

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 377**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2007 E 07711809 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1996943**

54 Título: **Ensayo de anticuerpos antifármaco**

30 Prioridad:

09.03.2006 EP 06004806

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

24.09.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HOESEL, WOLFGANG;
STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR y
VOGEL, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 498 377 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 anticuerpos antifármaco

- 5 La invención comprende un método para la determinación de anticuerpos antifármaco y kits para el uso de dichos ensayos.

Antecedentes de la invención

- 10 Los inmunoensayos convencionales en fase sólida con anticuerpos monoclonales implican la formación de un complejo entre un anticuerpo adsorbido/inmovilizado sobre una fase sólida (anticuerpo de captura), el antígeno, y un anticuerpo a otro epítipo del antígeno conjugado con una enzima (anticuerpo indicador). Por lo tanto, se forma un sándwich: fase sólida-anticuerpo de captura-antígeno-anticuerpo indicador. En la reacción catalizada por el sándwich, la actividad de la enzima conjugada con anticuerpos es proporcional a la concentración de antígenos en el medio de incubación. El método de sándwich convencional también se denomina inmunoensayo de doble unión a antígenos debido a que anticuerpos de captura e indicadores se unen a diferentes epítopos del antígeno. Hoesel, W., *et al.*, en *J. Immunol. Methods* 294 (2004) 101-110, informan de un ensayo de doble unión a antígenos anti-EPO mediante el cual se usó una mezcla de rhEPO inmovilizada acoplada a grupos amino y a grupos hidrato de carbono. Los inmunoensayos tales como ELISA de doble unión a antígenos son tipos de ensayos comunes en la investigación de una respuesta inmunogénica de un paciente a un fármaco de anticuerpo. Mire-Sluis, A.R., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 289 (2004) 1-16, resumen las recomendaciones para el diseño y la optimización de inmunoensayos que usan la detección de anticuerpos huésped frente a productos de biotecnología. De acuerdo con Mire-Sluis *et al.*, los formatos de ensayo de anticuerpos antifármaco bien conocidos muestran desventajas considerables. Se mencionan ensayos de anticuerpos antifármaco, por ejemplo, en el documento WO 2005/045058 y en el documento WO 90/006515. Se mencionan ensayos de anticuerpos anti-idiotípicos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos Nº 5.219.730; documento WO 87/002778; documento EP 0 139 389; y documento EP 0 170 302. Wadhwa, M., *et al.*, en *J. Immunol. Methods* 278 (2003) 1-17, informan de estrategias para la detección, medida y caracterización de anticuerpos no deseados inducidos por agentes biológicos terapéuticos.
- 20 Bourdage, J.S. *et al.* en *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 685-690 informaron de un efecto de formato de inmunoensayo de doble unión a antígenos sobre la dependencia de la concentración del revestimiento del antígeno e implicaciones para el diseño de ensayos de inmunogenicidad para anticuerpos monoclonales. Un inmunoensayo cinético de enzimas para la cuantificación de anticuerpos a un anticuerpo monoclonal humanizado en suero humano se informa en Thurmond, L., M. *et al.* (*J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998) 1317-1328). Baert, F. *et al.* *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 601-608 informan sobre la influencia de la inmunogenicidad en la eficacia a largo plazo del infliximab en la Enfermedad de Crohn.
- 25 30 35

Sumario de la Invención

- 40 La invención proporciona métodos y medios para la determinación inmunológica de un anticuerpo frente a un anticuerpo de fármaco en una muestra usando un inmunoensayo doble de unión a antígenos.

La invención proporciona un método para la determinación inmunológica de un anticuerpo frente a un anticuerpo de fármaco en una muestra usando un inmunoensayo de doble unión a antígenos que comprende un anticuerpo de fármaco de captura y un anticuerpo de fármaco indicador, caracterizado por que el anticuerpo de fármaco de captura es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo al que se conjugan con la fase sólida, y el anticuerpo de fármaco indicador es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo al que se conjugan con la marca detectable.

- 50 Preferentemente, la conjugación del anticuerpo de fármaco con su compañero de conjugación se realiza mediante unión por vía química a través de grupos N-terminales y/o ϵ -amino (lisina), grupos ϵ -amino de lisinas diferentes, grupos con funcionalidad carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólica de la cadena principal del aminoácido del anticuerpo de fármaco y/o grupos de alcohol de azúcar de la estructura del hidrato de carbono del anticuerpo de fármaco.
- 55

Preferentemente, la mezcla de anticuerpo de fármaco de captura comprende el anticuerpo de fármaco conjugado a través de un grupo amino y a través de una estructura de hidrato de carbono a su compañero de conjugación.

- 60 Preferentemente, la mezcla de anticuerpo de fármaco de captura y/o la mezcla de anticuerpo de fármaco indicador comprende el anticuerpo de fármaco, conjugado a través de al menos dos grupos amino diferentes, con su compañero de conjugación. Dicho acoplamiento a través de grupos amino diferentes se puede realizar por acilación de una parte de los grupos ϵ -amino con agentes de protección química, por ejemplo por citraconilación, en una primera etapa. En una segunda etapa, la conjugación se realiza a través de los grupos amino restantes. Posteriormente, se retira la citraconilación y el anticuerpo de fármaco se conjuga con el compañero de conjugación a través de grupos amino libre restantes, es decir, el anticuerpo de fármaco obtenido se conjuga con el compañero de
- 65

conjugación a través de grupos amino que no se han protegido por citraconilación.

Los agentes de protección química adecuados forman enlaces en aminas de cadena lateral sin proteger y son menos estables y diferentes a esos enlaces en el extremo N. Se conocen muchos de dichos agentes de protección química (véase, por ejemplo Solicitud de Patente Europea EP 0 651 761). Los agentes de protección química preferentes incluyen anhídridos cíclicos de ácido dicarboxílico tales como anhídridos del ácido maleico o citraconílico.

Preferentemente, el anticuerpo de fármaco de captura se conjuga con la fase sólida mediante adsorción pasiva y por lo tanto se conjuga con la fase sólida en al menos dos sitios diferentes del anticuerpo. La adsorción pasiva se describe, por ejemplo, en Butler, J. E., en "Solid Phases in Immunoassay" 205-225; Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (Editors): Immunoassays (1996) Academic Press San Diego.

Preferentemente, la mezcla de anticuerpo de fármaco indicador comprende el anticuerpo de fármaco conjugado a través de un grupo amino y a través de una estructura de hidrato de carbono a su compañero de conjugación.

Preferentemente, la relación de anticuerpo de fármaco de captura a anticuerpo de fármaco indicador es de 1:10 a 50:1 (relación se refiere a relación de moléculas de anticuerpo independientemente del peso molecular de los conjugados que puede ser diferente).

Preferentemente, la relación de anticuerpo de fármaco conjugado con amino (anticuerpo de fármaco indicador o de captura) a anticuerpo de fármaco conjugado con hidrato de carbono (anticuerpo de fármaco indicador o de captura) en una mezcla de modo que sea de 1:10 a 10:1 (relación se refiere a relación de moléculas de anticuerpo independientemente del peso molecular de los conjugados que puede ser diferente).

En una realización preferente de la invención, el anticuerpo de fármaco de captura se conjuga (inmoviliza) a través de un par de unión específico. Dicho par de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., *et al.*, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), lectina/polisacárido, proteína de unión esteroide/esteroide, receptor de hormona/hormona, enzima/sustrato, IgG/Proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el anticuerpo de fármaco de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se realiza a través de avidina o estreptavidina inmovilizada.

En una realización preferente de la invención, el anticuerpo de fármaco indicador se conjuga con una marca detectable, preferentemente se conjuga a través de un par de unión específico. Dicho par de unión (primer componente/segundo componente) es, por ejemplo, estreptavidina o avidina/biotina, anticuerpo/antígeno (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., *et al.*, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996), lectina/polisacárido, proteína de unión esteroide/esteroide, receptor de hormona/hormona, enzima/sustrato, IgG/Proteína A y/o G, etc. Preferentemente, el anticuerpo de fármaco indicador se conjuga a través de digoxigenina y un anticuerpo frente a digoxigenina con la marca detectable. Como alternativa, el anticuerpo de fármaco indicador se conjuga con una marca electroquimioluminiscente, tal como un complejo de rutenio y bispiridilo.

Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo de fármaco" de acuerdo con la invención representa un anticuerpo que se puede administrar a un individuo, de modo que se sospecha que una muestra de dicho individuo comprende dicho anticuerpo de fármaco después de la administración. Dentro de un ensayo realizado de acuerdo con la invención, el anticuerpo de fármaco, el anticuerpo de fármaco de captura y el anticuerpo de fármaco indicador comprenden la "misma" molécula de anticuerpo, por ejemplo producida de forma recombinante con el mismo vector de expresión y que comprende la misma secuencia de aminoácidos. Se están usando anticuerpos de fármaco (anticuerpos monoclonales terapéuticos) ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades tales como enfermedades oncológicas (por ejemplo, neoplasias hematológicas y sólidas que incluyen linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, y cáncer colorrectal). Dichos anticuerpos se describen, por ejemplo, en Levene, A.P., *et al.*, Journal of the Royal Society of Medicine 98 (2005) 146-152. Dichos anticuerpos son, por ejemplo, anticuerpos frente a CD20, CD22, HLA-DR, CD33, CD52, EGFR, G250, GD3, HER2, PSMA, CD56, VEGF, VEGF2, CEA, antígeno de Levis Y, receptor IL-6 o receptor de IGF-1. Además, se describen anticuerpos terapéuticos en Groner, B., *et al.*, Curr. Mol. Med. 4 (2004) 539-547; y en Harris, M. Lancet Oncol. 5 (2004) 292-302.

Un anticuerpo a modo de ejemplo (preferentemente monoclonal) es un anticuerpo frente al receptor de IL-6 (mAB IL-6R). Dicho anticuerpo se describe, por ejemplo, en Mihara *et al.*, Clin. Immunol. 98 (2001) 319-326; Nishimoto, N., *et al.*, Blood 106 (2005) 2627-2632, en Illei, G.G. *et al.* 62(2) (2010) 542-552 (ensayo clínico NCT00046774), o en el documento WO 2004/096274.

Un anticuerpo a modo de ejemplo (preferentemente monoclonal) es un anticuerpo frente al receptor de IGF-1 (mAB IGF-1R). Dicho anticuerpo se describe, por ejemplo, en el documento WO 2004/087756, o en el documento WO 2005/005635.

Los anticuerpos antifármaco son anticuerpos que se dirigen frente a cualquier región del anticuerpo de fármaco, tal como la región variable, la región constante o la glicestructura del anticuerpo de fármaco. Dichos anticuerpos antifármaco se pueden producir durante la terapia con anticuerpos como una reacción inmunogénica de un paciente (véase, Pan, Y., *et al.*, FASEB J. 9 (1995) 43-49).

5 Los anticuerpos monoclonales contienen como proteínas un número de cadenas laterales reactivas. Dichos grupos de anticuerpos químicos reactivos son, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteína, y metionina), grupos ácido carboxílico (ácido aspártico, ácido glutámico), y grupos azúcar-alcohólico.

10 En el estado de la técnica se describen ampliamente soportes sólidos para los inmunoensayos de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, Butler, J.E., *Methods* 22 (2000) 4-23).

Los principios de diferentes inmunoensayos se describen, por ejemplo, en Hage, D.S., en *Anal. Chem.* 71 (1999) 294R-304R. Lu, B., *et al.*, *Analyst* 121 (1996) 29R-32R, informan de la inmovilización orientada de anticuerpos para el uso en inmunoensayos. Inmunoensayos mediados por avidina-biotina se informan, por ejemplo, en Wilchek, M., y Bayer, E.A., *Methods Enzymol.* 184 (1990) 467-469.

20 Los anticuerpos monoclonales y sus dominios constantes contienen como proteínas un número de cadenas laterales reactivas para acoplamiento a un compañero de unión tal como una superficie, una proteína, un polímero, tal como PEG, Celulosa o Poliestirol, una enzima, o un miembro de un par de unión. Los grupos de anticuerpos reactivos químicos son, por ejemplo, grupos amino (lisinas, grupos alfa-amino), grupos tiol (cistinas, cisteínas, y metioninas), grupos ácido carboxílico (ácidos aspárticos, ácidos glutámicos), y grupos azúcar-alcohólico. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Aslam M., y Dent A., *Bioconjugation*, MacMillan Ref. Ltd. 1998, páginas 50-100.

25 Uno de los grupos reactivos más comunes de proteínas es la ϵ -amina alifática del aminoácido lisina. En general, casi todos los anticuerpos contienen lisina en gran cantidad. Las aminas lisina son nucleófilos razonablemente buenos a pH superior a 8,0 ($pK_a = 9,18$) y por lo tanto reaccionan fácil y limpiamente con una diversidad de reactivos para formar enlaces estables.

30 Otro grupo reactivo común en anticuerpos es el resto tiol del aminoácido cistina que contiene azufre y su producto de reducción, cisteína (o semi cistina). La cistina contiene un grupo tiol libre, que es más nucleófilo que las aminas y por lo general es el grupo funcional más reactivo en una proteína. Por lo general, los tioles son reactivos a pH neutro, y por lo tanto se pueden acoplar a otras moléculas selectivamente en presencia de aminas.

35 Dado que los grupos sulfhidrilo libre son relativamente reactivos, las proteínas con estos grupos existen a menudo con ellos en su forma oxidada como grupos disulfuro o enlaces disulfuro. La inmunoglobulina M es un ejemplo de un pentámero unido a disulfuro, aunque las subunidades de la Inmunoglobulina G se unen mediante puentes disulfuro internos. En dichas proteínas, se requiere la reducción de los enlaces disulfuro con un reactivo tal como ditioneitol (DTT) para generar el tiol libre reactivo. Sin embargo, este método también divide la unión de la cadena en estos anticuerpos y la reunión de las cadenas para permitir un plegado apropiado puede no ser posible. Además de cistina y cisteína, algunas proteínas también presentan el aminoácido metionina que contiene azufre en una unión tioéter. La modificación selectiva de la metionina por lo general es difícil de conseguir y apenas se usa como método de unión de fármacos y otras moléculas a anticuerpos. La bibliografía informa del uso de varios reactivos de reticulación de tiolación tales como el reactivo de Traut (2-iminotiolano), acetato de succinimidilo (acetiltio) (SATA), y 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SPDP) para proporcionar rutas eficaces para introducir grupos sulfhidrilo múltiples a través de grupos amino reactivos.

50 La química de la bioconjugación es la unión de biomoléculas a otras biomoléculas, moléculas pequeñas, y polímeros por medios químicos o biológicos. Esto incluye la conjugación de anticuerpos y sus fragmentos, ácidos nucleicos y sus análogos, y componentes liposomales (u otras moléculas biológicamente activas) entre sí o con cualquier grupo molecular que añade propiedades útiles. Estos grupos moleculares incluyen radionúclidos, fármacos, toxinas, enzimas, quelatos de metal, fluoróforos, haptenos y otros.

55 Otro grupo reactivo común en anticuerpos son los ácidos carboxílicos (ácido aspártico, ácido glutámico). Las proteínas contienen grupos ácido carboxílico en la posición C-terminal dentro de las cadenas laterales de ácido aspártico y de ácido glutámico. La reactividad relativamente baja de los ácidos carboxílicos en agua hace normalmente difícil el uso de estos grupos para modificar selectivamente proteínas y otras biomoléculas. Cuando se realiza esto, el grupo ácido carboxílico normalmente se convierte en un éster reactivo mediante el uso de una carbodiimida soluble en agua y se hace reaccionar con un reactivo nucleófilo tal como una amina, hidrazida, o hidrazina. El reactivo que contiene amina debería ser débilmente básico con el fin de reaccionar selectivamente con el ácido carboxílico activado en presencia de otras aminas sobre la proteína. la reticulación de la proteína se puede producir cuando el pH se eleva por encima de 8,0.

65 Se puede usar peryodato sódico para oxidar la parte del alcohol de un azúcar dentro de un resto de hidrato de carbono a un aldehído. Cada grupo aldehído se puede hacer reaccionar con una amina, hidrazida, o hidrazina tal como se ha descrito para los ácidos carboxílicos. Dado que el resto de hidrato de carbono se encuentra

predominantemente en la región del fragmento cristalizante (Fc) de un anticuerpo, la conjugación se puede conseguir a través de una modificación dirigida al sitio del hidrato de carbono más alejado del sitio de unión al antígeno.

5 Los reactivos amino-reactivos reaccionan principalmente con lisinas y con los grupos α -amino de las proteínas. Los ésteres reactivos, particularmente ésteres de N-hidroxi-succinimida (NHS), están entre los reactivos más usados normalmente para la modificación de grupos amina. El pH óptimo para la reacción en un entorno acuoso es pH de 8,0 a 9,0. Los isotiocianatos son reactivos de modificación de amina y forman enlaces tiourea con las proteínas. Estos reaccionan con las aminas proteicas en solución acuosa (de forma óptima a pH de 9,0 a 9,5). Los aldehídos reaccionan en condiciones acuosas suaves con aminas alifáticas y aromáticas, hidrazinas, e hidrazidas para formar una imina intermedia (base de Schiff). Una base de Schiff se puede reducir de forma selectiva con agentes de reducción suaves o fuertes (tales como borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico) para derivar un enlace de alquil amina estable.

15 Otros reactivos que se han usado para modificar aminas son los anhídridos de ácido. Por ejemplo, el anhídrido dietilentriaminapentaacético (DTPA) es un agente de quelación bifuncional que contiene dos grupos anhídrido reactivos a amina. Puede reaccionar con grupos N-terminales y ϵ -amina de las proteínas para formar uniones amida. El anillo del anhídrido se abre para crear ramas polivalentes, de que la acción de metales capaces de unir fuertemente a los metales en un complejo de coordinación.

20 Los reactivos tiol-reactivos son aquellos que se acoplarán con grupos tiol sobre las proteínas, formando productos acoplados con tioéter. Estos reactivos reaccionan rápidamente a pH de ligeramente ácido a neutro y por lo tanto se pueden hacer reaccionar de forma selectiva en presencia de grupos amina.

25 Los derivados de haloacetilo, por ejemplo yodoacetamidas, forman enlaces tioéter y son reactivos para la modificación del tiol. En anticuerpos, la reacción se produce en los grupos cisteína que están intrínsecamente presentes o que resultan de la reducción de disulfuros de cistina en diversas posiciones del anticuerpo.

30 Reactivos útiles adicionales son las maleimidias. La reacción de las maleimidias con reactivos tiol-reactivos es básicamente la misma que para las yodoacetamidas. Las maleimidias reaccionan rápidamente a pH de ligeramente ácido a neutro.

35 Aminas, hidrazidas, e hidrazinas son reactivos aldehído y ácido carboxílico-reactivos (formación de enlaces amida, hidrazona, o alquil amina). Aminas, hidrazidas, e hidrazinas se pueden acoplar a los ácidos carboxílicos de las proteínas después de la activación del grupo carboxilo mediante una carbodiimida soluble en agua. El reactivo que contiene amina debe ser débilmente básico con el fin de que reaccione de forma selectiva con la proteína activada por carbodiimida en presencia de las ϵ -aminas más altamente básicas de la lisina para formar un enlace amida estable.

40 Aminas, hidrazidas, e hidrazinas también pueden reaccionar con grupos aldehído, que se pueden generar sobre anticuerpos por oxidación con peryodato de los restos de hidratos de carbono sobre el anticuerpo. En este supuesto, se forma un compuesto intermedio de base de Schiff, que se puede reducir a una alquil amina a través de la reducción del compuesto intermedio con agentes de reducción solubles en agua de cianoborohidruro sódico (suave y selectiva) o borohidruro sódico (fuerte).

45 El término "muestra" incluye, pero no se limita a, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o de un ente anteriormente vivo. Dichos entes vivos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, monos, ratas, conejos, y otros animales. Dichas sustancias incluyen, pero no se limitan a, sangre entera, suero, o plasma de un individuo, que son las fuentes más ampliamente usadas de muestra en la rutina clínica.

50 La expresión "fase sólida" se refiere a una sustancia no fluida, e incluye partículas (incluyendo micropartículas y perlas) preparadas a partir de materiales tales como polímero, metal (partículas paramagnéticas, ferromagnéticas), vidrio, y cerámica; sustancias de gel tales como geles de sílice, alúmina, y polímero; capilares, que se pueden preparar con polímero, metal, vidrio, y/o cerámica; zeolitas y otras sustancias porosas; electrodos; placas de microtitulación; tiras sólidas; y cubetas, tubos u otros envases para muestras de espectrómetro. Un componente de un ensayo en fase sólida se distingue de las superficies sólidas inertes con las que el ensayo se puede poner en contacto en que una "fase sólida" contiene al menos un resto sobre su superficie, que se pretende que interactúen con el anticuerpo de fármaco de captura. Una fase sólida puede ser un componente estacionario, tal como un tubo, tira, cubeta o placa de microtitulación, o pueden ser componentes no estacionarios, tales como perlas y micropartículas. Además, las micropartículas se pueden usar en forma de una fase sólida para formatos de ensayo homogéneo. Se puede usar una diversidad de micropartículas que permitan la unión no covalente o covalente de proteínas y de otras sustancias. Dichas partículas incluyen partículas de polímero tales como poliestireno y poli(metilmetacrilato); partículas de oro tales como nanopartículas de oro y coloides de oro; y partículas de cerámica tales como partículas de sílice, vidrio, y óxido metálico. Véase, por ejemplo Martin, C.R., *et al.*, Analytical Chemistry-News & Features, 1 de mayo de 1998, 322A-327A, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Cromógenos (grupos fluorescentes o luminescentes y colorantes), enzimas, grupos activos por RMN o partículas de metal, haptenos, por ejemplo digoxigenina, son ejemplos de marcas detectables. Además, la marca detectable puede ser un grupo de reticulación fotoactivable, por ejemplo un grupo azido o un grupo azirina. Además, los quelatos metálicos que se pueden detectar por electroquimioluminiscencia son grupos de emisión de señales preferentes, dándose preferencia en particular a los quelatos de rutenio, por ejemplo un relato de rutenio (bispiridilo)₃²⁺. Grupos de marcado con rutenio adecuados se describen, por ejemplo, en el documento EP 0 580 979, el documento WO 90/05301, el documento WO 90/11511, y el documento WO 92/14138.

La invención proporciona un método para la determinación inmunológica de un anticuerpo frente a un anticuerpo de fármaco en una muestra usando un inmunoensayo de doble unión a antígenos que comprende un anticuerpo de fármaco de captura y un anticuerpo de fármaco indicador, en el que el anticuerpo de fármaco de captura es una mezcla del anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de los anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo en el que se conjugan con la fase sólida, y el anticuerpo de fármaco indicador es una mezcla del anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de los anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo en el que se conjugan con la marca detectable.

El anticuerpo de fármaco de captura útil en un método de acuerdo con la invención se conjuga con una fase sólida. La conjugación se realiza preferentemente mediante unión química a través de grupos N-terminales y/o ε-amino (lisina), grupos ε-amino de diferentes lisinas, grupos con funcionalidad carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólica de la cadena principal del aminoácido del anticuerpo de fármaco y/o grupos de alcohol de azúcar de la estructura de hidrato de carbono del anticuerpo de fármaco. El anticuerpo de fármaco de captura útil en un método de acuerdo con la invención es una mezcla de al menos dos anticuerpos de fármaco conjugados con una fase sólida, en el que al menos dos anticuerpos de fármaco conjugados con una fase sólida difieren en el sitio en el que se conjugan con la fase sólida. Por ejemplo, la mezcla de al menos dos anticuerpos de fármaco conjugados con una fase sólida puede comprender un anticuerpo de fármaco conjugado a través de un aminoácido de la cadena principal del aminoácido a la fase sólida y un anticuerpo de fármaco conjugado a través de un grupo de alcohol de azúcar de una estructura de hidrato de carbono del anticuerpo de fármaco con la fase sólida. Además, por ejemplo, la mezcla de al menos dos anticuerpos de fármaco conjugados con una fase sólida puede comprender anticuerpos de fármaco conjugados con la fase sólida a través de diferentes restos de aminoácidos de su cadena principal de aminoácido. La expresión "resto de aminoácido diferente" representa dos tipos diferentes de aminoácidos, tales como por ejemplo lisina y ácido aspártico, o tirosina y ácido glutámico, o dos restos de aminoácidos con números diferentes de la cadena principal del aminoácido del anticuerpo de fármaco. En el último caso, el aminoácido puede ser del mismo tipo o de diferente tipo. Las expresiones "diferir en el sitio del anticuerpo" y "sitio" indican una diferencia en el tipo del sitio, por ejemplo grupo aminoácido hubo alcohol de azúcar, o en el número de los aminoácidos de la cadena principal del aminoácido en la que la anticuerpo de fármaco se conjuga con la fase sólida. Lo mismo se aplica viceversa al anticuerpo de fármaco indicador útil en un método de acuerdo con la invención.

Los siguientes ejemplos y figura se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Ensayo de unión para la detección de anticuerpos antifármaco:

El anticuerpo de fármaco biotinilado (Captura-BI) se une a una placa de microtitulación revestida con estreptavidina (SA-MTP). El anticuerpo antifármaco se une al anticuerpo de fármaco de captura (Captura-BI; BI = biotinilado) con anticuerpo de fármaco indicador marcado con digoxigenina (Indicador-DIG; DIG = digoxinilado). El complejo inmovilizado se detecta mediante conjugados de peroxidasa de rábano picante anti-digoxigenina policlonal (pAB<DIG>-POD). El anticuerpo antifármaco de conejo policlonal (rpAB) se usa como patrón.

Figura 2 Curva estándar de la variante 1 de ELISA de unión usando conjugados de los ejemplos 1 y 4:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T (solución salina tamponada con fosfato, Tween[®] 20 al 0,05 % en volumen) con suero humano al 5 %.

Figura 3 Curva estándar de la variante 2 de ELISA de unión usando conjugados de los ejemplos 2 y 5:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T con suero humano al 5 %.

Figura 4 Curva estándar de la variante 3 de ELISA de unión usando conjugados de los ejemplos 3 y 6:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T con suero humano al 5 %.

Figura 5 Curva estándar de la variante 4 de ELISA de unión usando conjugados de los ejemplos 1, 3 y 4, 6:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T con suero humano al 5 %.

5

Figura 6 Curva estándar de la variante 5 de ELISA de unión usando conjugados de los ejemplos 1, 2, 3 y 4, 5, 6:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T con suero humano al 5 %.

10

Figura 7 Curva estándar de la variante 1 de ELISA de unión usando adsorción pasiva para inmovilización en sólido:

Se proporcionan las densidades ópticas (DO) para las diversas concentraciones de rpAB como diluidas en tampón de PBS-T con suero humano al 5 %.

15

Ejemplos

Ejemplo 1

20 Biotinilación de anticuerpo mAB IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico

Anticuerpo frente al receptor de IL-6 (mAB IL-6R) se dializó frente tampón (tampón de fosfato potásico 100 mM (en lo sucesivo denominado K-PO₄), pH 8,5). A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 10 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. Después de 60 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo de marcado se retiró por diálisis frente a K-PO₄ 25 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

25

Ejemplo 2

30

Biotinilación de mAB IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico después de tratamiento con anhídrido del ácido citracónico

mAB IL-6R se dializó frente a K-PO₄ 100 mM, pH 8,4. A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El anhídrido del ácido citracónico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. Después de 120 minutos, la reacción se detuvo por cromatografía sobre una columna con Sephadex[®] G25 equilibrado con K-PO₄ 100 mM, pH 8,4. La solución de anticuerpos se ajustó hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 4 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido D-biotinoil-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. La reacción se detuvo después de 60 minutos mediante la adición de L-lisina. El exceso del reactivo marcado se retiró por diálisis frente a tampón de acetato sódico 200 mM, pH 5,0. La solución de anticuerpos se transfirió a un K-PO₄ 25 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7,2, por cromatografía sobre una columna con Sephadex[®] G25.

35

40

Ejemplo 3

45

Biotinilación de mAB IL-6R con hidrazida de biotina

mAB IL-6R se dializó frente a tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5. A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 20 mg/ml. Se disolvió peryodato sódico en tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5, y se añadió a la solución de anticuerpos hasta una concentración final de 10 mM. La reacción se detuvo después de 30 minutos por cromatografía sobre una columna de Sephadex[®] G25 equilibrada con tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5. La solución de anticuerpos se ajustó hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 5 mg/ml. La hidrazida de biotina se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:50. La reacción se detuvo después de 120 minutos mediante la adición de borohidruro sódico hasta una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos la solución de anticuerpos se dializó frente a K-PO₄ 25 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7, 2.

50

55

Ejemplo 4

60

Digoxigenilación de mAB IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin 3-O-metilcarbonyl-ε-aminocaproico

mAB IL-6R se dializó frente a tampón de digoxigenilación (K-PO₄ 100 mM, pH 8,5). A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 10 mg/ml. El éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin 3-O-metilcarbonyl-ε-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. Después de 60 minutos la reacción se había detenido mediante la adición de L-lisina. El exceso de reactivo

65

de marcado se retiró por diálisis frente a K-PO₄ 25 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7,5.

Ejemplo 5

- 5 Digoxigenilación de mAB IL-6R con éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico después de tratamiento con anhídrido del ácido citracónico

mAB IL-6R se dializó frente a K-PO₄ 100 mM, pH 8,4. A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 20 mg/ml. El anhídrido del ácido citracónico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. La reacción se había detenido después de 120 minutos por cromatografía sobre una columna con Sephadex® G25 equilibrada con K-PO₄ 100 mM, pH 8,4. La solución de anticuerpos se ajustó hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 4 mg/ml. éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin 3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:5. La reacción se había detenido después de 60 minutos mediante la adición de L-lisina. El exceso del reactivo marcado se retiró por diálisis frente a tampón de acetato sódico 200 mM, pH 5,0. La solución de anticuerpos se transfirió ha un tampón con K-PO₄ 25 mM y NaCl 150 mM, pH 7,2, por cromatografía sobre una columna con Sephadex® G25.

Ejemplo 6

- 20 Digoxigenilación de mAB IL-6R con digoxigenina-X-hidrazida

mAB IL-6R se dializó frente a tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5. A continuación, la solución se ajustó hasta una concentración de proteínas de 20 mg/ml. Se disolvió peryodato sódico en tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5, y se añadió a la solución de anticuerpos hasta una concentración final de 10 mM. La reacción se había detenido después de 30 minutos por cromatografía sobre una columna Sephadex® G25 equilibrada con tampón de acetato sódico 100 mM, pH 5,5. La solución de anticuerpos se ajustó hasta una concentración de proteínas de aproximadamente 5 mg/ml. La digoxigenina-X-hidrazida se disolvió en DMSO y se añadió a la solución de anticuerpos en una relación molar de 1:50. Después de 120 minutos la reacción se había detenido mediante la adición de borohidruro sódico hasta una concentración final de 15 mM. Después de 30 minutos la solución de anticuerpos se dializó frente a K-PO₄ 25 mM complementado con NaCl 150 mM, pH 7,2.

Ejemplo 7

- 35 ELISA de unión para detección de anticuerpos frente al mAB IL-6R

mAB IL-6R biotinilado se había conjugado (unido sobre) a los pocillos de una placa de microtitulación revestida con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El anticuerpo sin conjugar (sin unir) se retiró mediante lavado con tampón universal. A continuación, las muestras y los patrones de referencia (anticuerpo policlonal anti-mAB IL-6R de conejo fijado en suero humano al 5 %) se incubaron en los pocillos. El anticuerpo anti-mAB IL-6R se unió al mAB IL-6R inmovilizado. Después de retirar por lavado las sustancias sin unir, el anticuerpo anti-mAB IL-6R unido se detectó con mAB IL-6R digoxigenilado seguido de incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante (véase la Figura 1). El conjugado de anticuerpo-enzima catalizó la reacción de color del sustrato ABTS®. La señal se midió con un lector de ELISA a 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de la absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

Se realizaron cinco variantes diferentes del ELISA de unión:

- 50 - variante 1 usando conjugados de los ejemplos 1 y 4
 - variante 2 usando conjugados de los ejemplos 2 y 5
 - variante 3 usando conjugados de los ejemplos 3 y 6
 - variante 4 usando conjugados mixtos de los ejemplos 1 y 3 y conjugados mixtos de los ejemplos 4 y 6
 - variante 5 usando conjugados mixtos de los ejemplos 1-3 y conjugados mixtos de los ejemplos 4-6.

- 55 Las señales y las curvas patrón de referencia obtenidas en las diferentes variantes de ELISA se muestran en la Tabla 1 y en las Figuras 2-6.

Tabla 1: Señales patrón de referencia en las diferentes variantes de ELISA.

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3	Variante de la señal 4	Variante de la señal 5
0,00	0,031	0,033	0,048	0,039	0,039
0,78	0,064	0,066	0,077	0,072	0,068
1,56	0,097	0,102	0,106	0,102	0,097

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3	Variante de la señal 4	Variante de la señal 5
3,13	0,162	0,168	0,166	0,164	0,160
6,25	0,288	0,295	0,287	0,287	0,279
12,50	0,545	0,567	0,538	0,544	0,529
25,00	1,055	1,069	1,048	1,065	1,035
50,00	2,092	2,087	2,140	2,085	2,030

El análisis de nuestras con las diferentes curvas patrón se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Análisis de Muestra de Suero.

Id. de la muestra	equivalentes de concentración de pAB anti-mAB IL-6R [ng/ml]				
	variante 1	variante 2	variante 3	variante 4	variante 5
F262760-16	54,46	53,78	88,02	76,26	68,50
F825050-26	10,21	11,51	4,57	7,88	9,71
F963840-22	21,92	23,04	23,53	23,63	24,82
E597480-16	76,02	76,29	55,18	N/D	N/D

- 5 Tal como muestra la Tabla 1, todos los conjugados se pueden usar para la detección de anticuerpos anti-mAB IL-6R. Usando el mismo anticuerpo policlonal anti-mAB IL-6R de conejo, las curvas patrón de referencia para todas las variantes del ensayo son muy similares (Figuras 2-6).

Ejemplo 8

- 10 ELISA de unión para detección de anticuerpos anti-mAB IGF-1R usando interacción de estreptavidina/biotina para inmovilización en fase sólida

- 15 Anticuerpo biotinilado frente a IGF-1R (mAB IGF-1R, anticuerpo de fármaco) se conjugó (se unió sobre) con los pocillos de una placa de microtitulación revestida con estreptavidina (SA-MTP) en la primera etapa. El anticuerpo sin conjugar (sin unir) se retiró mediante lavado con tampón universal. A continuación, las muestras y los patrones de referencia (anticuerpo policlonal anti-mAB IGF-1R de conejo fijado en suero humano al 5 %) se incubaron en los pocillos. El anticuerpo anti-mAB IGF-1R se unió al mAB IGF-1R inmovilizado. Después de retirar por lavado las sustancias sin unir, el anticuerpo anti-mAB IGF-1R unido se detectó con mAB IGF-1R digoxigenilado seguido de
- 20 incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado de anticuerpo-enzima catalizó la reacción de color del sustrato ABTS®. La señal se midió con un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Los valores de la absorbancia de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

- 25 Se realizaron tres variantes diferentes del ELISA de unión:

- variante 1 usando conjugados de acuerdo con los ejemplos 1 y 4
 - variante 2 usando conjugados de acuerdo con los ejemplos 2 y 5
 - variante 3 usando conjugados mixtos preparados de acuerdo con los ejemplos 1 y 2 y conjugados mixtos preparados de acuerdo con los ejemplos 4 y 5.
- 30

Todas las variantes reactivas de mAB IGF-1R biotinilado y digoxigenilado se sintetizaron tal como se ha descrito anteriormente para mAB IL-6R (ejemplos 1, 2, 4 y 5).

- 35 Las señales patrón de referencia obtenidas en las diferentes variantes de ELISA se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Señales patrón de referencia en las diferentes variantes de ELISA.

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3
0,00	0,126	0,056	0,110
0,31	0,161	0,092	0,147

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3
0,63	0,205	0,131	0,191
1,25	0,286	0,203	0,267
2,50	0,440	0,348	0,425
5,00	0,772	0,660	0,744
10,00	1,349	1,223	1,321
20,00	2,113	2,060	2,133

El análisis de muestras con las diferentes curvas patrón se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Análisis de muestras de suero.

Id. de la muestra	equivalentes de concentración de pAB anti-mAB IGF-1R [ng/ml]		
	variante 1	variante 2	variante 3
840 h_femenino	2,04	10,64	7,27
1008 h_femenino	11,38	24,05	14,05
504 h_masculino	51,17	67,76	60,49

5

La Tabla 3 muestra que todos los conjugados se pueden usar para la detección de anticuerpos anti-mAB IGF-1R. Usando el mismo anticuerpo anti-mAB IGF-1R policlonal de conejo, los valores patrón de referencia para las variantes del ensayo son muy similares (Tabla 3).

10 Ejemplo 9

ELISA de unión para detección de anticuerpos anti-mAB IGF-1R usando adsorción pasiva para conjugación (inmovilización) con una fase sólida

15 Una placa de microtitulación (MTP) (Maxisorb[®], Nunc) se revistió con mAB IGF-1R en tampón de carbonato (pH 9,6), a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Después de lavar tres veces con PBS-Tween[®]20, todos los pocillos de las MTP se bloquearon con PBS/BSA al 3 % (p/v) (albúmina de suero bovino) a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se lavaron de nuevo. A continuación, se incubaron las muestras y los patrones de referencia (anticuerpo anti-mAB IGF-1R de conejo policlonal en suero humano al 5 %). El anticuerpo anti-mAB IGF-1R se unió al mAB IGF-1R inmovilizado. Después de retirar por lavado las sustancias sin unir, el anticuerpo anti-mAB IGF-1R unidos se detectó con mAB IGF-1R digoxigenilado seguido de incubación con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado de anticuerpo-enzima catalizó la reacción de color del sustrato ABTS[®]. La señal se midió con un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm (longitud de onda de referencia: 490 nm). Las densidades ópticas de cada muestra de suero se determinaron por triplicado.

25

Se realizaron tres variantes diferentes del ELISA de unión:

- variante 1 usando conjugados de acuerdo con el ejemplo 4
- variante 2 usando conjugados de acuerdo con el ejemplo 5
- 30 - variante 3 usando conjugados mixtos preparados de acuerdo con los ejemplos 4 y 5.

Todas las variantes reactivas de mAB IGF-1R digoxigenilado se sintetizaron tal como se ha descrito anteriormente para mAB IL-6R (ejemplos 4 y 5). Las señales patrón de referencia en las diferentes variantes de ELISA se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 7.

35

Tabla 5: Señales patrón de referencia.

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3
0,00	0,124	0,113	0,113
8,00	0,163	0,138	0,158
16,00	0,238	0,166	0,189
32,00	0,305	0,289	0,337

ES 2 498 377 T3

conc. de ref. [ng/ml]	Variante de la señal 1	Variante de la señal 2	Variante de la señal 3
64,00	0,598	0,510	0,558
128,00	1,023	0,990	1,032
256,00	2,097	1,864	1,990

5 Tal como muestra la Tabla 5, el ensayo de unión de acuerdo con la invención usando adsorción pasiva para conjugación (inmovilización) de mAB IGF-1R con la fase sólida se puede realizar para detección de anticuerpos anti-mAB IGF-1R. Usando el mismo anticuerpo anti-mAB IGF-1R policlonal de conejo, los valores patrón de referencia para todas las tres variantes del ensayo son muy similares (Tabla 5).

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación inmunológica de un anticuerpo frente a un anticuerpo de fármaco en una muestra usando un inmunoensayo de doble unión a antígenos que comprende un a anticuerpo de fármaco de captura y un anticuerpo de fármaco indicador, caracterizado por que
- 5
- i) el anticuerpo de fármaco de captura es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo al que se conjugan con la fase sólida; y
- 10 ii) el anticuerpo de fármaco indicador es una mezcla de dicho anticuerpo de fármaco que comprende al menos dos de dichos anticuerpos de fármaco que difieren en el sitio del anticuerpo al que se conjugan con la marca detectable.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la conjugación del anticuerpo del fármaco con su compañero de conjugación se realiza mediante unión por vía química a través de grupos N-terminales y/o ε-amino (lisina), grupos ε-amino de lisinas diferentes, grupos con funcionalidad carboxi, sulfhidrilo, hidroxilo y/o fenólica de la cadena principal del aminoácido del anticuerpo de fármaco y/o grupos alcohol de azúcar de la estructura de hidrato de carbono del anticuerpo de fármaco.
- 15
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la mezcla de anticuerpo de fármaco indicador comprende el anticuerpo de fármaco conjugado a través de un grupo amino y a través de una estructura de hidrato de carbono con su compañero de conjugación.
- 20
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la mezcla de anticuerpo de fármaco de captura comprende el anticuerpo de fármaco conjugado a través de un grupo amino y a través de una estructura de hidrato de carbono con su compañero de conjugación.
- 25
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la conjugación del anticuerpo de fármaco de captura con la fase sólida se realiza mediante adsorción pasiva.
- 30
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la relación de anticuerpo de fármaco de captura a anticuerpo de fármaco indicador es de 1:10 a 50:1 (relación se refiere a relación de moléculas de anticuerpo independientemente del peso molecular de los conjugados que puede ser diferente).
- 35
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la relación de anticuerpo de fármaco conjugado con amino (anticuerpo de fármaco indicador o de captura) a anticuerpo de fármaco conjugado con hidrato de carbono (anticuerpo de fármaco indicador o de captura) en dicha mezcla es de 1:10 a 10:1 (elación se refiere a relación de moléculas de anticuerpo independientemente del peso molecular de los conjugados que puede ser diferente).
- 40
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 6 a 7, caracterizado por que el anticuerpo de fármaco de captura se inmoviliza a través de un par de unión específico.
- 45
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el anticuerpo de fármaco de captura se conjuga con biotina y la inmovilización se realiza a través de avidina o estreptavidina inmovilizadas.
10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el anticuerpo de fármaco indicador se conjuga con la marca detectable a través de un par de unión específico.
- 50
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que el anticuerpo de fármaco indicador se conjuga con digoxigenina y la unión a la marca detectable se realiza a través de un anticuerpo frente a digoxigenina.

Fig. 1

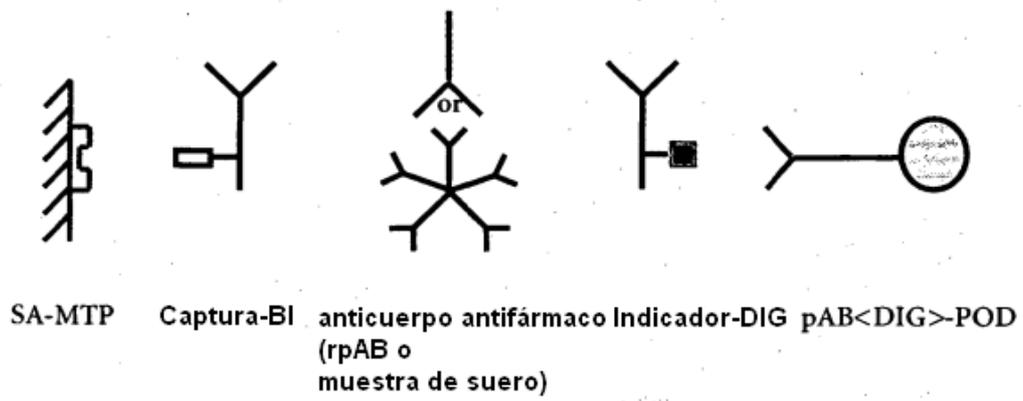


Fig. 2

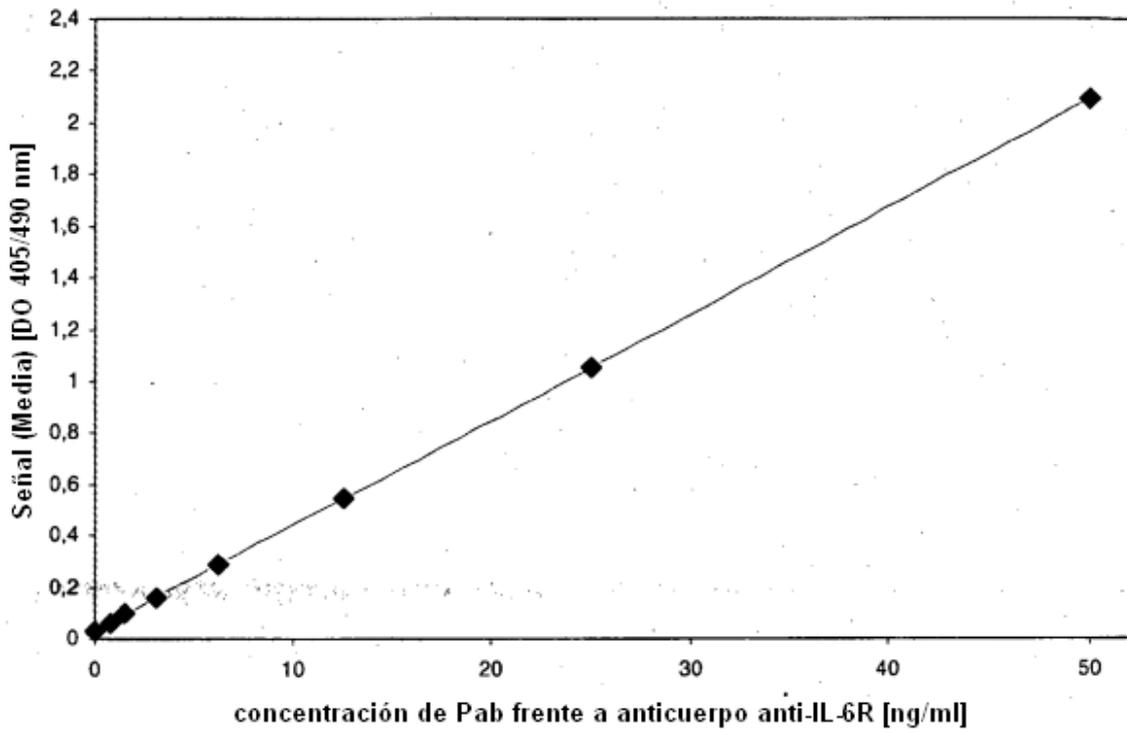


Fig. 3

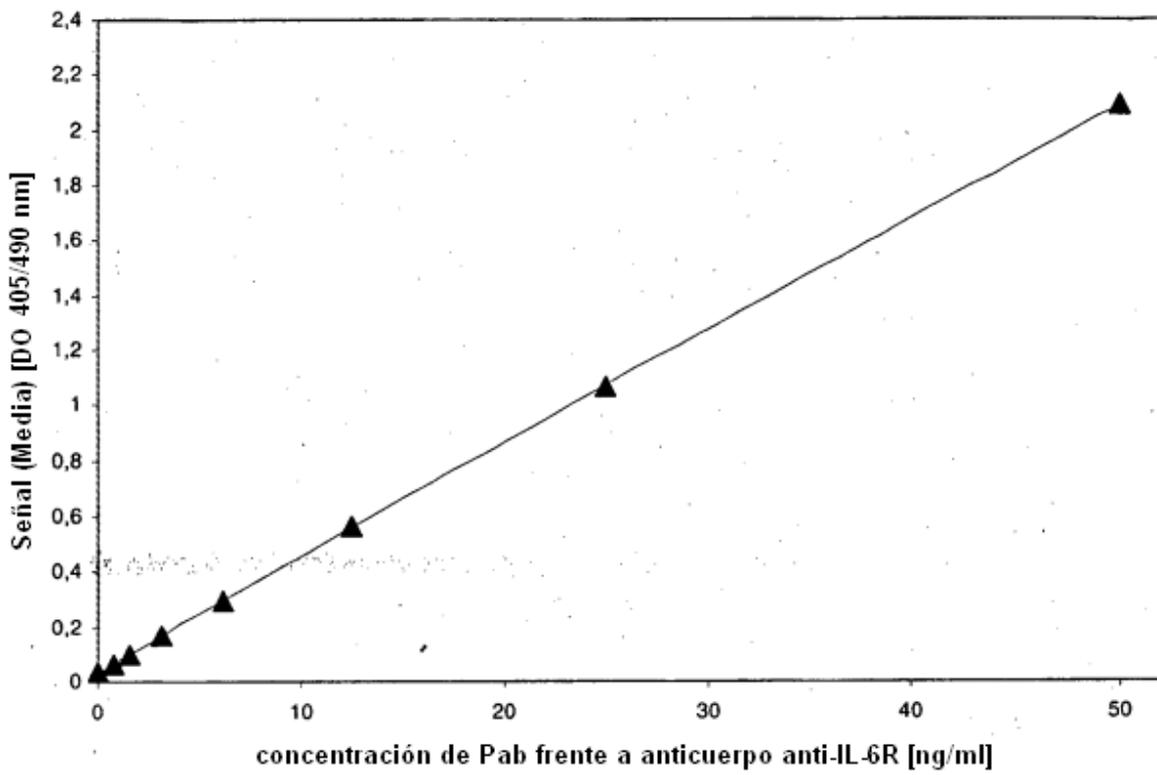


Fig. 4

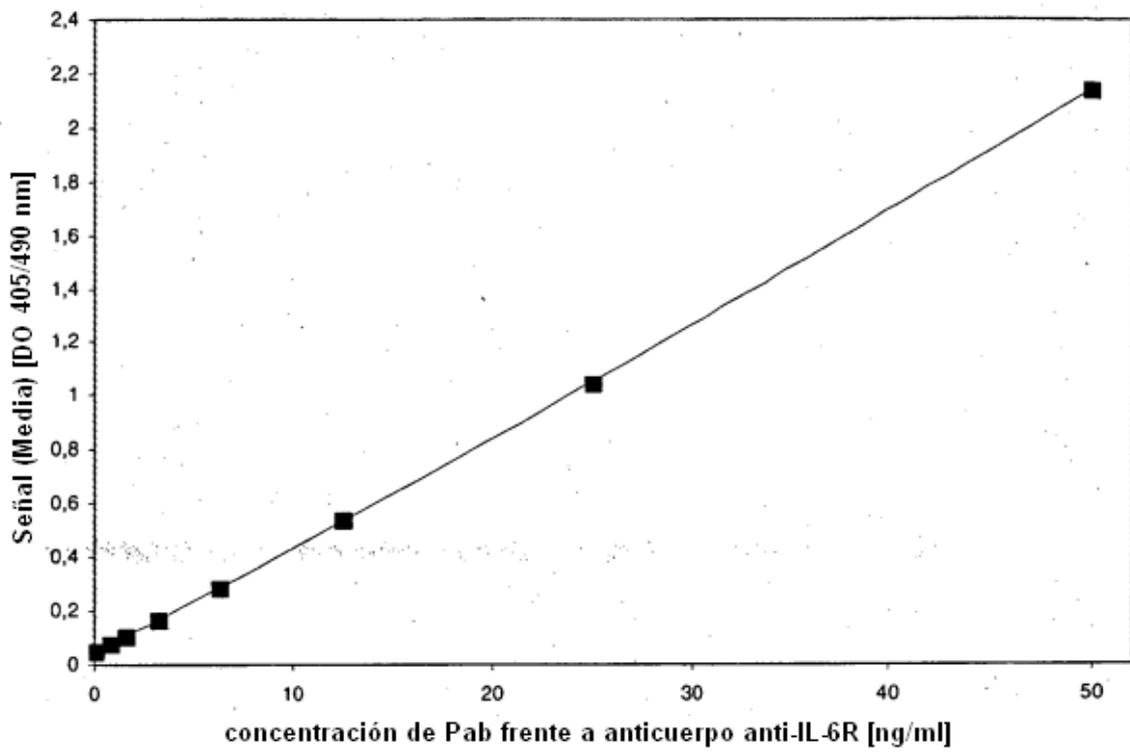


Fig. 5

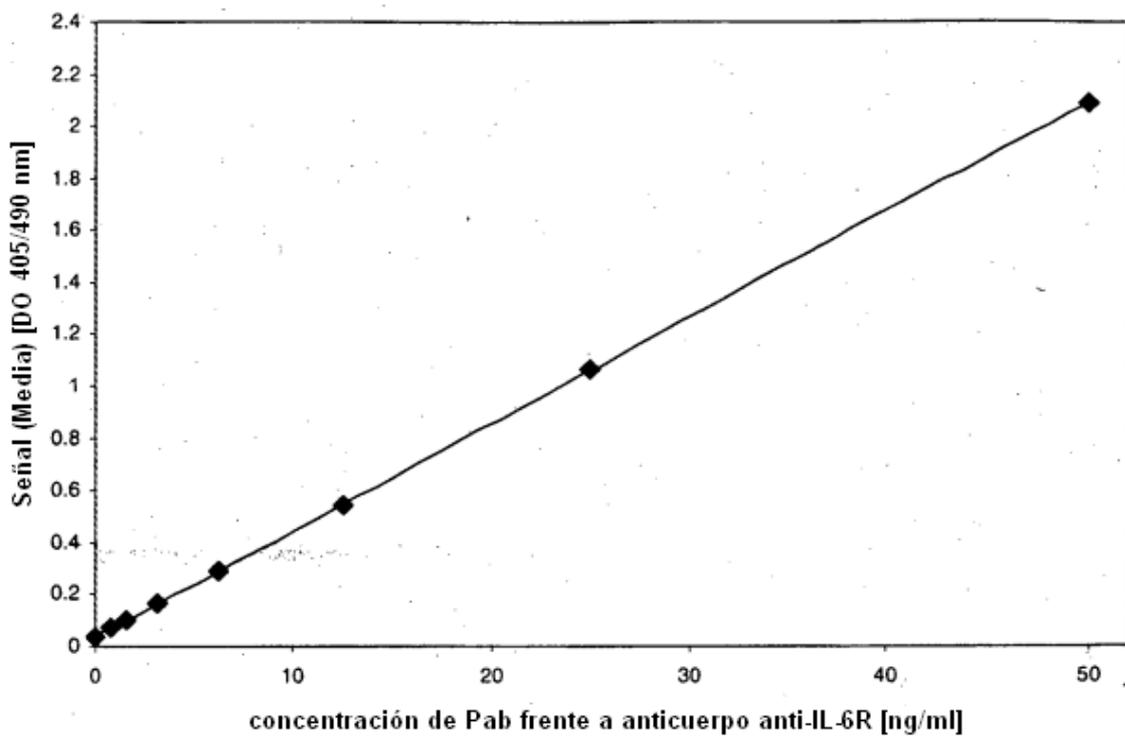


Fig. 6

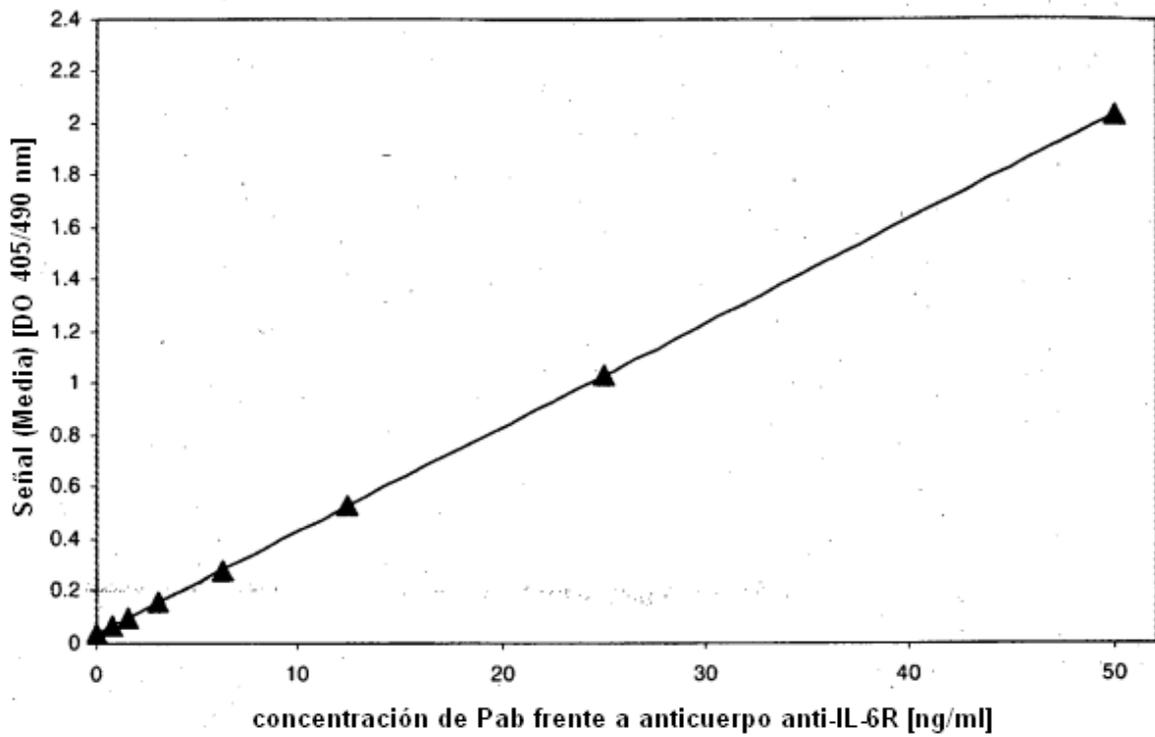


Fig. 7

