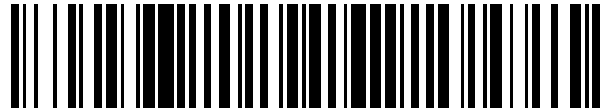


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 158**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08792247 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2187214**

54 Título: **Método para medir la actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor**

30 Prioridad:

06.08.2007 JP 2007204303

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

04.11.2015

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, UKIMA 5-CHOME
KITA-KU, TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

SHIMONAKA, YASUSHI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 550 158 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

Método para medir la actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para medir la presencia o ausencia y/o fuerza de la actividad inhibidora de al menos una sustancia de ensayo sobre la unión entre un ligando y un receptor de la misma. El método de la presente invención es particularmente útil como un método altamente sensible y sencillo para la detección de la actividad neutralizante.

Técnica anterior

15 Cuando se administra repetidamente un fármaco en el organismo, dicha administración repetida puede dar lugar a un anticuerpo contra este fármaco. Incluso en el caso de fármacos recombinantes cuyas secuencias de aminoácidos son las mismas que las de las sustancias endógenas, existe una posibilidad de que surjan autoanticuerpos, algunos de los cuales pueden neutralizar las sustancias endógenas originales.

20 Por ejemplo, en el caso de la eritropoyetina recombinante humana (rhEPO), se ha descubierto que algunos pacientes con insuficiencia renal que reciben EPO desarrollan un anticuerpo neutralizante contra la rhEPO aunque tales casos son muy raros, y también se ha notificado que este anticuerpo causa una aplasia pura de glóbulos rojos positiva para anticuerpos (APGRPA) como una complicación en algunos pacientes (Documento de No Patente 1).

25 Dado que el desarrollo de un anticuerpo neutralizante contra un fármaco no solamente elimina la eficacia del fármaco, sino que también induce una nueva enfermedad, es importante detectar tal anticuerpo neutralizante en una etapa temprana. Sin embargo, los métodos convencionales usados para la detección de anticuerpos neutralizantes no son suficientes para este fin. A modo de ejemplo, para la medición de un anticuerpo anti-EPO, se han usado ensayos tales como los ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima), RIP (inmunoprecipitación radiactiva) y bioensayos para la medición del anticuerpo neutralizante, pero se ha señalado que estos métodos convencionales usados para la detección de anticuerpos neutralizantes no son suficientes en términos de sensibilidad de detección y/o de los procedimientos complicados (Documentos de No Patente 2, 3 y 4). Además, los anticuerpos contra fármacos se producen en muy bajas concentraciones en el organismo, y, por lo tanto, ha sido muy difícil determinar si estos anticuerpos son anticuerpos neutralizantes.

35 Por estos motivos, una vez que se ha confirmado la producción de anticuerpos contra un fármaco, la administración del fármaco debe detenerse en algunos casos debido a motivos de seguridad, sin importar si este anticuerpo tiene una actividad neutralizante. Por lo tanto, existe una demanda de un método altamente sensible y sencillo para la detección de actividad neutralizante.

40 Documento de No Patente 1: N Engl J Med. Febrero de 2002; 346(7):469-75.
 Documento de No Patente 2: Journal of Immunological Methods 283(2003)317-329
 Documento de No Patente 3: Journal of Immunological Methods 300(2005)179-191
 Documento de No Patente 4: Nephrol Dial Transplant (2005)20[Supl. 4]:iv 16-22

45 Mason *et al.*, Current Medical Research and opinion, 2003; 19(7); 651-659 divulga la detección de anticuerpos contra agentes eritropoyéticos en suero humano.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

50 La presente invención se realizó en tales circunstancias y objetivos para proporcionar un método para medir la presencia o ausencia y/o la fuerza de la actividad inhibidora de una sustancia de ensayo sobre la unión entre un ligando y un receptor del mismo, cuyo método puede usarse para la detección altamente sensible y sencilla de anticuerpos neutralizantes.

Medios para resolver los problemas

60 Como resultado de los esfuerzos exhaustivos e intensivos que se han realizado para alcanzar el objetivo anterior, los inventores de la presente invención han descubierto que se pre-inmoviliza una sustancia de ensayo o un ligando sobre una superficie sólida y el nivel de unión entre la sustancia de ensayo y el ligando se compara en presencia o ausencia de un receptor para el ligando, por lo que la unión inhibida entre el ligando y el receptor puede detectarse con una alta sensibilidad. Este hallazgo condujo a la finalización de la presente invención.

65 Es decir, la presente invención se refiere a las realizaciones tal como se divulgan en las reivindicaciones. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para medir la presencia o ausencia y/o fuerza de la actividad inhibidora de una sustancia de ensayo sobre la unión entre un ligando y un receptor del mismo, que

comprende las etapas (1) a (4):

- (1) inmovilizar la sustancia de ensayo o el ligando sobre un soporte sólido;
 (2) poner en contacto la sustancia de ensayo y el ligando para un periodo de tiempo dado en presencia o
 5 ausencia del receptor para el ligando;
 (2) comparar el nivel de unión entre la sustancia de ensayo y el ligando en presencia y ausencia del receptor; y
 (4) determinar que la sustancia de ensayo tiene actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor, si la unión
 entre la sustancia de ensayo y el ligando en presencia del receptor es más baja que en ausencia del receptor; o
 10 determinar la fuerza de la actividad inhibidora de la sustancia de ensayo sobre la unión entre el ligando y el
 receptor dependiendo de la dosis del receptor;

donde la sustancia de ensayo es un anticuerpo y el ligando es una citocina.

Ventajas de la invención

15 La presente invención se dirige a un nuevo método que permite la detección simple de la unión inhibida entre ligando
 y receptor incluso cuando una diana a ensayar está a una concentración baja. Además, dado que este método
 puede confirmar la unión inhibida entre ligando y receptor incluso cuando una diana a ensayar está a una
 20 concentración baja, es posible detectar, con alta sensibilidad, un anticuerpo neutralizante contra un fármaco
 producido en el organismo de un paciente que recibe la administración repetida del fármaco. Para confirmar si un
 anticuerpo de ensayo tiene actividad neutralizante usando un método convencional para detectar un anticuerpo
 neutralizante contra EPO (es decir, un método basado en un bioensayo para neutralizar la detección de un
 anticuerpo que se describe más adelante en el Ejemplo Comparativo 2), se requiere que el anticuerpo esté en una
 25 cantidad de al menos 650 ng/ml, calculada como la concentración en suero. Por el contrario, en el método de
 detección de la presente invención, una concentración de anticuerpo de 40 ng/ml es suficiente para detectar un
 anticuerpo que tiene una actividad neutralizante. El método de la presente invención permite la detección temprana
 del desarrollo temprano de anticuerpos neutralizantes y también permite la administración apropiada de fármacos.

La presente invención se describirá adicionalmente en más detalle a modo de los siguientes ejemplos.

30

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra el efecto de sEPOR (receptor de EPO soluble) a distintas
 concentraciones sobre la unión entre el anticuerpo anti-EPO y EPO.

35 La Figura 2 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del anticuerpo anti-EPO sobre la unión a
 EPO, tal como se mide por un ensayo de receptor usando células AS-E2.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración del anticuerpo anti-EPO sobre la unión a
 EPO, tal como se mide por un bioensayo usando células AS-E2.

Modos de realización de la invención

Definición de términos y expresiones

45 Generalmente, la expresión "sustancia de ensayo" se refiere a una sustancia que está contenida en plasma, suero,
 sangre, lágrimas, fluido corporal o similares recogidos a partir de una diana que recibe la administración de fármaco.
 De acuerdo con el método de la presente invención, la sustancia de ensayo es un anticuerpo.

50 Generalmente, el término "ligando" se refiere a una sustancia que se une a un receptor en el organismo y por lo
 tanto promueve o inhibe la transducción de señal en las células. El ligando de acuerdo con el método de la presente
 invención es una citocina tal como EPO, G-CSF e interferón.

Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor" pretende referirse a una estructura que se une al
 "ligando" de la presente invención y de este modo causa respuestas celulares, o como alternativa, una estructura
 que es un fragmento de la estructura anterior y tiene al menos un sitio de unión para el "ligando". Cuando el
 55 "ligando" es una citocina tal como EPO, G-CSF o interferón, los ejemplos incluyen un receptor de esta citocina o un
 fragmento de este receptor (es decir, un fragmento de receptor que tiene al menos un sitio de unión para el "ligando"
 tal como una región extracelular del receptor).

60 En la presente invención, pueden usarse técnicas de inmovilización de uso común para la "inmovilización sobre un
 soporte sólido". Por ejemplo, cuando la sustancia de ensayo es un anticuerpo, el anticuerpo puede inmovilizarse
 sobre un soporte sólido usando Proteína G. Otras técnicas para la inmovilización sobre un soporte sólido incluyen
 aquellas que usan un tampón de carbonato de sodio, aquellas que usan un reticulado químico (por ejemplo,
 acoplamiento de aminos), y aquellas que usan la unión de biotina-avidina. El soporte sólido usado para este fin no
 65 En el ejemplo de la sección que se describe más adelante, se inmovilizó el anticuerpo anti-EPO sobre proteína G
 Sefarosa 4FF comercialmente disponible (GE Healthcare Bio-Sciences KK).

Tal como se usa en el presente documento, la frase "método usado para detectar la unión intermolecular física " puede referirse a cualquier método que permita la detección de la unión intermolecular física, y los ejemplos incluyen un ensayo RIP, ensayo de (resonancia de plasmones de superficie) RPS, bioensayo, ensayo ELISA, etc. Los procedimientos experimentales para estos ensayos son conocidos para los expertos en la materia.

5

Método de medición de la presente invención

En una realización preferente para implementar la presente invención, cuando se inmoviliza una sustancia de ensayo sobre un soporte sólido, puede detectarse la unión inhibida entre ligando y receptor, por ejemplo, usando un ensayo RIP. La sustancia de ensayo se inmoviliza sobre un soporte sólido y se permite que entre en contacto con un ligando marcado con un radioisótopo o un colorante fluorescente en presencia o ausencia de un receptor para el ligando para detectar el ligando unido a la sustancia de ensayo, por lo que hace posible determinar si la sustancia de ensayo inhibe la unión entre el ligando y el receptor. Si la unión entre la sustancia de ensayo y el ligando es más baja en presencia del receptor que en ausencia del receptor, se puede determinar que esta sustancia de ensayo tiene una actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor. Más específicamente, la presente invención puede implementarse de acuerdo con los procedimientos que se describen más adelante en la sección de los Ejemplos. Es decir, se mezclaron la EPO marcada con ¹²⁵I y diversas concentraciones de receptor de EPO soluble en tubos de RIA. Para las muestras preparadas de este modo se añadieron (los grupos del receptor) y una muestra libre de receptor de EPO soluble (el grupo libre de receptor), suero humano y anticuerpo anti-EPO como una muestra de ensayo de suero humano que contenía anticuerpo anti-EPO. Después se añadió una suspensión de Proteína G Sefarosa 4FF a cada tubo y se agitó vorticialmente para inmovilizar el anticuerpo anti-EPO sobre el soporte sólido, seguido de la centrifugación para retirar el sobrenadante. Los niveles de radiactividad (cpm) en el sedimento resultante y el fondo se midieron para cada muestra con un contador gamma. Este método se usó realmente para determinar el nivel de radiactividad en los analitos, indicando que la unión entre el anticuerpo anti-EPO y ¹²⁵I-EPO, se inhibió de un modo dependiente de la dosis de receptor de EPO soluble.

En otra realización para implementar la presente invención, cuando el ligando se inmoviliza sobre un soporte sólido, se permite que el ligando inmovilizado entre en contacto con una sustancia de ensayo en presencia o ausencia de un receptor para el ligando para detectar la sustancia de ensayo unida al ligando inmovilizado, por lo que hace posible determinar si la sustancia de ensayo inhibe la unión entre el ligando y el receptor. Tal como en el caso anterior, si la unión entre la sustancia de ensayo y el ligando es más baja en presencia del receptor que en ausencia del receptor, se puede determinar que esta sustancia de ensayo tiene una actividad inhibidora sobre la unión receptor-ligando.

Medición de la presencia o ausencia de actividad neutralizante

De acuerdo con la medición anterior, puede determinarse que una sustancia que tiene actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor tiene una actividad neutralizante sobre el ligando. Por ejemplo, este método de medición puede usarse para determinar si un paciente que recibe la administración de un fármaco produce un anticuerpo neutralizante contra el fármaco.

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de sEPOR (receptor de EPO soluble) a distintas concentraciones sobre la unión entre el anticuerpo anti-EPO y ¹²⁵I-EPO

Una solución de ¹²⁵I-EPO (50 µl, 190822 cpm) diluida con un diluyente de analito (10 mmol/l de tampón Tris-HCl que contenía NaCl 150 mmol/l, NaN₃ al 0,02%, BSA al 0,1% y 0,1% en volumen de Tween 20, pH 7.4) y sEPOR (50 µl, R&D Systems) diluido a 0, 8, 40 o 200 µg/ml con el mismo diluyente del analito se mezclaron en tubos de RIA y se permitió que reposaran durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) a aproximadamente 4 °C. El experimento se realizó por triplicado para cada condición.

A cada tubo, se le añadieron suero humano agrupado (20 µl, Gemini Bio-Products) y anticuerpo anti-EPO (80 µl) diluido a 100 ng/ml con el diluyente del analito y se agitó vorticialmente (200 µl en total) y se permitió que reposaran a aproximadamente 4 °C durante 6 horas.

Se añadió una suspensión de Proteína G Sefarosa 4FF (50 µl) a cada tubo y anticuerpo anti-EPO y se agitó vorticialmente en un agitador a temperatura ambiente durante 1 hora. Debe tenerse en cuenta que la suspensión de Proteína G Sefarosa 4FF se preparó repitiendo dos veces el procedimiento de suspender la Proteína G Sefarosa 4FF (GE Healthcare Bio-Sciences KK) en un volumen igual del diluyente del analito y centrifugando la suspensión resultante (1660 x G, aproximadamente 4 °C, 1 minuto) para retirar el sobrenadante, seguido de la adición de 1 ml de diluyente del analito por gramo en peso húmero del gel (intervalo permisivo: ± 2%) para suspender el gel. A continuación, el diluyente del analito enfriado (2 ml) se añadió a cada tubo y se agitó vorticialmente, seguido por centrifugación (1660 x G, aproximadamente 4 °C, 5 minutos) para retirar el sobrenadante. Se diluyó este sedimento de nuevo con el diluyente del analito enfriado (2 ml) y se agitó vorticialmente, seguido por centrifugación (1660 x G, aproximadamente 4 °C, 5 minutos) para retirar el sobrenadante. Se midieron los niveles de radiactividad (cpm) en el

sedimento y el fondo (5 tubos vacíos) durante 5 minutos con un contador gamma (sistema de Recuento COBRA Quantum 5005 Gamma, PerkinElmer). La siguiente ecuación se usó para determinar el nivel de radiactividad para cada analito.

- 5 Nivel de radiactividad (cpm) en el analito = Nivel de radiactividad medida en el analito (cpm) - Nivel de fondo (cpm del promedio de 5 tubos vacíos).

Los resultados se muestran en la Figura 1. La unión entre el anticuerpo anti-EPO y ¹²⁵I-EPO se inhibió de un modo dependiente de la dosis de sEPOR.

10

Ejemplo 2: Estudio con muestras de suero de distintos seres humanos

Una solución de ¹²⁵I-EPO (50 µl, 88869 cpm) diluida con diluyente del analito y el diluyente solo (50 µl, Control) o sEPOR (50 µl) diluidos a 40 µg/ml se mezclaron en tubos RIA y se les permitió que reposaran durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) a aproximadamente 4 °C. El experimento se realizó por duplicado para cada condición.

15

A los respectivos tubos, se les añadieron las muestras de suero de distintos seres humanos (20 µl, UNIGLOBE RESEARCH CORPORATION) y anticuerpo anti-EPO (80 µl) diluido a 10 o 100 ng/ml con el diluyente del analito y se agitó vorticialmente (200 µl en total) y se permitió que reposaran a aproximadamente 4 °C durante 6 horas.

20

Se añadió una suspensión de Proteína G Sefarosa 4FF (50 µl) a cada tubo y se agitó vorticialmente en un agitador a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió el diluyente del analito enfriado (2 ml) a cada tubo y se agitó vorticialmente, seguido por centrifugación (1660 x G, aproximadamente 4 °C, 5 minutos) para retirar el sobrenadante. Se diluyó el sedimento de nuevo con el diluyente del analito enfriado (2 ml) y se agitó vorticialmente, seguido por centrifugación (1660 x G, aproximadamente 4 °C, 5 minutos) para retirar el sobrenadante. Se midieron los niveles de radiactividad (cpm) en el sedimento y el fondo (5 tubos vacíos) durante 5 minutos con un contador gamma (sistema de Recuento COBRA Quantum 5005 Gamma, PerkinElmer). El mismo procedimiento tal como se usa en el Ejemplo 1 se repitió para determinar el nivel de radiactividad en cada analito.

25

- 30 Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Debe tenerse en cuenta que la concentración de anticuerpos se expresa como la concentración en suero.

[Tabla 1]

n.º de suero	suero solo		40 ng		400 ng	
	Control	EPOR	Control	EPOR	Control	EPOR
1	212,7	177,7	910,3	479,1	7867,6	3215,0
2	160,7	186,2	966,7	535,0	8032,0	3714,2
3	174,1	212,0	1054,2	539,4	8232,4	3443,8
4	144,1	200,3	960,9	498,6	7835,9	3521,6
5	640,2	287,4	1310,2	573,4	8195,5	3643,8
6	233,8	255,6	867,5	491,1	7609,1	3246,8
7	211,7	297,0	953,1	532,0	7684,8	3542,6
8	242,3	243,9	1030,7	563,3	8112,4	3528,5
9	357,4	442,1	1316,7	529,2	9368,0	3663,8
10	218,9	316,3	1125,3	621,2	8471,5	3904,0
Promedio	259,6	261,8	1049,5	536,2	8140,9	3542,4
DT	146,0	79,4	157,0	42,3	505,3	208,2

- 35 En todas las muestras de suero, se observó la inhibición de la unión entre el anticuerpo anti-EPO y ¹²⁵I-EPO tras la adición de sEPOR.

Este resultado indicó que cuando se usaba el método de la presente invención, una concentración de anticuerpo de 40 ng/ml fue suficiente para detectar la actividad inhibidora de un anticuerpo de ensayo.

40

Ejemplo comparativo:

1. Ensayo de receptor

5 Se cultivó la línea celular de eritroleucemia AS-E2 humana en medio Iscove modificado de Dulbecco (IMDM) que contenía FBS al 20%(Hyclone) en presencia de 10 ng/ml de EPO en un incubador de CO₂ a 37 °C con CO₂ al 5% durante 6 días. Después la finalización del cultivo, los tubos se centrifugaron a aproximadamente 4 °C a 1000 rpm durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante por succión. Las células se lavaron tres veces con IMDM que contenía FBS al 20% y después se cultivaron durante toda la noche (aproximadamente 24 horas) en un incubador de CO₂ a 10 37 °C con CO₂ al 5%.

Después del cultivo, se recogieron las células por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS de Dulbecco que contenía BSA al 1% (BSA al 1%/PBS), y después se diluyeron hasta 1 X 10⁷ células/ml. Se añadió el anticuerpo anti-EPO (50 µl) diluido hasta 0, 0,46, 2,78, 16,7 o 100 µg/ml con BSA al 1% /PBS, ¹²⁵I-EPO (50 µl, 100025 cpm) y la 15 suspensión celular anterior diluida (200 µl) se mezcló adicionalmente, seguido por el reposo durante toda la noche (aproximadamente 20 horas) a aproximadamente 4 °C.

Se centrifugaron las células después de permanecer en reposo, se lavaron dos veces con BSA al 1%/PBS, y se midió su nivel de radiactividad (cpm) con un contador gamma durante 5 minutos.

20 El nivel de fondo se midió del mismo modo, excepto en el uso de las células en presencia de 2 µg de EPO no marcada en lugar de ¹²⁵I-EPO y el anticuerpo. La unión específica se calculó restando la radiactividad de fondo de la radiactividad de cada concentración de anticuerpo.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. Para confirmar si se inhibió la unión a EPO sobre la superficie celular, se requirieron al menos 500 ng/ml de anticuerpo. Para la evaluación real en un sistema que contiene suero al 50%, se requiere una concentración de anticuerpo de 1 µg/ml (calculado como la concentración en suero).

2. Bioensayo

30 Una suspensión de células AS-E2, que se ha cultivado en FBS al 20%/IMDM en presencia de 10 ng/ml de EPO, se recogió a partir de matraces de cultivo en tubos de centrifuga, y se centrifugó a 1000 rpm (aproximadamente 240 xG) durante 10 minutos. Después de retirar el sobrenadante, se suspendieron las células en el medio de ensayo (FBS AL 20%/IMDM), se centrifugó de nuevo para retirar el sobrenadante, y después se suspendió en el 35 medio de ensayo. Este procedimiento se repitió tres veces para retirar la EPO restante en el medio. Se tiñó una alícuota de la suspensión celular con azul de tripano al 0,4% y se hizo un recuento para determinar el número de células vivas y la tasa de supervivencia. La suspensión celular se diluyó con el medio de ensayo para que contuviera células vivas a 2 X 10⁵ células/ml.

40 Una solución de EPO diluida con en medio de ensayo se dispensó en un volumen de 40 µl/pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Además, se añadió una muestra o el medio de ensayo en un volumen de 10 µl/pocillo. Se usaron tres pocillos para cada muestra (ensayo triplicado). Se transfirió la placa a un incubador de CO₂ y se permitió que reposara de 30 a 60 minutos. Se retiró la placa del incubador de CO₂ y la suspensión celular de 2 X 10⁵ células/ml se añadió a todos los pocillos de ensayo en un volumen de 1 x 10⁴ células/50 µl/pocillo. Independientemente de 45 estos pocillos, se proporcionaron otros tres pocillos (pocillos del blanco), en los que no se sembraron células. A estos pocillos del blanco, se les añadió el medio de cultivo en un volumen de 100 µl/pocillo. Se incubó la placa en un incubador de CO₂ de 96 a 97 horas. Para minimizar la desecación de los pocillos en la placa, se añadió PBS en un volumen de 300 µl/pocillo a los pocillos que no contenían nada (pocillos vacíos).

50 Después de finalizar el cultivo, se añadió y se mezcló una solución de WST-1 en todos los pocillos en un volumen de 10 µl/pocillo, y se midió la absorbancia a 450 nm (0 horas) para cada pocillo con un lector de microplacas usando una longitud de onda de control de 620 nm. Después de la incubación en un incubador de CO₂ durante 2 horas, se midió la absorbancia a 450 nm (2 horas) para cada pocillo usando una longitud de onda de control de 620 nm.

55 Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

En este sistema, la inhibición del crecimiento podría confirmarse a una concentración de anticuerpo de ensayo de 130 ng/ml o más. Dado que el límite superior para la concentración de suero añadida a los sistemas celulares es del 20%, en el caso de preparar un sistema que contiene el 20% de suero, la presencia de un anticuerpo neutralizante 60 puede detectarse si la concentración de suero del anticuerpo neutralizante es de 650 ng/ml o más.

En general, en los sistemas de evaluación que usan líneas celulares, se sabe que la adición de una gran cantidad de suero humano causa una inhibición del crecimiento no específica. Por lo tanto, para detectar la inhibición del crecimiento específica tal como se pretende en el presente documento, el suero humano a añadir se ajusta a menudo dentro del 20%. Este sistema por lo tanto requiere 650 ng/ml de anticuerpo para realizar un ensayo de 65 inhibición del crecimiento.

REVINDICACIONES

- 5 1. Un método para medir la presencia o ausencia y/o fuerza de la actividad inhibidora de una sustancia de ensayo sobre la unión entre un ligando y un receptor del mismo, que comprende las etapas (1) a (4):
- (1) inmovilizar la sustancia de ensayo o el ligando sobre un soporte sólido;
- (2) poner en contacto la sustancia de ensayo y el ligando durante un periodo de tiempo dado en presencia o ausencia del receptor para el ligando;
- 10 (3) comparar el nivel de unión entre la sustancia de ensayo y el ligando en presencia y ausencia del receptor; y
- (4) determinar que la sustancia de ensayo tiene actividad inhibidora sobre la unión ligando-receptor, si la unión entre la sustancia de ensayo y el ligando en presencia del receptor es más baja que en ausencia del receptor; o determinar la fuerza de la actividad inhibidora de la sustancia de ensayo sobre la unión entre el ligando y el receptor dependiendo de la dosis del receptor; donde la sustancia de ensayo es un anticuerpo y el ligando es una citocina.
- 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el nivel de unión entre la sustancia de ensayo y el ligando se mide por un método usado para detectar la unión física intermolecular.
- 20
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el ligando es una citocina administrada a un paciente, y la sustancia de ensayo es un anticuerpo recogido del paciente.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el ligando es eritropoyetina, el receptor es un receptor de eritropoyetina y la sustancia de ensayo es un anticuerpo anti-eritropoyetina.
- 25
5. Un método para detectar la presencia o ausencia y/o fuerza de la actividad neutralizante de una sustancia de ensayo sobre un ligando en una muestra, que comprende el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

Figura 1

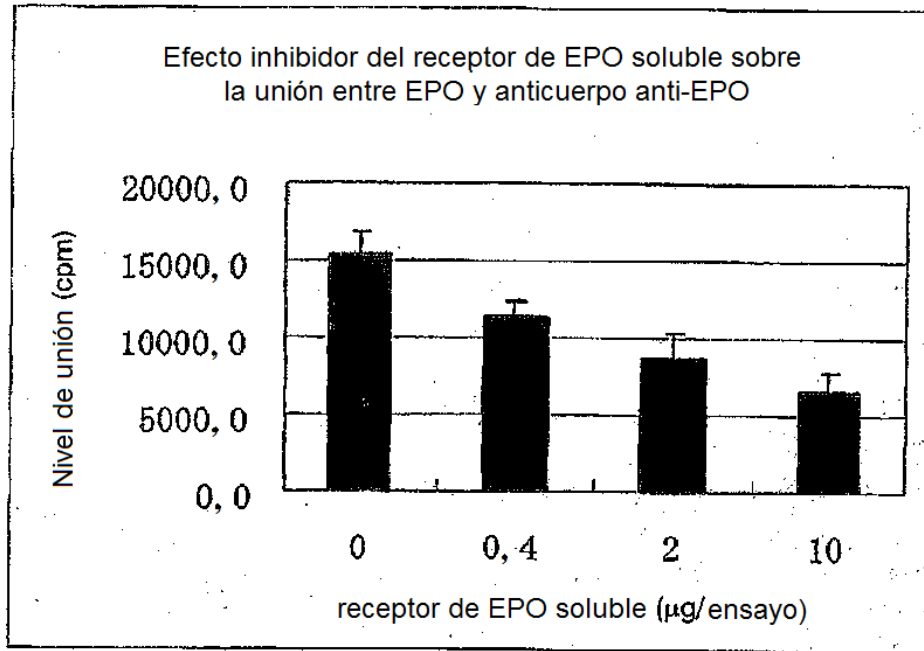


Figura 2

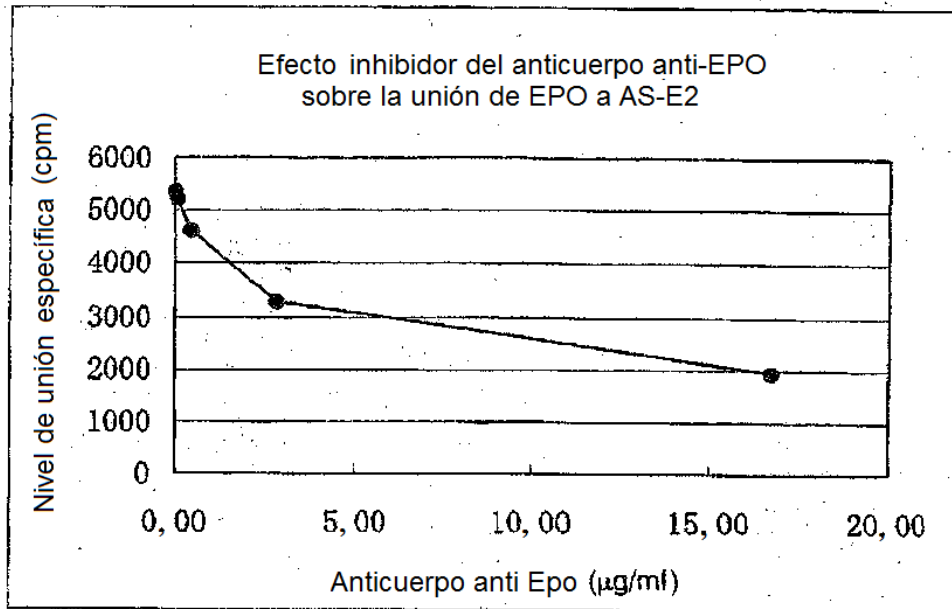


Figura 3

