/v) de n-octilglicósido. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 μ l de una solución de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a peroxidasa de rábano con una concentración final de 50 mU/ml a cada pocillo, y se incubó durante una hora con agitación a 500 rpm. Posteriormente, la solución de los pocillos fue eliminada y cada pocillo fue lavado tres veces, cada una de ellas con 300 μ l de solución salina con tampón de fosfato suplementada con 0,05% (p/v) de n-octilglicósido. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 100 μ l de una solución de ABTS. La reacción se interrumpió cuando la solución de estándar más elevado de 2 ng/ml alcanzó un valor OD de 1,9 - 2,0. Esto requiere normalmente entre 5 y 15 minutos. El OD de las muestras estándar y de prueba fue medido a 405 nm y 490 nm. Se obtuvo una curva estándar de los estándares de referencia utilizando un programa de acoplamiento de 4 parámetros. Con la curva estándar, se calculó la cantidad de factor I de crecimiento tipo insulina pegilado en las muestras de prueba. El límite inferior de detección y límite inferior de cuantificación han sido calculados en 20 pg/ml y 31 pg/ml, respectivamente. Todas las etapas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.

tabla 1: Resultados típicos del control positivo

Muestra No. 1	Muestra No. 2	Muestra No. 3	Concentración de la muestra	Media	STDEV	CV [%]
2.0350	2.0550	2.0020	2.00 ng/ml	2.0307	0.0268	1.3%
1.6600	1.6640	1.7330	1.00 ng/ml	1.6857	0.0410	2.4%
1.2090	1.2520	1.2240	0.50 ng/ml	1.2283	0.0218	1.8%
0.7570	0.7340	0.7660	0.25 ng/ml	0.7523	0.0165	2.2%
0.4390	0.4280	0.4360	0.13 ng/ml	0.4343	0.0057	1.3%
0.2500	0.2520	0.2430	0.06 ng/ml	0.2483	0.0047	1.9%
0.1410	0.1590	0.1490	0.03 ng/ml	0.1497	0.0090	6.0%
0.0590	0.0620	0.0660	0.00 ng/ml	0.0623	0.0035	5.6%

Ejemplo 4

Biotinilación de anticuerpo anti-polietilenglicol

5 Se dializó un anticuerpo contra polietilenglicol contra tampón (tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 8,5). Posteriormente, la solución fue ajustada a una concentración de proteína de 10 mg/ml. Se disolvió en DMSO éster de ácido de biotinoil amino-crapróico-n-hidroxisuccinimida y se añadió a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Después de 60 minutos, la reacción fue interrumpida añadiendo L-lisina. El exceso de reactivo de marcado se eliminó por diálisis contra un tampón de fosfato potásico de 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Ejemplo 5

10 **Digoxigenilación de proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina**

15 Se dializó una proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina contra tampón de digoxigenilación (tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 8,5). Posteriormente, la solución fue ajustada a una concentración de proteína de 100 mg/ml. Se disolvieron en DMSO éster de ácido digoxigenin 3-O-metilcarbonil-ε-aminocapróico-n-hidroxisuccinimida en DMSO, y se añadió a la solución del anticuerpo en una proporción molar de 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se interrumpió añadiendo L-lisina. El exceso de reactivo de marcado se eliminó por diálisis contra un tampón de fosfato potásico de 25 mM suplementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Ensayo de factor de crecimiento tipo insulina pegilada

<130> 24884 WO

<150> EP 08006768.9

<151> 2008-04-03

<160> 3

<170> Versión patentín 3.2

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 375 606 T3

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 2
<211> 67
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
20 25 30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
35 40 45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Glu
65

<210> 3
<211> 237
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 375 606 T3

Asp Glu Ala Ile His Cys Pro Pro Cys Ser Glu Glu Lys Leu Ala Arg
 1 5 10 15

Cys Arg Pro Pro Val Gly Cys Glu Glu Leu Val Arg Glu Pro Gly Cys
 20 25 30

Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Leu Gly Leu Gly Met Pro Cys Gly Val
 35 40 45

Tyr Thr Pro Arg Cys Gly Ser Gly Leu Arg Cys Tyr Pro Pro Arg Gly
 50 55 60

Val Glu Lys Pro Leu His Thr Leu Met His Gly Gln Gly Val Cys Met
 65 70 75 80

Glu Leu Ala Glu Ile Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Gln Pro Ser Asp
 85 90 95

Lys Asp Glu Gly Asp His Pro Asn Asn Ser Phe Ser Pro Cys Ser Ala
 100 105 110

His Asp Arg Arg Cys Leu Gln Lys His Phe Ala Lys Ile Arg Asp Arg
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Lys Met Lys Val Asn Gly Ala Pro Arg Glu Asp
 130 135 140

REIVINDICACIONES

1. Inmunoensayo para la detección de factor de crecimiento tipo insulina pegilado que comprende un anticuerpo de captación y un anticuerpo trazador, caracterizado porque
- 5 a) dicho anticuerpo de captación es un anticuerpo anti-poli(etilenglicol) monoclonal,
b) dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es detectado como complejo con una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado,
c) dicho anticuerpo trazador es un anticuerpo anti-digoxigenina monoclonal,
- en el que la incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado se extiende a 12-24 horas a temperatura ambiente con una concentración de dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos.
- 10 2. Inmunoensayo, según la reivindicación 1, caracterizado porque
- a) dicho anticuerpo anti-poli(etilenglicol) es conjugado a una fase sólida, y
b) dicho anticuerpo anti-digoxigenina es conjugado a un marcador detectable.
3. Inmunoensayo, según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho marcador detectable es seleccionado a partir de enzimas, antígenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes, grupos electroquimioluminiscentes, y complejos metal-quelato.
- 15 4. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el factor de crecimiento tipo insulina pegilado es un factor I de crecimiento de tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo.
5. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina es la proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina.
- 20 6. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es de 18 a 22 horas.
7. Inmunoensayo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la etapa de incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado tiene lugar con una concentración de dicha proteína de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml a 5,0 µg/ml.
- 25 8. Método, para la determinación del factor de crecimiento tipo insulina pegilado en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- a) disponer una muestra a analizar,
- 30 b) incubar un anticuerpo anti-poli(etilenglicol) conjugado a dicha fase sólida con dicha muestra para formar un complejo de anticuerpo anti-poli(etilenglicol)/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,
c) incubar dicho complejo formado en b) con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado para formar un complejo que comprende el complejo formado en b) a temperatura ambiente durante 12 a 24 horas con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos,
- 35 d) incubar dicho complejo formado en c) con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa de rábano para formar un complejo que comprende el complejo formado en c),
e) determinar el factor de crecimiento tipo insulina pegilado por incubación del complejo formado en d) con ABTS y a partir de la formación de un producto dotado de color.
- 40 9. Método, según la reivindicación 8, caracterizado porque después de las etapas b), c), y/o d) se lleva a cabo una etapa de lavado.
10. Método, según la reivindicación 8 ó 9, caracterizado porque dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado es el factor I de crecimiento tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo.
- 45 11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque la incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado es de 18 a 22 horas.

12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque la incubación de dicho factor de crecimiento tipo insulina pegilado y dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado tiene lugar con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 0,1 µg/ml a 5,0 µg/ml.

5 13. Utilización de un método, según la reivindicación 8, para el seguimiento de un paciente al que se le administra factor I de crecimiento tipo insulina pegilado o una variante pegilado del mismo.

14. Método para la determinación cuantitativa de la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

a) disponer una muestra a analizar,

10 b) disponer una muestra de referencia que contiene una cantidad definida de un factor de crecimiento tipo insulina pegilado,

15 c) incubar un anticuerpo anti-polietilenglicol conjugado a una fase sólida cada una de dichas muestras y, como mínimo, dos muestras de referencia que contienen diferentes cantidades de factor de crecimiento tipo insulina pegilado, para formar un complejo de anticuerpo anti-polietilenglicol/factor de crecimiento tipo insulina pegilado,

20 d) incubar dicho complejo formado en c) en cada una de las muestras y muestras de referencia con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado, para formar un segundo complejo que comprende el complejo formado en c), de manera que la incubación con proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado tiene lugar durante 12 a 24 horas a temperatura ambiente, con una concentración de dicha proteína 4 de unión a factor de crecimiento tipo insulina digoxigenilado de 5,0 µg/ml, o menos,

e) incubación de dicho complejo formado en d) en cada una de las muestras y muestras de referencia con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado de peroxidasa de rábano, para formar un tercer complejo que comprende el complejo formado en d),

25 f) incubar el complejo formado en e) en cada una de las muestras y muestras de referencia con ABTS durante un tiempo de 5 a 15 minutos y determinar la cantidad del producto dotado de color que se ha formado,

30 g) determinar cuantitativamente la cantidad de factor de crecimiento tipo insulina pegilado en dicha muestra, basado en una curva de calibrado calculada en base a la cantidad del producto de color formado en las muestras de referencia.

15. Método, según la reivindicación 14, caracterizado porque en la etapa d) dicha incubación tiene lugar durante 18 a 22 horas.

Fig. 1



Fig. 2

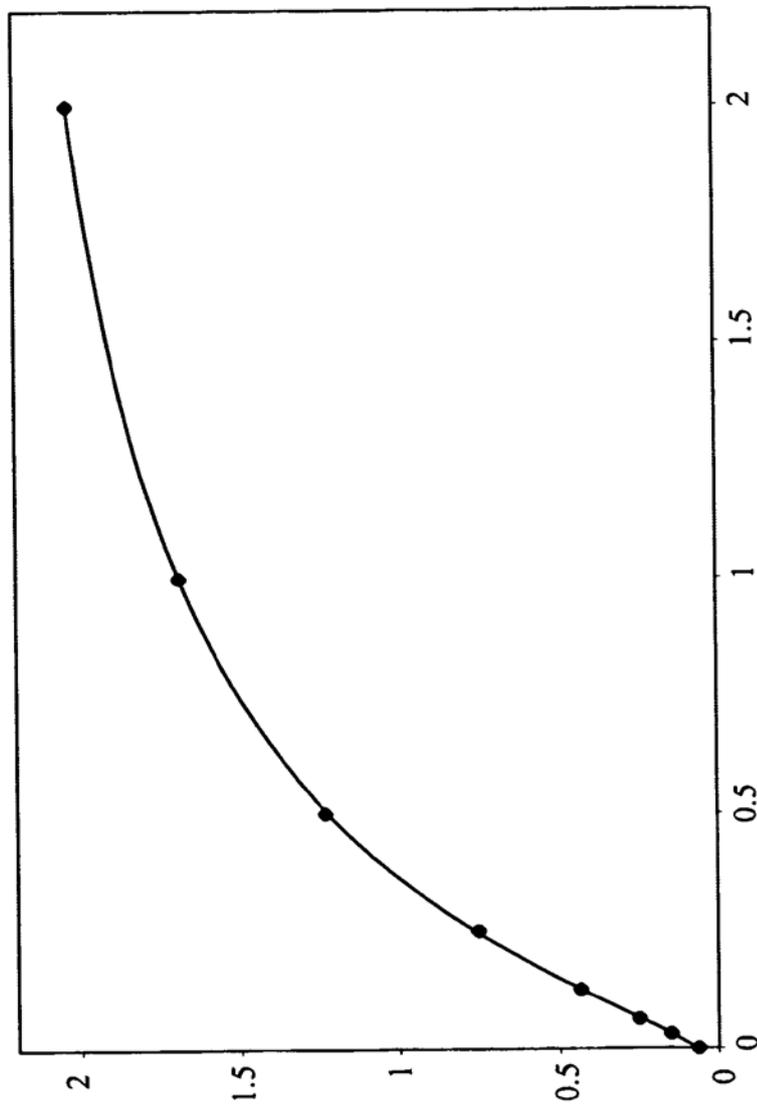


Fig. 3

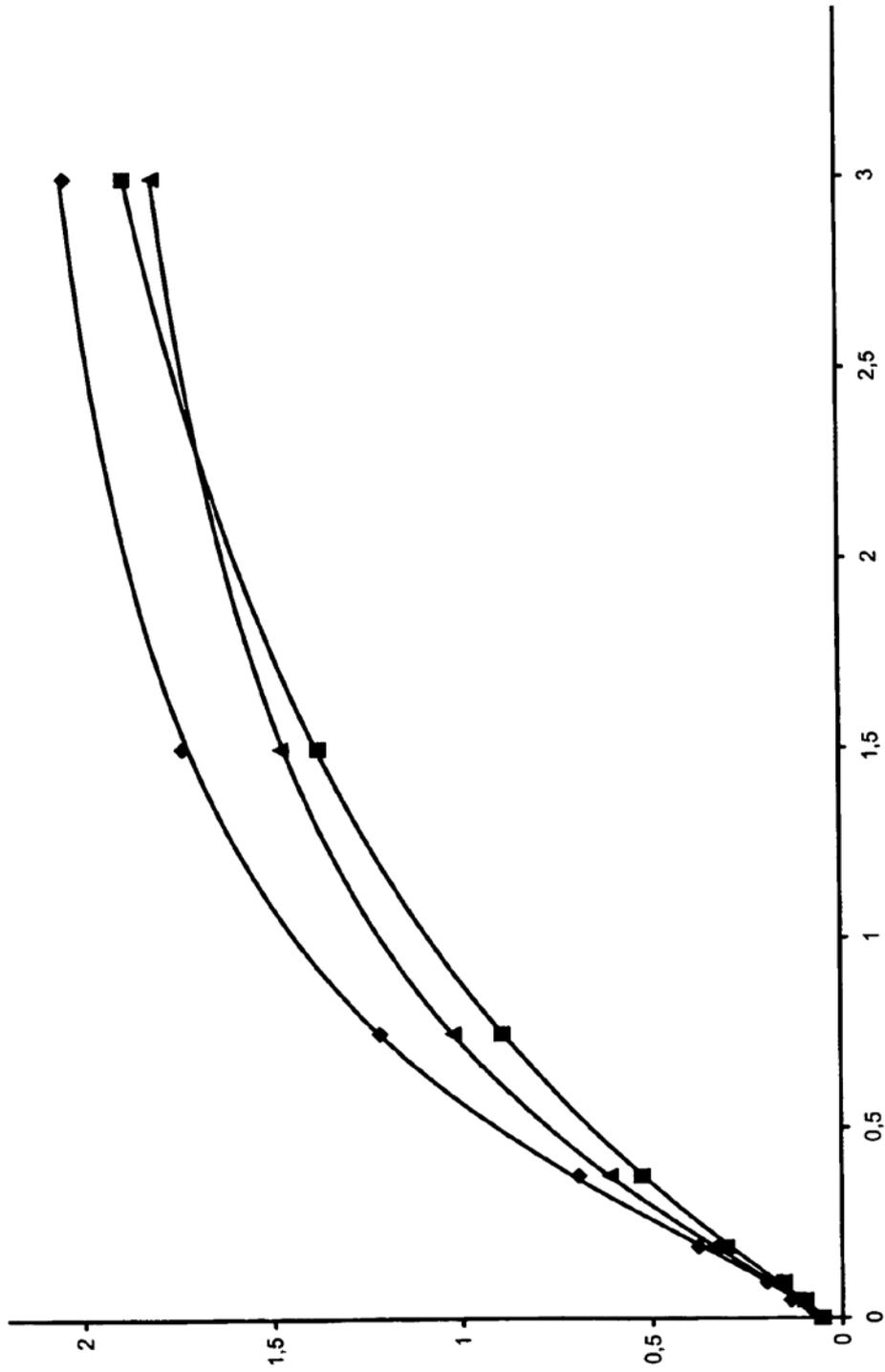


Fig. 4

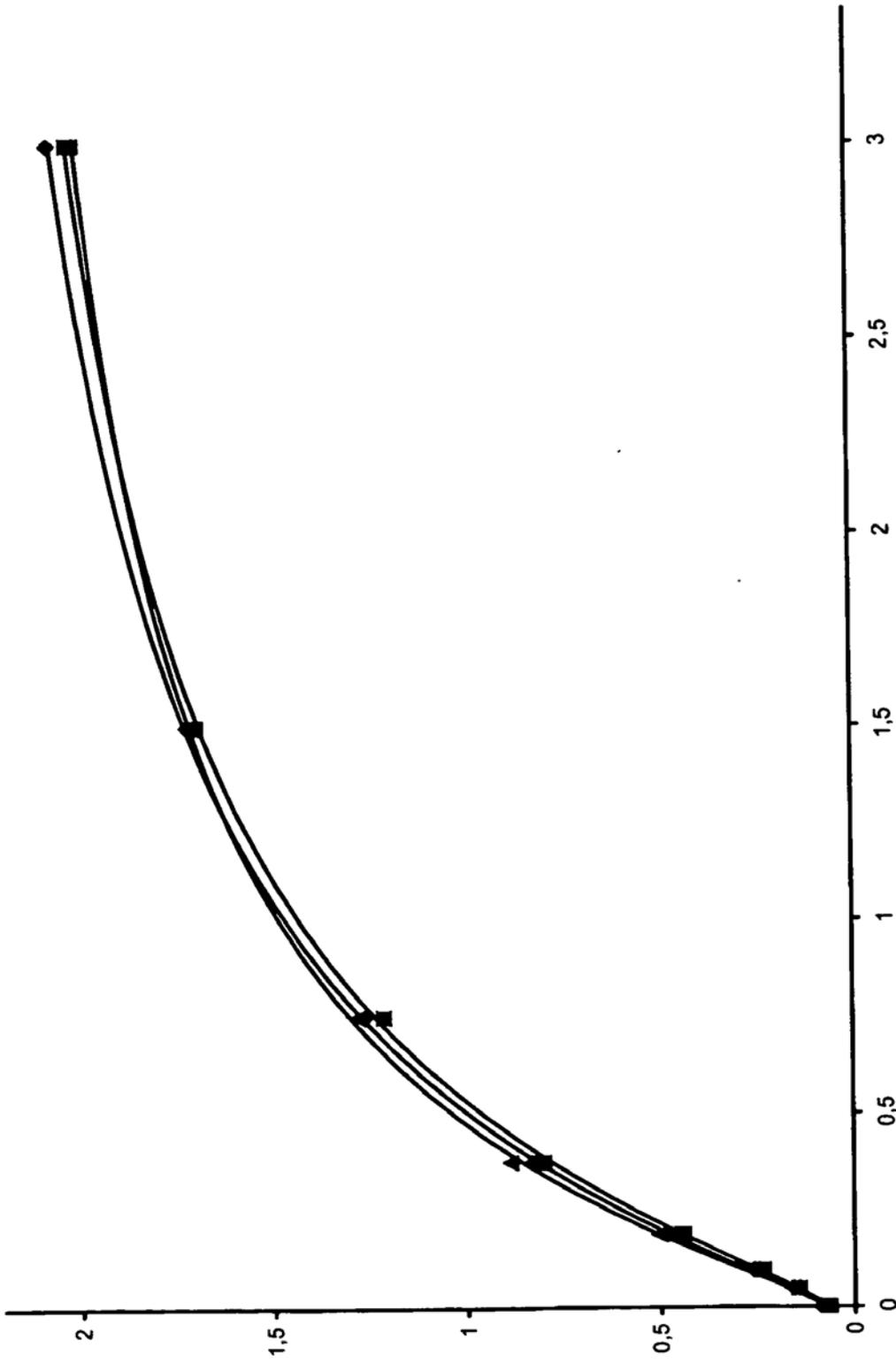


Fig. 5

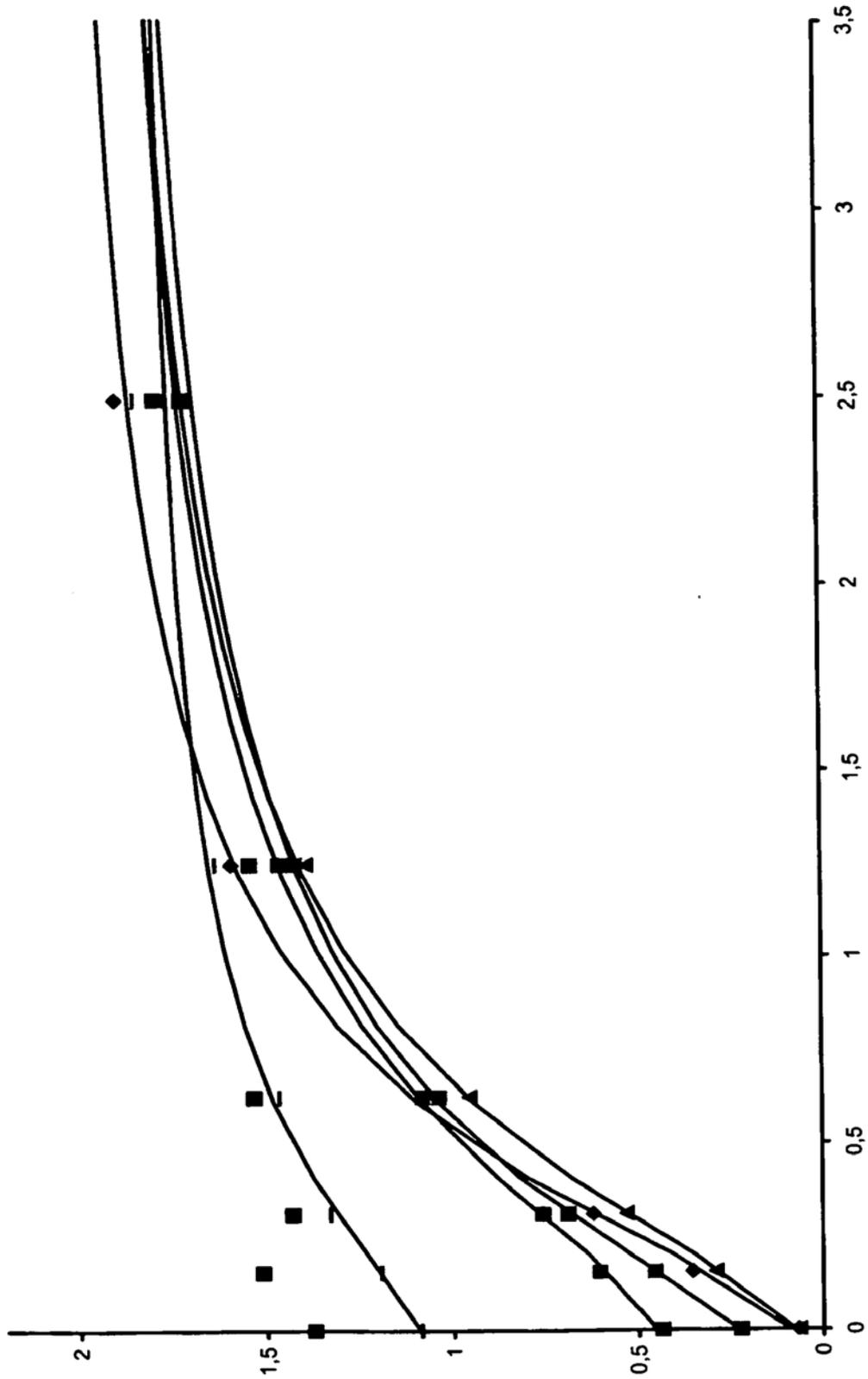
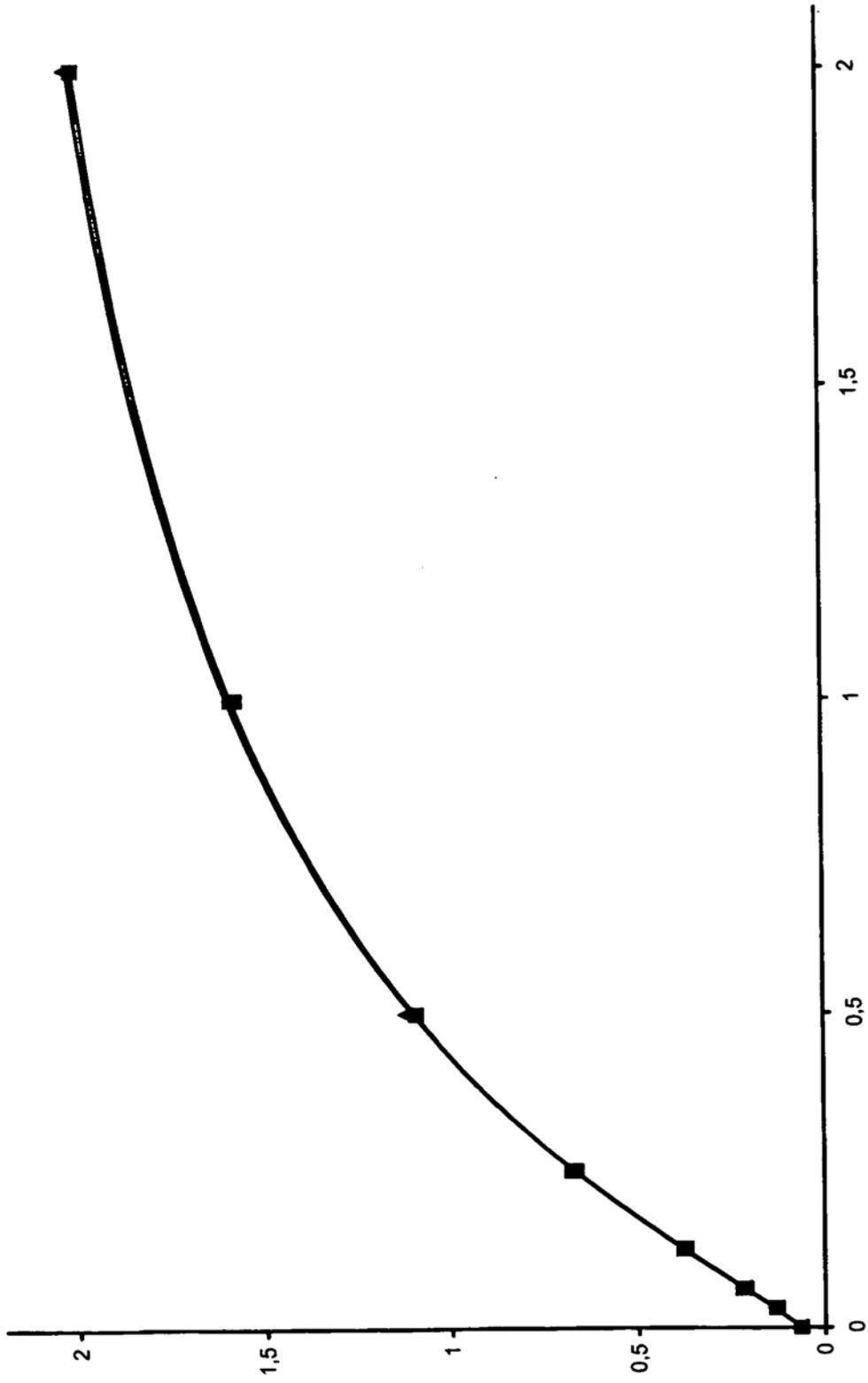


Fig. 7



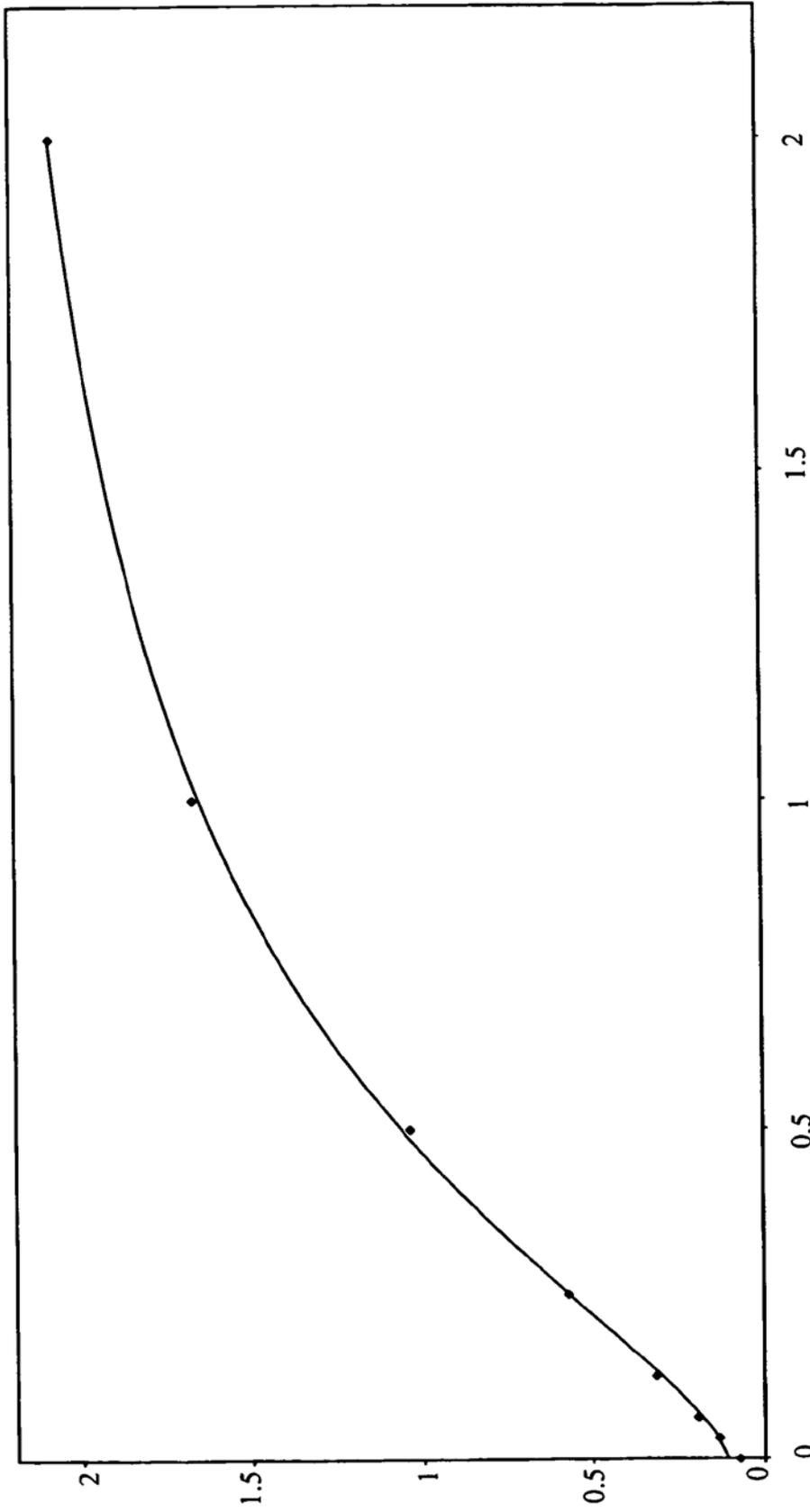


Fig. 8