

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 280**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2008 PCT/JP2008/065032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2009 WO09025364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08827899 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2184608**

54 Título: **Inhibidor de reacción no específica**

30 Prioridad:

**23.08.2007 JP 2007216750**

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

**19.04.2017**

73 Titular/es:

**LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)  
13-4, Uchikanda 1-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**TAKAGI, YOSHIKAZU y  
SHINTANI, YUICHI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 609 280 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

Inhibidor de reacción no específica

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere al uso de un complejo como se define en las reivindicaciones como inhibidor de reacción no específica en una medición inmunológica, particularmente como inhibidor de reacción no específica capaz de inhibir una reacción no específica que puede interferir con la detección o cuantificación fiable de una sustancia traza en un procedimiento de medición inmunológico.

**Antecedentes de la técnica**

10 Incluso en un procedimiento de medición muy específico que utiliza una reacción antígeno-anticuerpo, existe un problema de que algunas muestras que no contienen un antígeno que se va a medir, muestran valores medidos positivos, es decir, valores medidos diferentes de los valores verdaderos. Este fenómeno se denomina reacción no específica.

15 Como procedimiento de medición inmunológica que utiliza un soporte insoluble sobre el cual se inmoviliza un anticuerpo unido específicamente a un antígeno que se va a medir, se conocen un procedimiento de medición óptica de la aglutinación de látex y un inmunoensayo enzimático. Cuando dicho procedimiento se usa para medir la concentración de un antígeno contenido en las muestras, existen algunos casos donde determinadas muestras contienen un factor que es diferente del antígeno, pero que puede reconocer y reaccionar con el anticuerpo inmovilizado (un factor de reacción no específica). En estos casos, dichas muestras suscitan el problema de que las muestras que no contienen un antígeno que se va a medir muestran valores medidos positivos, es decir, valores medidos diferentes de los valores verdaderos.

20 El factor de reacción no específica contenido en las muestras no está particularmente limitado, siempre que este sea una sustancia que sea diferente del antígeno que se va a medir, y pueda reaccionar con un transportador inmovilizado con un anticuerpo. Los ejemplos de factor de reacción no específica que se producen frecuentemente incluyen anticuerpos que se producen naturalmente tales como IgM, IgG, e IgA. Cuando una muestra es un fluido corporal humano, tal como un suero o plasma, la IgM humana o la IgG humana participan frecuentemente en reacciones no específicas, y se produce una aglutinación no específica de los soportes de látex en el procedimiento de medición óptica de la aglutinación de látex.

25 Se conoce procedimiento para inhibir una reacción no específica producida por el factor de reacción no específica, un procedimiento de evitar el efecto de la IgM humana o de la IgG humana suplementando un reactivo de medida con un anticuerpo dirigido contra la IgM humana, un anticuerpo dirigido contra la IgG humana, o similar. Como inhibidor concreto añadido en este procedimiento, se propone un componente sérico obtenido de animales diferentes de seres humanos (referencia de patente 1). La referencia de patente 2 divulga un procedimiento para suplementar un reactivo de medida con un anticuerpo obtenido inmunizando un animal con un factor de reacción no específica. Se puede hacer disminuir una reacción no específica suplementando un reactivo de medida con este tipo de anticuerpo.

30 Sin embargo, la IgG o IgM obtenida de un suero animal tiene múltiples sitios para el reconocimiento de un antígeno. Por ejemplo, una molécula de IgG tiene dos sitios de reconocimiento del antígeno, y una molécula de IgM tiene al menos diez sitios de reconocimiento del antígeno. Además, la IgG y la IgM presentan una propiedad muy hidrófoba, en comparación con otras proteínas. Por estos motivos, cuando IgG o IgM coexisten en el mismo líquido de reacción con un antígeno que es una diana de IgG o IgM, se produce una reacción inmunológica nefelométrica. La reacción inmunológica nefelométrica es un fenómeno en el que múltiples antígenos se reticularan con IgG o IgM para formar un enorme complejo inmunológico, que produce una opacidad capaz de detectarse ópticamente como turbidez. Por ejemplo, cuando se añade IgM a un líquido de reacción que contiene un anticuerpo específico para la IgM humana, se produce una reacción inmunológica nefelométrica y el líquido de reacción se vuelve turbio. En estas condiciones, cuando se lleva a cabo el procedimiento de medición óptica de aglutinación del látex, en el que la cantidad de antígeno se determina midiendo la turbidez óptica, algunas veces no se puede obtener un valor de medición fiable debido a la reacción inmunológica nefelométrica. Como se describe anteriormente, se puede evitar una reacción no específica debido a un factor de reacción no específica, pero sigue habiendo el problema de evitar nuevamente los resultados en una reacción inmunológica nefelométrica secundaria. Además, existe otro problema cuando una muestra contiene factores reumatoides, la reacción inmunológica nefelométrica está aumentada debido a los factores reumatoides que se unen con la región Fc de una molécula de IgG o IgM.

50 Estos problemas pueden resolverse añadiendo una cantidad menor de anticuerpo a un reactivo de medida. Sin embargo, cuando la cantidad añadida es menor que la cantidad suficiente para inhibir el efecto de un factor de reacción no específica, el efecto de inhibir la reacción no específica es insuficiente.

55 En estas circunstancias, los presentes inventores examinaron un procedimiento utilizando, como inhibidor de reacción no específica, un "fragmento de anticuerpo" obtenido digiriendo un "anticuerpo", por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub> obtenido digiriendo una molécula de IgG con una proteasa, pepsina. Una molécula de IgG o IgM contiene una región

Fc que tiene una elevada hidrofobicidad, pero  $F(ab')_2$  no contiene la región Fc. Por tanto, cuando se usa  $F(ab')_2$ , la reacción inmunológica nefelométrica producida por la adición de un anticuerpo no se produce fácilmente y, por tanto, se puede añadir una gran cantidad de  $F(ab')_2$  a un reactivo de medida. Además, se puede evitar el efecto de los factores reumatoides ya que  $F(ab')_2$  no contiene la región Fc. Por tanto, los anteriores problemas producidos por la adición de IgG (es decir, la reacción inmunológica nefelométrica y el efecto de los factores reumatoides) se puede evitar utilizando  $F(ab')_2$ . En estas circunstancias, el efecto de  $F(ab')_2$  de inhibir la reacción no específica es el mismo que el de la IgG. Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento que utiliza un fragmento de anticuerpo  $F(ab')_2$  como inhibidor de reacción no específica es más práctico que la invención que utiliza un anticuerpo. Los presentes inventores evaluaron además un reactivo de medida que contiene el  $F(ab')_2$  como inhibidor; se descubrió que el reactivo de medida tiene la desventaja de mantener el efecto de inhibir la reacción no específica.

La molécula  $F(ab')_2$  es una molécula en la que dos moléculas de Fab' se unen mediante un enlace disulfuro de la región bisagra.  $F(ab')_2$  se caracteriza por una elevada sensibilidad a la reacción de oxidación-reducción.  $F(ab')_2$  se reduce y degrada fácilmente a dos moléculas de Fab'. Además, como el componente sérico contiene una proteasa que escinde un enlace peptídico en la región bisagra de  $F(ab')_2$ ,  $F(ab')_2$  se degrada si la purificación de  $F(ab')_2$  a partir del suero es insuficiente o si el reactivo de medida está contaminado con la proteasa o similar. Por tanto, cuando un reactivo de medida coexiste con  $F(ab')_2$ ,  $F(ab')_2$  se degrada fácilmente de acuerdo con el procedimiento de almacenamiento del reactivo de medida. Como Fab' presenta un efecto muy débil de inhibición de una reacción no específica en comparación con un anticuerpo o  $F(ab')_2$ , se consideró que la degradación de  $F(ab')_2$  en el reactivo de medida reduce el mantenimiento del efecto de inhibir una reacción no específica. Realmente, el efecto de inhibir una reacción no específica no se observó significativamente en el reactivo de medida suplementado con Fab' como inhibidor de reacción no específica.

Como técnica anterior diferente de la inhibición anteriormente mencionada de una reacción no específica en una medición inmunológica, se conoce el uso de un Fab' químicamente modificado para un fármaco antitumoral. Por ejemplo, Delgado C. y col. (referencia no de patente 1) divulga un fármaco antitumoral que contiene un Fab' químicamente modificado con polietilenglicol. La referencia de patente 3 divulga un fármaco antitumoral que contiene Fab' unido a un fármaco y a un polímero mediante grupos tioles de Fab'.

[referencia de patente 1] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (Kokai) N.º 2006-38823

[referencia de patente 2] Publicación de patente japonesa pendiente de examen (Kokai) N.º 11-287801

[referencia de patente 3] Patente de Estados Unidos N.º 5.541.297

[referencia no de patente 1] British Journal of Cancer, (Reino Unido), 1996, vol. 73, n.º. 2, p. 175-182

El documento US 2002052009 divulga la reducción de la unión no específica a una fase sólida tratando la fase sólida con biomoléculas modificadas con polióxido de alquileo. La biomolécula es un analito no específico o biomolécula inerte, que se une a la fase sólida y no interfiere con el procedimiento de detección, tal como por ejemplo albúmina o anticuerpos no específicos.

### **Divulgación de los problemas de la que van a resolver mediante la invención**

Como se ha descrito anteriormente, la adición de un anticuerpo a un inhibidor de reacción no específica da como resultado una reacción inmunológica nefelométrica. La adición de  $F(ab')_2$  tuvo la desventaja de mantener el efecto de inhibir la reacción no específica. En estas circunstancias, un objeto de la presente invención es resolver estos problemas y proporcionar un inhibidor de reacción no específica que sea eficaz en pequeñas cantidades, desde el punto de vista de la eficacia económica.

### **Medios para resolver los problemas**

Aunque IgG o  $F(ab')_2$  tienen el efecto de inhibir la reacción no específica, Fab' tiene un efecto muy débil de inhibir la reacción no específica. Se sugirió como causa

(1) que Fab' tiene un sitio de reconocimiento del antígeno; y

(2) que Fab' puede unirse a un antígeno, pero no tiene el efecto de inhibir la reacción no específica, es decir, existe la posibilidad de que un Fab' que tenga un tamaño molecular menor de un determinado tamaño molecular pueda unirse a un factor de reacción no específica, pero no inhiba la reacción no específica producida por el factor de reacción no específica. Los presentes inventores prepararon un enorme complejo uniendo Fab' a diversos polímeros y examinaron si se recuperó o no el efecto de inhibir la reacción no específica. Como resultado, se recuperó el efecto de inhibir la reacción no específica modificando Fab' con uno cualquiera de polietilenglicol, dextrano, albúmina de suero bovino (BSA), y ácido poliglutámico, independientemente de los tipos de enlace utilizados en la modificación con un polímero. Este resultado dejó claro que el motivo de que Fab' perdiera el efecto de inhibir la reacción no específica era principalmente el supuesto (2). En concreto, se encontró que Fab' unido a polietilenglicol presentó el efecto de inhibir la reacción no específica en una pequeña cantidad (aproximadamente 1/5 a 1/10) en comparación con IgG o  $F(ab')_2$ . Además, se encontró que Fab' modificado no produce fácilmente la reacción inmunológica nefelométrica.

Se realiza convencionalmente la modificación de la proteína con polietilenglicol. Se llevaron a cabo prácticamente todas las modificaciones para aumentar la estabilidad de la proteína. Cuando se administra la proteína a un ser

humano u otros animales como agente terapéutico, la proteína se modifica a menudo con un polímero para evitar el efecto de las proteasas del organismo o para alargar la vida media en sangre. Por el contrario, se lleva a cabo la modificación del anticuerpo con un polímero en la presente invención para aumentar el tamaño molecular del inhibidor de la reacción no específica que contiene el fragmento de anticuerpo, y de esta manera, el objeto de la presente invención es diferente del de los productos modificados por polímero conocidos, es decir, la mejora de la estabilidad.

Una modificación química de la proteína con un polímero es un procedimiento conocido. Una revisión por Roberts M.J. y col. (*Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54, 459-476) y una revisión por Francesco M. y col. (*Biomaterials* 2001, 22, 405-417) divulga los procedimientos principales de la modificación química. Por ejemplo, se divulga un procedimiento de unir un polímero a una proteína utilizando, como diana, un grupo amino de la cadena secundaria de los aminoácidos que constituyen la proteína, un grupo tiol de un resto de cisteína, un grupo carboxilo del extremo carboxilo, un grupo amino del extremo amino, o un grupo hidroxilo de un resto de serina, un resto de treonina, o similar. Además, es conocido un procedimiento de unión de un polímero a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En particular, cuando un anticuerpo está químicamente modificado, se considera útil que un anticuerpo químicamente modificado se prepare sin pérdida de actividad de anticuerpo, es decir, una actividad de unión con un antígeno. Como se divulga en una revisión por Andrew P. y col. (*Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54, 531-545), como el sitio de reconocimiento del antígeno contiene grupos amino o grupos carboxilo, cuando se une un polímero utilizando estos grupos funcionales como diana, el sitio de reconocimiento del antígeno se enmascara a menudo con el polímero y, como resultado, la actividad del anticuerpo está disminuida por la modificación química. Para evitar la desventaja asociada con dicha modificación de polímero se conoce, por ejemplo, un procedimiento de unión a un polímero utilizando como diana un grupo tiol de la región bisagra de Fab' o un grupo tiol de la IgG reducida. Una revisión de Slinkin M.A. y col. (*Bioconjug Chem.* 1992, 3(6), 477-483) divulga un ejemplo de trabajo en el que se unió un polímero a un grupo tiol de un fragmento de anticuerpo Fab'. Una revisión de Delgado C. y col. (*Br J Cancer.* 1996, 73(2), 175-182) divulga un ejemplo de trabajo de un fármaco antitumoral que contiene Fab' químicamente modificado con polietilenglicol. La patente de Estados Unidos 5.541.297 divulga un fármaco antitumoral que contiene Fab' unido a un fármaco y a un polímero mediante grupos tioles de Fab'.

El diagnóstico y tratamiento se puede clasificar generalmente en un caso in vivo y un caso in vitro. Se utilizan casi todos los usos del anticuerpo modificado por polímero en el tratamiento o diagnóstico in vivo. Por ejemplo, cuando se administra un anticuerpo unido a un fármaco o un isotipo a un organismo como cuerpo como agente terapéutico o agente de detección de una lesión tal como un tumor, el anticuerpo se modifica con un polímero. Por el contrario, en el diagnóstico in vitro, no se ha encontrado el uso de un anticuerpo modificado con polímero y no se ha utilizado un anticuerpo modificado con polímero. No se administra un agente a un organismo in vitro, en contraste con los casos in vivo. Por tanto, cuando se examinó el uso in vitro, fueron necesarios efectos notablemente ventajosos diferentes a la mejora de la estabilidad. Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona una nueva aplicación en el diagnóstico in vitro para la recién encontrada utilidad como "inhibidor de reacción no específica".

La presente invención es para proporcionar un nuevo uso como "inhibidor de reacción no específica", y la presente invención muestra efectos ventajosos en comparación con las técnicas convencionales de inhibir una reacción no específica.

Los presentes inventores llevaron a cabo intensos estudios sobre inhibidores de reacción no específica y, como resultado, encontraron que los problemas que implicaban la reacción inmunológica nefelométrica y el mantenimiento del almacenamiento podrían resolverse uniendo químicamente un polímero a un anticuerpo específico de un factor de reacción no específica o un fragmento del anticuerpo, y que el producto modificado por el polímero presentaba el efecto de inhibir una reacción no específica cuando se utilizaron cantidades pequeñas. La presente invención se refiere al uso de un complejo de un anticuerpo o un fragmento del anticuerpo capaz de unirse específicamente a un factor de reacción no específica, y un polímero, como inhibidor de reacción no específica en una medición inmunológica, en el que el factor de reacción no específica se selecciona entre el grupo que consiste en IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, el complemento, factores reumatoides, y un receptor Fc.

De acuerdo con una realización preferida del uso de la presente invención, el polímero es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en un polisacárido, una proteína, y un polímero orgánico de elevado peso molecular, y es más preferentemente polietilenglicol.

De acuerdo con otra realización preferida del uso de la presente invención, el peso molecular del polímero es de 1 kDa a 1000 kDa.

De acuerdo con otra realización preferida más del uso de la presente invención, el fragmento del anticuerpo es F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fd, una cadena L, una cadena H, o la IgG reducida (rIgG).

De acuerdo con otra realización preferida más del uso de la presente invención, la unión del anticuerpo o uno de sus fragmentos al polímero es una modificación química que utiliza un grupo tiol, amino, hidroxilo, o carboxilo, o una unión biotina-avidina.

De acuerdo con otra realización preferida más del uso de la presente invención, la medición inmunológica es un procedimiento de medición óptica de aglutinación, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo nefelométrico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, un fluoroinmunoensayo o un radioinmunoensayo.

### **Efectos de la invención**

5 De acuerdo con la presente invención, el efecto de inhibir una reacción no específica está notablemente aumentado por la unión de un polímero a un anticuerpo dirigido contra un factor de reacción no específica, o un fragmento del anticuerpo, y se puede inhibir una reacción no específica con una pequeña cantidad (aproximadamente 1/5 a 1/10) en comparación con un anticuerpo convencional sin dicha modificación. De acuerdo con la presente invención, se pueden resolver los problemas producidos por la adición de un anticuerpo, es decir, el problema acerca de la  
10 generación de la reacción inmunológica nefelométrica y el problema acerca del mantenimiento.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE) de Fab'Mals y del Fab' bloqueado con un grupo tiol preparado en el Ejemplo 1.

15 La Figura 2 es una gráfica que muestra los efectos de la inhibición de una reacción no específica (muestra que se va a evaluar = muestra A) con respecto a F(ab')<sub>2</sub>Suc, Fab'Suc, y Fab'Mal (inhibidores de la reacción no específica de la presente invención) que están modificados con polietilenglicol de 20 kDa, así como F(ab')<sub>2</sub> sin modificar a fines comparativos.

20 La Figura 3 es una gráfica que muestra los efectos de la inhibición de una reacción no específica (muestra que se va a evaluar = muestra B) con respecto a F(ab')<sub>2</sub>Suc, Fab'Suc, y Fab'Mal (inhibidores de la reacción no específica de la presente invención) que están modificados con polietilenglicol de 20 kDa, así como F(ab')<sub>2</sub> sin modificar a fines comparativos.

25 La Figura 4 es una gráfica que muestra los efectos de la inhibición de una reacción no específica con respecto a Fab'Mal (inhibidor de reacción no específica de la presente invención) que está modificado con polietilenglicol de 20 kDa, así como IgG y F(ab')<sub>2</sub> a fines comparativos.

La Figura 5 es una gráfica que muestra las reacciones nefelométricas inmunológicas detectadas por los cambios en la absorbancia, con respecto a Fab'Mal (un inhibidor de la reacción no específica de la presente invención) que está modificado con polietilenglicol de 20 kDa, así como IgG sin modificar a fines comparativos.

30 La Figura 6 es una gráfica que muestra la estabilidad del almacenamiento, con respecto a Fab'Mal (un inhibidor de la reacción no específica de la presente invención) que está modificado con polietilenglicol de 20 kDa, así como F(ab')<sub>2</sub> a fines comparativos.

La Figura 7 muestra el resultado de la electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE) del Fab'BSA preparado en el Ejemplo 6.

### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

35 El inhibidor de reacción no específica de la presente invención, es decir, el complejo que se va a usar como inhibidor de reacción no específica en una medición inmunológica de acuerdo con la invención, es un complejo (denominado a partir de ahora en el presente documento anticuerpo modificado con polímero) o un fragmento de un anticuerpo (anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica) o un fragmento del anticuerpo capaz de unirse específicamente a un factor de reacción no específica, y un polímero, como se define en las reivindicaciones.

40 El término "factor de reacción no específica" como se usa en el presente documento significa una sustancia que produce una reacción no específica en un procedimiento de medición inmunológica que utiliza una reacción antígeno-anticuerpo. Más concretamente, los ejemplos del factor, cuando se usa un fluido corporal humano como muestra, incluyen IgM humana, IgG humana, IgA humana, IgE humana, y factores capaces de unirse a estas Ig humanas (por ejemplo, el complemento, factores reumatoides, el receptor Fc, y similares). Los ejemplos cuando se usa un fluido corporal derivado de animales diferentes de seres humanos como muestra incluyen IgM, 45 IgG, IgA, e IgE del animal, y factores capaces de unirse a estas Ig. Un anticuerpo específico de un factor de reacción no específica es, cuando el factor de reacción no específica es un factor de reacción no específica de tipo IgM, un anticuerpo dirigido contra la IgM humana (es decir, un anticuerpo dirigido contra la IgM humana). Cuando el factor es un factor de reacción no específica de tipo IgA, el anticuerpo específico para un factor de reacción no específica en un anticuerpo dirigido contra la IgA humana. Cuando el inhibidor de reacción no específica se añade a un reactivo de medición inmunológica, y se considera que múltiples factores de reacción no específica producen reacciones no específicas (por ejemplo, IgM, IgG, e IgA son factores de reacción no específica), es preferible que se añada una 50 realización del inhibidor de reacción no específica de la presente invención preparado utilizando un anticuerpo dirigido contra IgM, un anticuerpo dirigido contra IgG, y un anticuerpo dirigido contra IgA al reactivo de medición. La presente invención no se limita a las realizaciones en las que el inhibidor de la reacción no específica contiene solo un componente como el anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica.

55 Los ejemplos del procedimiento de medición inmunológica incluyen un procedimiento de medición óptica de aglutinación de látex, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo nefelométrico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, un fluoroinmunoensayo, un radioinmunoensayo, y similares. Se utiliza una reacción antígeno-anticuerpo en todos estos procedimientos y ensayos, y se puede usar un anticuerpo policlonal o un anticuerpo

monoclonal como el anticuerpo utilizado en la detección de un antígeno diana.

El anticuerpo capaz de unirse específicamente a un factor de reacción no específica puede prepararse sometiendo, por ejemplo, un antisuero o plasma obtenido inmunizando un animal con el factor de reacción no específica, un suero de animal normal, un anticuerpo monoclonal específico para el factor de reacción no específica, un anticuerpo recombinante (incluyendo un anticuerpo quimérico) específico del factor de reacción no específica, o similar, para un procedimiento de purificación convencional usado comúnmente. Estos anticuerpos incluyen un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de la clase de anticuerpos varían de acuerdo con el tipo de animal, pero incluyen IgG, IgM, IgA, y similares. Los ejemplos del animal incluyen un conejo, una cabra, un bóvido, un ratón, una rata, un cerdo, un pollo, y similar. Los ejemplos del procedimiento de purificación incluyen, desalación, electroforesis, filtración en gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, y similares.

El fragmento de anticuerpo no está particularmente limitado, siempre que sea una parte del anticuerpo anteriormente mencionado obtenible tratando el anticuerpo con, por ejemplo, una enzima, un agente reductor, o una de sus combinaciones, y se pueda unir con el factor de reacción no específica. El fragmento de anticuerpo puede prepararse mediante un procedimiento conocido, por ejemplo, digestión con una enzima tal como papaína, pepsina, o tripsina, escisión de un enlace disulfuro con un agente reductor, o una de sus combinaciones. Por ejemplo, un anticuerpo (anticuerpo completo) se digirió con papaína para obtener un fragmento Fab y un fragmento Fc. Un anticuerpo se digirió con pepsina para obtener  $F(ab')_2$ , y  $F(ab')_2$  se redujo con un agente reductor (por ejemplo, ditioneitol, 2-mercaptoetanol, TCEP·HCl [clorhidrato de Tris (2-carboxietil)fosfina], 2-mercaptoetilamina, o similar) para obtener un fragmento Fab'. El fragmento Fab' se trató con un reactivo SH tal como yodoacetamida para obtener una cadena L y Fd. Un anticuerpo (anticuerpo completo) se redujo con un agente reductor (por ejemplo, ditioneitol, 2-mercaptoetanol, TCEP·HCl [clorhidrato de Tris (2-carboxietil)fosfina], 2-mercaptoetilamina, o similar) y a continuación, se trató con un reactivo SH tal como yodoacetamida para obtener una cadena L y una cadena H, o rIgG en la que solo se escinde la unión entre las cadenas H.

El fragmento de anticuerpo utilizado en la presente invención no está particularmente limitado, siempre que se pueda unir al factor de reacción no específica. Por ejemplo,  $F(ab')_2$ , Fab', Fab, Fd, una cadena L, una cadena H, y rIgG son fragmentos de anticuerpos que tienen una actividad de unión a antígeno. Se pueden usar otros fragmentos de anticuerpos diferentes de  $F(ab')_2$  y Fab', que se describen concretamente en los ejemplos descritos a continuación, por ejemplo, se pueden utilizar Fab, Fd, una cadena L, una cadena H, o rIgG, como principio activo del inhibidor de reacción no específica de la presente invención uniendo un polímero al anterior mediante un grupo tiol, un grupo amino, o un grupo carboxilo como una diana. En la presente invención es preferible que se utilice Fab' modificado con un polímero como un principio activo del inhibidor de reacción no específica.

Los ejemplos del anticuerpo modificado con polímero (es decir, un complejo de un anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica de la presente invención o un fragmento del mismo y un polímero) usado en el inhibidor de reacción no específica de la presente invención incluye un anticuerpo químicamente modificado preparado mediante modificación química y un anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica o uno de sus fragmentos con un polímero, y un complejo de un anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica o uno de sus fragmentos y un polímero mediante la unión biotina-avidina.

En la modificación química, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo hidroxilo, o un grupo carboxilo del anticuerpo se utiliza como diana, y puede formarse un enlace mediante un "derivado reactivo".

Los ejemplos de un "derivado reactivo" utilizado en la modificación que utilizan un grupo tiol como diana incluyen un compuesto que contiene un grupo reactivo selectivo a tiol, por ejemplo, maleimidas y vinil sulfonas. Además, se puede usar un polímero al cual se une directamente un derivado reactivo, o un agente de reticulación que contiene un derivado reactivo.

Los ejemplos de un "derivado reactivo" utilizado en la modificación que utilizan un grupo amino como diana incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS), ésteres de N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) y similares. Además, se puede usar un compuesto que contiene un grupo aldehído (tal como glutaraldehído) un polímero que contiene previamente un grupo aldehído, o similar.

En la modificación que utiliza un grupo carboxilo como diana, se puede usar, por ejemplo, carbodiimida (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) como catalizador para llevar a cabo la reacción con un grupo amino para obtener el complejo.

En la modificación que utiliza un grupo hidroxilo como diana, se puede usar un compuesto que contiene un derivado de isocianato para preparar el complejo.

Estos polímeros en los que se introduce el derivado reactivo se pueden obtener como un producto comercialmente disponible (por ejemplo, NOF CORPORATION), o se pueden preparar mediante procedimientos químicos convencionales.

La presente invención incluye realizaciones que utilizan, como unión entre el anticuerpo y el polímero, un tipo de enlace que no es un enlace covalente pero que muestra una elevada afinidad, similar a la unión biotina-avidina.

Los ejemplos del polímero que se puede usar en la presente invención incluyen polisacáridos, proteínas, y polímeros orgánicos de peso molecular elevado.

5 Los polisacáridos incluyen, por ejemplo, dextrano, dextrina, agarosa, carboximetil (CM) celulosa, heparina, un almidón soluble, y similares. Se puede usar, por ejemplo, un polisacárido de cadena lineal o un polisacárido de cadena ramificada.

10 Se puede llevar a cabo una modificación de la proteína con polisacáridos mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, oxidación con peryodato, el procedimiento del bromuro de cianógeno, el procedimiento de la carbodiimida, el procedimiento del cloruro de cianuro, el procedimiento de la epíclorohidrina, el procedimiento del reactivo SPDP (propionato de N-succinimidilo 3-[2-piridilditio]), el procedimiento de un éster activo, o similar. Estos polisacáridos en los que se introduce el derivado reactivo se pueden obtener como un producto comercialmente disponible, o se pueden preparar mediante procedimientos químicos convencionales.

15 Las proteínas son complejos en los que múltiples aminoácidos se unen mediante enlaces peptídicos. Las proteínas pueden purificarse a partir de un animal, pueden prepararse mediante ingeniería genética, o pueden prepararse mediante síntesis química como péptidos sintéticos. Los ejemplos de las proteínas incluyen caseína, caseína láctea, gelatina, albúmina recombinante, y similares. Los ejemplos de poli(aminoácidos) incluyen homopolímeros de arginina, lisina, ácido glutámico, o similares, y polímeros aleatorios de lisina y glicina, lisina y serina, o similares. Dicha proteína puede unirse a un anticuerpo, por ejemplo, uniendo un agente de reticulación a una diana tal como un amino, carboxilo, o grupo sulfuro de la proteína, y a continuación uniendo el producto resultante al anticuerpo mediante el agente de reticulación. De forma alternativa, una proteína puede unirse a un anticuerpo utilizando carbodiimida como un catalizador. En la presente invención, es preferible hacer reaccionar un grupo amino de una proteína con un agente de reticulación, tal como EMCS [N-(6-maleimidocaproyloxi)succinimida; dojin] o SMCC [carbonato de succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano; dojin] y hacer reaccionar adicionalmente el agente de reticulación con un grupo sulfuro de un fragmento de antígeno. La proteína en la que se introduce el derivado reactivo, que se puede usar en la preparación del inhibidor de reacción no específica de la presente invención, puede obtenerse como un producto comercialmente disponible, o puede prepararse mediante procedimientos químicos convencionales.

20 Los ejemplos de polímeros orgánicos de alto peso molecular incluyen polietilenglicol, alcohol polivinílico, alcohol poliacrílico, polietilenimina, poli(metacrilato de metilo), ácido poliacrílico, polialilamina, y polisacáridos. Se puede usar un polímero orgánico de alto peso molecular de cadena lineal o un polímero de alto peso molecular de cadena ramificada o un copolímero aleatorio que consiste en múltiples tipos de monómeros. Se puede usar un polímero sintético que tiene una estructura esférica tal como un dendrímero. Se puede usar un polímero sintético o un polímero natural.

30 Polietilenglicol es un polímero que tiene una estructura básica en la que se polimeriza etilenglicol. Polietilenglicol puede unirse a un anticuerpo utilizando un grupo funcional introducido en un grupo hidroxilo de polietilenglicol. La activación de la unión del polietilenglicol a un anticuerpo puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, cloruro de cianuro, carbodiimidazol, N-hidroxisuccinimida, o carbodiimida. Se puede usar un producto comercialmente disponible como el polietilenglicol al cual se introduce un grupo funcional. Puede llevarse a cabo una preparación eficaz usando polietilenglicol comercialmente disponible en el cual se introduce un grupo maleimida, succinimida, amino, o sulfuro. Es preferible polietilenglicol en el cual se introduce un grupo maleimida o succinimida debido a su buena eficacia de unión con un anticuerpo. Se puede usar, por ejemplo, un polietilenglicol de cadena lineal o un polietilenglicol de cadena ramificada. Se puede usar el polietileno en el cual se sustituye una de sus partes con otra estructura química, o el polietileno modificado con otro polímero o compuesto.

35 Una modificación química con polímeros orgánicos de alto peso molecular diferentes que el polietilenglicol se puede llevar a cabo enlazándolos a un anticuerpo mediante un grupo funcional introducido en el polímero orgánico de alto peso molecular, similar a la modificación química con polietilenglicol. Cuando se usan polímeros orgánicos de alto peso molecular que contienen un derivado reactivo, no se necesita de forma necesaria la introducción de un nuevo grupo funcional en una etapa de preparación. En la presente invención, es preferible usar un polímero en el cual se introduce un grupo maleimida, succinimida, amino, o sulfuro. Se pueden obtener polímeros orgánicos de alto peso molecular en los que se introduce un derivado reactivo como un producto comercialmente disponible, o se pueden preparar mediante procedimientos químicos convencionales.

45 El tamaño molecular de los polímeros orgánicos de alto peso molecular no está particularmente limitado, pero su peso molecular promedio es generalmente de aproximadamente 200 Da a 1000 kDa, por ejemplo, 1 kDa a 1000 kDa, preferentemente 10 kDa a 100 kDa. El peso molecular promedio del polietilenglicol es preferentemente de 20 kDa a 200 kDa. El tamaño molecular puede seleccionarse aproximadamente de acuerdo con el tipo del polímero, a la vista de la hidrofiliidad, la estructura tridimensional, el efecto de inhibir una reacción no específica, o similar.

50 Se puede usar el inhibidor de la reacción no específica añadiendo el anticuerpo modificado por el polímero (por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra el factor de reacción no específica modificado con polímero o uno de sus fragmentos) como el principio activo de un sistema de medición inmunológica. Más en concreto, se preparó una solución que contiene un fragmento modificado de un anticuerpo específico para un factor de reacción no específica;

se añadió la solución a una muestra para hacer reaccionar el anticuerpo con el factor de reacción no específica antes de que un anticuerpo específico de un antígeno que se va a medir se haga reaccionar con el antígeno; y pueda inhibirse la reacción no específica producida por el factor de reacción no específica. Alternativamente, se añadió un fragmento modificado de un anticuerpo específico de un factor de reacción no específica a una solución que contenía un anticuerpo específico para un antígeno que se va a medir; se añadió la solución a una muestra para hacer reaccionar el factor de reacción no específica con el anticuerpo específico del factor; y pueda inhibirse la reacción no específica producida por el factor de reacción no específica.

Los ejemplos de reactivo de medición inmunológica incluyen elastasa, cistatina C, sEs (selectina E soluble), SF (fibrina soluble), PC (proteína C), PPI (inhibidor de plasmina-plasmina, cTn (trombomodulina), mioglobina, CK-MB, BNP (péptido natriurético de tipo B), AFP (( $\alpha$ -fetoproteína),  $\beta$ 2m ( $\beta$ -2-microglobulina), CEA (antígeno carcinoembrionario), ferritina, CA19-9 (antígeno 19-9 de hidratos de carbono), PAP (fosfatasa ácida prostática, PSA (antígeno específico de próstata), CRP (proteína reactiva C), Mb (mioglobina), RF (factor reumatoide), ASO (antiestreptolisina-O), FDP (productos de degradación de la fibrina, AT III (antitrombina III), plasminógeno,  $\alpha$ 2PI (inhibidor de la plasmina  $\alpha$ -2), dímero D (dímero del fragmento D de los productos de degradación de la fibrina), IgG (inmunoglobulina G), IgA (inmunoglobulina A), IgM (inmunoglobulina M), IgE (inmunoglobulina E), C3 (el tercer componente del complemento), C4 (el cuarto componente del complemento), albúmina urinaria, hCG (gonadotropina coriónica humana), hPL (lactógeno placentario humano), insulina, antígeno HBs (antígeno superficial de la hepatitis B) anticuerpo Hbs (anticuerpo dirigido contra el antígeno superficial de la hepatitis B, anticuerpo HBc (anticuerpo dirigido contra el antígeno nuclear de la hepatitis B), anticuerpo HCV (anticuerpo dirigido contra el virus de la hepatitis C), Treponema (anticuerpo dirigido contra Treponema pallidum, TSH (hormona estimuladora del tiroides), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona estimuladora del folículo, digoxina, digitoxina, quinidina, procinamida, NAPA (N-acetilprocainamida), teofilina, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, ácido valproico, etosuccinimida, gentamicina, tobramicina, amikacina, vancomicina, ciclosporina A, B12 (vitamina B12), ácido fólico, T3 (triyodotironina), T4 (tiroxina), y estrógeno.

## 25 Ejemplos

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, pero esto no significa que esté limitada a los mismos.

### Ejemplo 1

[Objeto]

30 Los factores dirigidos contra la reacción no específica tales como IgG o  $F(ab')_2$  muestran un fuerte efecto de inhibición de una reacción no específica, pero el efecto de Fab' es débil. Como causa, se consideraron

(1) la posibilidad de que múltiples sitios de reconocimiento de antígeno sean necesarios en una molécula para mostrar el efecto de inhibir una reacción no específica, y

(2) la posibilidad de que el tamaño molecular de un inhibidor de reacción no específica influya sobre el efecto inhibidor. Este Ejemplo se llevó a cabo para examinar esta hipótesis. Si una molécula que tiene un único sitio de reconocimiento de antígeno (tal como Fab') presenta el efecto de inhibir una reacción no específica, se puede negar la posibilidad de (1). Se puede someter a ensayo la posibilidad de (2) preparando diversos polímeros que tienen un tamaño molecular diferente y examinando el efecto de inhibición de una reacción no específica.

[Procedimientos]

40 Para evaluar el efecto de inhibición de una reacción no específica mediante la modificación con polietilenglicol, se utilizó un fragmento (Fab') de una IgG específica de una IgM humana para preparar un Fab' modificado con polietilenglicol (denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'Mal). Se llevó a cabo la modificación con polietilenglicol uniendo una molécula de polietilenglicol a una molécula de Fab' mediante el grupo tiol contenido en la región bisagra del Fab'. Se usó esta forma de modificación para evitar el enlace del polietilenglicol con el sitio de reconocimiento del antígeno del Fab'. Se seleccionó un Fab' de conejo, y se utilizó polietilenglicol que tenía un grupo maleimida en el extremo de un único lado como un modificador. Además, para examinar las diferencias en el efecto de inhibición de una reacción no específica producida por la longitud (peso molecular) del polietilenglicol utilizado en la modificación, se utilizaron polietilenglicoles que tenían una longitud de 2 kDa, 5 kDa, 12 kDa, 20 kDa, o 30 kDa como un modificador para preparar múltiples Fab'Mal que tenían diversos pesos moleculares. Como control negativo, se utilizó Fab' en el que se bloqueó el grupo tiol con N-etilmaleimida para evitar una reacción inversa de Fab' a  $F(ab')_2$  (denominada a partir de ahora en el presente documento Fab' bloqueado con un grupo tiol). Con respecto al Fab' bloqueado con un grupo tiol, Fab'Mal de 2 kDa, Fab'Mal de 5 kDa, Fab'Mal de 12 kDa, Fab'Mal de 20 kDa, y Fab'Mal de 30 kDa, se evaluaron sus efectos de inhibición sobre una reacción no específica.

[Preparación de Fab'Mals]

55 Una IgG de anticuerpo policlonal de conejo dirigida contra IgM humana (de fabricación artesanal) se digirió con pepsina para preparar  $F(ab')_2$ . El  $F(ab')_2$  resultante se ajustó a 5 mg/ml utilizando un tampón de tris(hidroximetil)aminometano 200 mmol/l (pH 8,2) que contenía 150 mmol/l de NaCl. Se redujo  $F(ab')_2$  con 10 mmol/l

de 2-mercaptoetilamina a 37 °C durante 30 minutos, y se sometió a filtración en gel utilizando un tampón fosfato 50 mmol (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA como tampón de análisis, para recoger una fracción de Fab'. A una solución de 5 mg/ml de Fab', se añadió polietilenglicol de 30 kDa que tenía un grupo maleimida (fabricado por NOF CORPORATION) para llevar a cabo la reacción a 4 °C durante 4 horas agitando a la vez. El líquido de reacción resultante se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de Fab'Mal, que se concentró a aproximadamente 5 mg/ml. De una manera similar, se prepararon Fab'Mals que tenía un peso molecular de 2 kDa, 5 kDa, 12 kDa, o 20 kDa.

[Preparación del Fab' bloqueado con un grupo tiol]

Una IgG de anticuerpo policlonal de conejo dirigida contra IgM humana (de fabricación artesanal) se digirió con pepsina para preparar F(ab')<sub>2</sub>. El F(ab')<sub>2</sub> resultante se ajustó a 5 mg/ml utilizando un tampón de 200 mmol/l de tris(hidroximetil)aminometano (pH 8,2) que contenía 150 mmol/l de NaCl. Se redujo F(ab')<sub>2</sub> con 10 mmol/l de 2-mercaptoetilamina a 37 °C durante 30 minutos, y se sometió a filtración en gel utilizando 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA como tampón de análisis, para recoger una fracción de Fab'. A una solución de 5 mg/ml de Fab', se añadieron 5 mmol/l de N-etilmaleimida (fabricado por Sigma-Aldrich Corporation) para llevar a cabo la reacción a 4 °C durante 4 horas agitando a la vez. El líquido de reacción resultante se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de Fab' bloqueada con un grupo tiol que se concentró hasta aproximadamente 5 mg/ml.

El resultado de SDS-electroforesis en gel de poli(acrilamida)-(SDS-PAGE) de Fab'Mals resultante y del Fab' bloqueado con un grupo se muestra en la Figura 1. En la figura 1, los marcadores, Fab' bloqueado con un grupo tiol, Fab'Mal de 30 kDa, Fab'Mal de 20 kDa, Fab'Mal de 12 kDa, Fab'Mal de 5 kDa, Fab'Mal de 2 kDa, y se muestran los marcadores (de la banda izquierda).

[Condiciones de ensayo para evaluar los efectos de los inhibidores de reacción no específica]

Se examinaron los efectos de los Fab'Mal y del Fab' bloqueado con un grupo tiol sobre la inhibición de la reacción no específica mediante un procedimiento de medición óptica con aglutinación de látex. Se utilizó un dímero D como antígeno medido, y se utilizaron dos tipos de muestras (muestra A y nuestra B) como muestras que se van a evaluar. Las muestras eran muestras de plasma humano caracterizadas por que la reacción no específica como se ha descrito anteriormente se produce en la medición utilizando un reactivo para medir un dímero D (LPIA-ACE D-dímero II; Mitsubishi Chemical Medience Corporation) y la sustancia de la reacción no específica es una IgM. La medición se llevó a cabo mediante procedimientos automatizados utilizando un analizador automático HITACHI 7170 (fabricado por Hitachi High-Technologies Corporation). La medición utilizando HITACHI 7170 se compuso principalmente de dos etapas. En la primera etapa, las muestras que se iban a medir se diluyeron con un primer reactivo (denominado a partir de ahora en el presente documento R1) para preparar una solución de reacción. En la segunda etapa, a esta solución de reacción se añadió un segundo reactivo (denominado en el presente documento R2) caracterizado por contener partículas de látex sobre las cuales se había inmovilizado un dímero D, para generar una reacción de aglutinación del látex. Esta reacción de aglutinación se vigiló ópticamente para cuantificar el dímero D o el factor de reacción no específica contenido en las muestras que se van a evaluar. En este ejemplo, cada uno de los Fab'Mal o el Fab' bloqueado con el grupo tiol se añadió a R1 para absorber la sustancia de reacción no específica en la primera etapa. Esta adición a R1 se llevó a cabo de tal manera que la concentración de cada uno de los Fab'Mals o el Fab' bloqueado con un grupo tiol llegó a ser de 100 mg/l. Los Fab'Mal y el Fab' bloqueado con un grupo tiol utilizado en este ejemplo se había sometido a cromatografía de afinidad para eliminar componentes capaces de reaccionar con productos de degradación de la fibrina (incluyendo el dímero D). La muestra que se va a medir, R1, y R2 se mezclaron en una relación de 7 µl:125 µl:125 µl. Se detectó la aglutinación del látex a una longitud de onda de 800 nm. Se calcularon los valores de la medición a partir de las absorbancias, utilizando una curva de calibración preparada midiendo el dímero D a concentraciones conocidas.

[R2 para medir el dímero D]

Se utilizó un reactivo de látex contenido en un reactivo de diagnóstico in vitro (LPIA-ACE dímero-d ii; distribuido por Mitsubishi Chemical Medience Corporation) como el reactivo R2. Este producto contiene como componente insoluble soportes a los que se une un anticuerpo monoclonal específico del dímero D mediante un enlace químico.

[Resultados]

En la Tabla 1 se muestra el resultado. Como se muestra en la Tabla 1, todos los Fab'Mal presentaron el efecto de inhibir la reacción no específica. El efecto de los Fab'Mal era dependiente del peso molecular, y se encontró en la modificación con polietilenglicol que polietilenglicol que tenía un peso molecular mayor tenía un efecto de inhibir la reacción no específica superior.

Tabla 1

Muestra	SH-blk	Fab'Mal					
	Fab'	2 KD	5 KD	12 KD	20 KD	30 KD	Sin añadir
A ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	7,08	2,95	1,18	0,90	1,09	0,85	8,52
B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	20,28	18,13	7,79	0,26	0,06	0,04	17,66

(SH-blk Fab': Fab' bloqueado con un grupo tiol)

## Ejemplo 2

[Objeto]

- 5 El resultado del ejemplo 1 reveló que un Fab' que tiene un único sitio para el reconocimiento del antígeno muestra el efecto de inhibir una reacción no específica mediante la modificación con polietilenglicol. El efecto aumenta cuando el polietilenglicol utilizado en la modificación tiene un peso molecular mayor. Se llevó a cabo este Ejemplo para examinar si el efecto estaba o no aumentado modificando los fragmentos de anticuerpos con un polímero en comparación con un fragmento de anticuerpo sin modificar.

10 [Procedimientos]

- F(ab')<sub>2</sub> específicos de un factor de reacción no específica se modificaron químicamente con polietilenglicol de 20 kDa que tenía un grupo succinimida en el extremo de un lado para preparar un F(ab')<sub>2</sub> modificado con polietilenglicol [denominado a partir de ahora en el presente documento F(ab')<sub>2</sub>Suc]. De forma similar, el Fab' bloqueado con el grupo tiol se modificó químicamente con el mismo polietilenglicol para preparar un producto modificado (denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'Suc). Con respecto al efecto inhibitorio, F(ab')<sub>2</sub>Suc, Fab'Suc, y Fab'Mal de la presente invención se compararon con F(ab')<sub>2</sub>. A este respecto, estos fragmentos de anticuerpo o fragmentos de anticuerpo químicamente modificados utilizados en este Ejemplo se prepararon a partir del mismo lote de anticuerpo.

[Preparación de F(ab')<sub>2</sub>Suc y Fab'Suc]

- 20 Una IgG de anticuerpo policlonal de conejo dirigida contra IgM humana (de fabricación artesanal) se digirió con pepsina para preparar F(ab')<sub>2</sub>. El Fab' bloqueado con un grupo tiol se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El F(ab')<sub>2</sub> resultante y el Fab' bloqueado con un grupo tiol se dializaron utilizando un tampón fosfato de 50 mmol/l (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA como fluido externo. A una solución de 5 mg/ml de Fab' bloqueado con un grupo tiol o F(ab')<sub>2</sub>, se añadió polietilenglicol de 20 kDa que tenía un grupo succinimida (fabricado por NOF CORPORATION) para llevar a cabo la reacción a 4 °C durante 12 horas agitando a la vez. El líquido de la reacción resultante se sometió a filtración en gel para recoger las fracciones F(ab')<sub>2</sub>Suc y Fab'Suc de interés, que se concentraron a aproximadamente 5 mg/ml.

[Condiciones de ensayo para evaluar los efectos de los inhibidores de reacción no específica]

- 30 En las mismas condiciones de ensayo descritas en el Ejemplo 1, los fragmentos de anticuerpo modificados con polietilenglicol se compararon con F(ab')<sub>2</sub> sin modificar para examinar el efecto de inhibición de la reacción no específica. En este Ejemplo, se evaluó el efecto usando R1 suplementado con cada inhibidor de reacción no específica a una concentración final de 0 mg/l, 20 mg/l, 50 mg/l, o 100 mg/l. Como muestras a evaluar, se utilizaron las mismas muestras A y B que las utilizadas en el Ejemplo 1.

[Resultados]

- 35 Los resultados se muestran en la Figura 2 (muestra A) y en la Figura 3 (muestra B). Como se muestra en la Figura 2, se encontró que F(ab')<sub>2</sub>Suc, Fab'Suc, y Fab'Mal, que se modificaron con polietilenglicol de 20 kDa, presentaron un efecto notablemente aumentado de inhibición de la reacción no específica, en comparación con F(ab')<sub>2</sub> sin modificar.

## Ejemplo 3

[Objeto]

- 40 Como se muestra en los resultados del Ejemplo 2, se descubrió que un fragmento de anticuerpo modificado con polietilenglicol presentó un efecto notablemente potenciado de inhibición de una reacción no específica, en comparación con un fragmento de anticuerpo sin modificar. El objeto de este Ejemplo es aclarar los efectos de la presente invención comparando la presente invención con la adición de la IgG como técnica anterior.

[Procedimientos]

Con respecto al efecto inhibitor, Fab'Mal de 20 kDa, IgG, y F(ab')<sub>2</sub> se compararon entre sí. Estas tres sustancias se prepararon a partir del mismo lote de IgG.

[Condiciones de ensayo para evaluar los efectos de los inhibidores de reacción no específica]

- 5 En las mismas condiciones de ensayo descritas en el Ejemplo 1, se examinó el efecto de inhibición de una reacción no específica. En este Ejemplo 3, se utilizó R1 suplementado con cada uno de IgG, F(ab')<sub>2</sub>, o Fab'Mal de 20 kDa a una concentración de 50 mg/l para el examen.

[Resultados]

- 10 En la Figura 4 se muestra el resultado. Como se muestra en la Figura 4, se encontró que Fab'Mal modificado con el polímero presentó un efecto notablemente aumentado de inhibición de una reacción no específica en comparación con IgG y F(ab')<sub>2</sub>. Este resultado muestra que la presente invención es superior a al menos la IgG sin modificar como técnica anterior en el efecto de inhibición de una reacción no específica.

**Ejemplo 4**

[Objeto]

- 15 Se ha descubierto que una realización del inhibidor de reacción no específica, Fab'Mal, era muy eficaz en la inhibición de una reacción no específica en comparación con la IgG y F(ab')<sub>2</sub>. El siguiente Ejemplo se llevó a cabo para examinar una reacción inmunológica nefelométrica que era un problema en la técnica anterior.

[Procedimientos]

- 20 Una reacción inmunológica nefelométrica tiende a aparecer cuando un antígeno y un anticuerpo específico del anterior coexisten a elevadas concentraciones. En este ejemplo, se utilizó una IgM humana (de fabricación artesanal) como antígeno, y se utilizó Fab'Mal de 20 kDa como sustancia correspondiente a un anticuerpo. Se añadieron IgG o Fab'Mal a R1 del agente para medir un dímero D a una concentración de 200 mg/l. Como muestras a medir, se utilizaron muestras que contenían una IgM humana a concentraciones en un intervalo de 0,99 mg/ml a 5,9 mg/ml, como se muestra en la Figura 5. Se sabe que un nivel de IgM en personas sanas está comprendido generalmente en un intervalo de 1,00 mg/ml a 1,5 mg/ml. Se llevó a cabo este ejemplo en un intervalo posible de un nivel de IgM en la medición de una muestra de plasma o suero humano. Se midió ópticamente la influencia de la reacción inmunológica nefelométrica a una longitud de onda de 800 nm utilizando HITACHI 7170.

[Condiciones de ensayo para evaluar la reacción inmunológica nefelométrica]

- 30 Cada muestra, R1, y R2 se hicieron reaccionar en una relación de 10 µl:180 µl:180 µl, y se midió un aumento en la absorbancia detectada a una longitud de onda de 800 nm utilizando HITACHI 7170.

[Resultados]

- En la Figura 5 se muestra el resultado, que muestra cambios en la absorbancia entre la mezcla de cada muestra con el líquido R1 y el punto inmediatamente anterior a la adición del líquido R2. En estas condiciones, se puede juzgar que se produce una reacción inmunológica nefelométrica cuando se observa un aumento en la absorbancia.
- 35 Los presentes inventores confirmaron que no se observó un aumento en la absorbancia incluso cuando se utilizó Fab'Mal a una elevada concentración de 800 mg/l.

**Ejemplo 5**

[Objeto]

- 40 Se descubrió en el ejemplo 4 que una reacción inmunológica nefelométrica no se producía fácilmente cuando se utilizaba Fab'Mal. En este Ejemplo, se examinó la estabilidad en almacenamiento de la presente invención.

- Una molécula de F(ab')<sub>2</sub> se degrada a dos moléculas de Fab'. En particular, cuando se añade F(ab')<sub>2</sub> a R1 y se almacena como mezcla, F(ab')<sub>2</sub> se degrada fácilmente a Fab', y este fenómeno supone un problema. Esto es porque Fab' presenta un efecto débil de inhibición de una reacción no específica, y de esta manera, se observó un aumento gradual en los valores medidos cuando se midió una muestra que produjo una reacción no específica. En el ejemplo 5, se examinó el efecto de inhibición de una reacción no específica tras el almacenamiento a 37 °C para aclarar la estabilidad en almacenamiento de Fab'Mal. En general, se lleva a cabo un almacenamiento adecuado de un reactivo para la medición inmunológica a 4 °C. Cuando se almacena un reactivo a 37 °C, se puede observar inicialmente una disminución en el efecto de inhibición de una reacción no específica en comparación con el almacenamiento a 4 °C. Esto es porque la degradación a Fab' se acelera fácilmente a 30 °C a 40 °C. Además, a este intervalo de temperatura F(ab')<sub>2</sub> está sujeto a factores de más importancia para promover la degradación a Fab', tal como un

factor similar a proteasa o una reacción de oxidación reducción. En este Ejemplo, se examinó la estabilidad de Fab'Mal seleccionando las condiciones de almacenamiento a 37 °C lo que promovió de forma notable la degradación de F(ab')<sub>2</sub> y produjo realmente el deterioro del reactivo.

[Procedimientos]

- 5 Se preparó un reactivo R1 suplementado con F(ab')<sub>2</sub> o Fab'Mal para examinar el efecto de inhibición de una reacción no específica tras el almacenamiento del reactivo R1 a 37 °C. Se evaluó el efecto inhibitor mediante medición utilizando la muestra A.

[Condiciones de ensayo para evaluar la estabilidad en almacenamiento]

- 10 Se preparó R1 suplementado con 200 mg/l de F(ab')<sub>2</sub> o Fab'Mal para examinar las diferencias tras el almacenamiento a 37 °C.

En este ejemplo, se almacenaron los reactivos R1 a 37 °C durante 17 días, y se llevó a cabo la medición de la muestra A en el día 0, día 5, día 10, y día 17. Se llevó a cabo la medición de la muestra A utilizando HITACHI 7170 en condiciones similares a las descritas en el Ejemplo 1.

[Resultados]

- 15 En la Figura 6 se muestra el resultado. Como se muestra en la Figura 6, cuando se añadió F(ab')<sub>2</sub> a R1 y se almacenó a 37 °C, se aumentaron gradualmente los valores obtenidos midiendo la muestra A. Por el contrario, con respecto a Fab'Mal, no se observó un aumento en los valores medidos hasta el día 17. Este resultado dejó claro que Fab'Mal presentó una elevada estabilidad en almacenamiento, en comparación con F(ab')<sub>2</sub>, que muestra una baja estabilidad.

## 20 **Ejemplo 6**

[Objeto]

Para examinar una realización diferente de Fab'Mal, se preparó un complejo (denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'BSA) en el que BSA se une a Fab' mediante el grupo tiol contenido en la región bisagra para examinar el efecto de inhibición de la reacción no específica.

- 25 [Procedimientos]

Un reactivo de reticulación que tiene un grupo maleimida y un grupo succinimida, EMCS (fabricado por DOJIN), se hizo reaccionar con BSA mediante grupos amino localizados sobre la superficie de BSA. El BSA modificado con EMCS resultante se unió a Fab'. Se midió el efecto inhibitor de una manera similar a la descrita en el ejemplo 1, excepto que se utilizó R1 suplementado con Fab'BSA a una concentración de 0 mg/l, 33 mg/l, 66 mg/l, o 133 mg/l.

- 30 [Preparación de Fab'BSA]

- 35 A una solución de BSA (5 mg/ml) preparada disolviendo BSA (fabricado por SIGMA) en 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA, se añadió EMCS (DOJIN) hasta llegar a una concentración de 5 mmol/l. Se incubó una mezcla a 37 °C durante 1 hora, y se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de BSA. Como tampón de análisis para la filtración en gel, se utilizaron 200 mmol/l de tampón Tris (pH 8,2) que contenía 150 mmol/l de NaCl. Se preparó Fab' a partir de un anticuerpo dirigido contra la IgM humana de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El BSA modificado con EMCS se mezcló con 5 mg/ml de Fab', y se hizo reaccionar a 4 °C durante 16 horas agitando a la vez. El líquido de reacción se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de Fab'BSA de interés, que se concentró a aproximadamente 5 mg/ml. Como tampón de análisis para la filtración en gel, se utilizaron 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contiene 5 mmol/l de EDTA.

- 40 En la Figura 7 se muestra el resultado de la SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de Fab'BSA resultante. En la Figura 7, se muestran Fab'BSA, Fab'BSA, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', y los marcadores (de la banda izquierda).

[Resultados]

- 45 Como se muestra en la tabla 2, una realización de la presente invención, Fab'BSA, presentó el efecto de inhibir una reacción no específica de una manera dependiente de la concentración. Quedó claro a partir de este resultado que el efecto inhibitor no era específico de polietilenglicol, y que se obtuvo el mismo efecto cuando se unió BSA a Fab'.

Tabla 2

Fab'BSA	0 mg/l	33 mg/l	66 mg/l	133 mg/l
Muestra A	10,26	4,96	2,16	1,01

**Ejemplo 7**

## [Objeto]

Para examinar una realización diferente de Fab'Mal y Fab'BSA, se preparó un complejo (denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'PG) en el que se unió ácido poliglutámico a Fab' mediante el grupo tiol contenido en la región bisagra del Fab' para examinar el efecto de inhibición de la reacción no específica.

## [Procedimientos]

Un reactivo de reticulación que tiene un grupo maleimida y un grupo succinimida, EMCS (fabricado por DOJIN), se hizo reaccionar con ácido poliglutámico mediante el grupo amino del extremo amino del ácido poliglutámico. El ácido poliglutámico modificado con EMCS resultante se unió a Fab'. Se midió el efecto inhibitor de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó R1 suplementado con Fab'PG a una concentración de 0 mg/l, 5 mg/l, 50 mg/l, o 100 mg/l.

## [Preparación de Fab'PG]

A una solución de 5 mg/ml de ácido poliglutámico preparada disolviendo ácido poliglutámico (fabricado por y adquirido de SIGMA) que tiene un peso molecular de 15 kDa a 50 kDa en 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA, se añadió EMCS (Dojin) hasta llegar a una concentración de 5 mmol/l. Se incubó una mezcla a 37 °C durante 1 hora, y se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de ácido poliglutámico. Como tampón de análisis para la filtración en gel, se utilizaron 200 mmol/l de tampón Tris (pH 8,2) que contenía 150 mmol/l de NaCl. Se preparó Fab' a partir de un anticuerpo dirigido contra la IgM humana de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y se ajustó a una concentración de 5 mg/ml utilizando 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contenía 5 mmol/l de EDTA. El ácido poliglutámico modificado con EMCS se mezcló con Fab', y se hizo reaccionar a 4 °C durante 16 horas agitando a la vez. El líquido de reacción se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de Fab'PG de interés, que se concentró a aproximadamente 5 mg/ml. Como tampón de análisis para la filtración en gel, se utilizaron 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contiene 5 mmol/l de EDTA.

## [Resultados]

En la Tabla 3 se muestra el resultado. Como se muestra en la tabla 3, una realización de la presente invención, Fab'PG, presentó el efecto de inhibir una reacción no específica de una manera dependiente de la concentración. Quedó claro a partir de este resultado que el efecto inhibitor adquirido no era específico de polietilenglicol y BSA, y que se obtuvo el mismo efecto cuando se unió ácido poliglutámico a Fab'.

Tabla 3

	0 mg/l	25 mg/l	50 mg/l	100 mg/l
Muestra D	16,05	7,74	1. 91	1,01
Muestra B	19,14	7,79	6,62	3,83

**Ejemplo 8**

## [Objeto]

Para examinar una realización diferente de Fab'Mal, Fab'BSA y Fab'PG, se preparó un complejo (denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'DX) en el que se unió un polisacárido a Fab' mediante el grupo tiol contenido en la región bisagra del Fab' para examinar el efecto de inhibición de la reacción no específica.

## [Procedimientos]

Se usó un dextrano activado comercialmente disponible en el que alguno de los grupos funcionales se convirtieron en grupos aldehído, ya cada grupo aldehído se unió al grupo amino del Fab' bloqueado con el grupo tiol para preparar Fab'DX. Se midió el efecto inhibitor de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó R1 suplementado con Fab'DX a una concentración de 0 mg/l, 27 mg/l, 53 mg/l, 80 mg/l, 101 mg/l, 133 mg/l, o 195 mg/l.

## [Preparación de Fab'DX]

Se adquirió un kit de acoplamiento (fabricado por Pierce) que contenía dextrano activado que tenía un peso molecular de 40 kDa, y se llevó a cabo un acoplamiento con Fab' de acuerdo con un protocolo recomendado. El Fab' bloqueado con un grupo tiol se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Después se mezclaron 10 mg de dextrano activado (disuelto en un tampón fosfato a una concentración de 5 mg/ml), 5 mg del Fab' bloqueado con un grupo tiol (disuelto en un tampón fosfato a una concentración de 5 mg/ml), y 0,4 ml de una solución de un cianoborohidruro y se hicieron reaccionar a 37 °C durante 24 horas agitando a la vez, se añadió 1 mol/l de tampón Tris (pH 7,2) a la mezcla a una concentración final de Tris de 200 mmol/l y se hizo reaccionar a

37 °C durante 1 hora. El líquido de reacción resultante se sometió a filtración en gel para recoger una fracción de Fab'DX de interés, que se concentró a aproximadamente 5 mg/ml. Como tampón de análisis para la filtración en gel, se utilizaron 50 mmol/l de tampón fosfato (pH 6,0) que contiene 5 mmol/l de EDTA.

[Resultados]

- 5 En la Tabla 4 se muestra el resultado. La unidad de valores medidos del dímero D que se muestra en la tabla 4 es µg/ml. Como se muestra en la tabla 4, una realización de la presente invención, Fab'DX, presentó el efecto de inhibir una reacción no específica de una manera dependiente de la concentración. Quedó claro a partir de este resultado que el efecto inhibitorio adquirido no era específico de polietilenglicol, BSA, y ácido poliglutámico, y que se obtuvo el mismo efecto cuando se unió dextrano a Fab'. Con respecto a un procedimiento de enlace, se confirmó
- 10 que se obtuvo el efecto inhibitorio uniendo un polímero a un grupo amino de Fab' como diana.

Tabla 4

	0 mg/l	27 mg/l	53 mg/l	80 mg/l
Muestra D	15,46	11,11	7,26	5,17
Muestra B	19,09	14,49	15,81	16,27
	101 mg/l	133 mg/l	195 mg/l	
Muestra D	3,80	2,87	1,99	
Muestra B	16,43	16,51	16,22	

### Ejemplo 9

[Objeto]

- 15 Se llevaron a cabo los ejemplos 1 a 8 con respecto a una reacción no específica producida por IgM. En este ejemplo, se examinó el efecto de la presente invención sobre una reacción no específica producida por IgA. Como inhibidor de reacción no específica, se utilizó un complejo de fragmento de anticuerpo [denominado a partir de ahora en el presente documento Fab'(L)Mal] preparado a partir de un anticuerpo que tenía una afinidad por una cadena L humana se modificó con polietilenglicol. La cadena L de inmunoglobulinas humanas se incluyó comúnmente como
- 20 un dominio constitutivo en IgG, IgM, IgA, e IgE, y de esta manera, un anticuerpo capaz de unirse con la cadena L humana puede unirse con cualquier tipo de inmunoglobulinas incluyendo IgG, IgM, IgA, e IgE. Por tanto, se espera que un anticuerpo dirigido contra la cadena L humana pueda inhibir cualquier reacción no específica producida por IgM, IgG, IgA, o similar. El objeto de este Ejemplo era mostrar las realizaciones que utilizan un anticuerpo diferente que un anticuerpo dirigido contra IgM, y confirmar que el efecto inhibitorio de un fragmento modificado del anticuerpo se aumentó modificando el fragmento de anticuerpo con polietilenglicol.
- 25

[Procedimientos]

- Se preparó Fab'(L)Mal a partir de Fab' de un anticuerpo dirigido contra la cadena L humana, de una manera similar al procedimiento de preparación de Fab'Mal descrito en el Ejemplo 1. Se examinó el efecto inhibitorio de Fab'(L)Mal para una muestra no específica de tipo IgA comparándola con el efecto de un fragmento de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> utilizado en la preparación de Fab'(L)Mal. Se utilizó un reactivo para el dímero D como reactivo de medición, y se compararon los efectos de la reacción no específica entre sí añadiendo cada proteína de anticuerpo a una concentración de 50 mg/l de R1 contenido en el agente. Como muestra a medir, se usó la muestra E en la que se produjo una reacción no específica producida por IgA.
- 30

[Resultados]

- 35 En la Tabla 5 se muestra el resultado. La unidad de valores medidos del dímero D que se muestra en la tabla 5 es µg/ml. Con respecto a la muestra E, una realización de la presente invención, Fab'(L)Mal, presentó el efecto de inhibir la reacción no específica. Se descubrió que Fab'(L)Mal presentó un efecto inhibitorio notablemente elevado, en comparación con la misma cantidad de proteína de F(ab')<sub>2</sub>. Se encontró en este Ejemplo que incluso esta realización de la presente invención preparada a partir de un anticuerpo diferente de un anticuerpo dirigido contra IgM fue eficaz
- 40 en la inhibición de una reacción no específica. Se confirmó que esta realización presentó un efecto inhibitorio mayor que el de la técnica anterior. Se determinó el valor verdadero del dímero D contenido en la muestra E poniendo la muestra en contacto con el anticuerpo dirigido contra IgA para eliminar el factor anticuerpo de la reacción no específica de la muestra, y midiendo a continuación el valor del dímero D.

Tabla 5

	No se añadió	50 mg/l de F(ab') <sub>2</sub>	50 mg/l de Fab'(L)	MalValor
Muestra E	49,49	12,96	1,88	1,90

**Aplicabilidad industrial**

- 5 El inhibidor de reacción no específica de la presente invención puede aplicarse a un uso en una medición inmunológica.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un complejo de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a un factor de reacción no específica, y un polímero, como inhibidor de reacción no específica en una medición inmunológica, en el que el factor de reacción no específica se selecciona entre el grupo que consiste en IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, el complemento, factores reumatoides, y el receptor Fc.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero es un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en un polisacárido, una proteína y un polímero orgánico de elevado peso molecular.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que el polímero orgánico de elevado peso molecular es polietilenglicol.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el peso molecular del polímero es de 1 kDa a 1000 kDa.
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el fragmento del anticuerpo es F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fd, una cadena L, una cadena H, o rIgG.
- 15 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que la unión del anticuerpo o de un fragmento del mismo al polímero es una modificación química que utiliza un grupo tiol, amino, hidroxilo, o carboxilo, o una unión biotina-avidina.
- 20 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la medición inmunológica es un procedimiento de medición óptica de aglutinación de látex, un inmunoensayo enzimático, un inmunoensayo nefelométrico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, un fluoroinmunoensayo o un radioinmunoensayo.

Figura 2

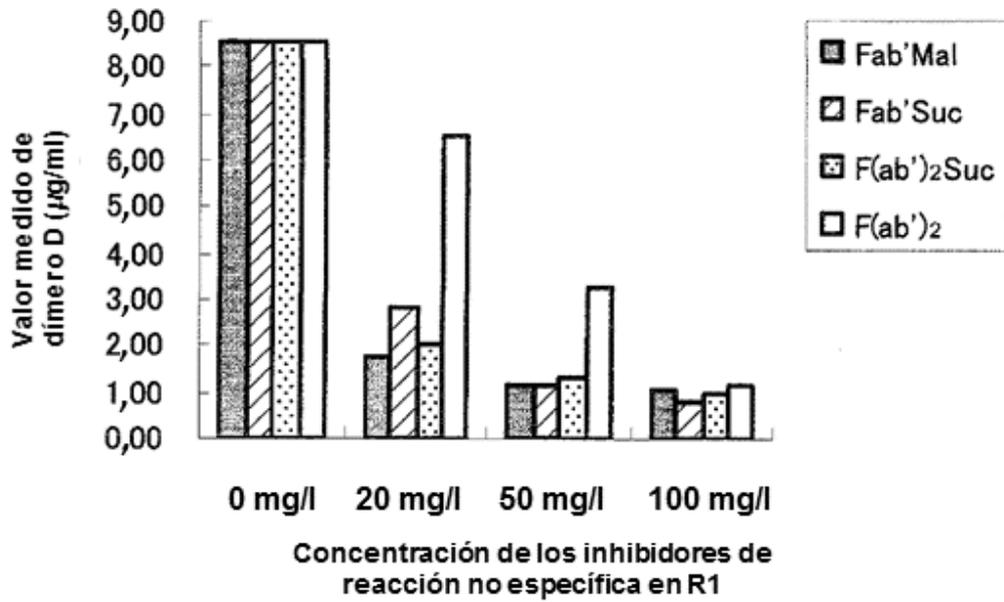


Figura 3

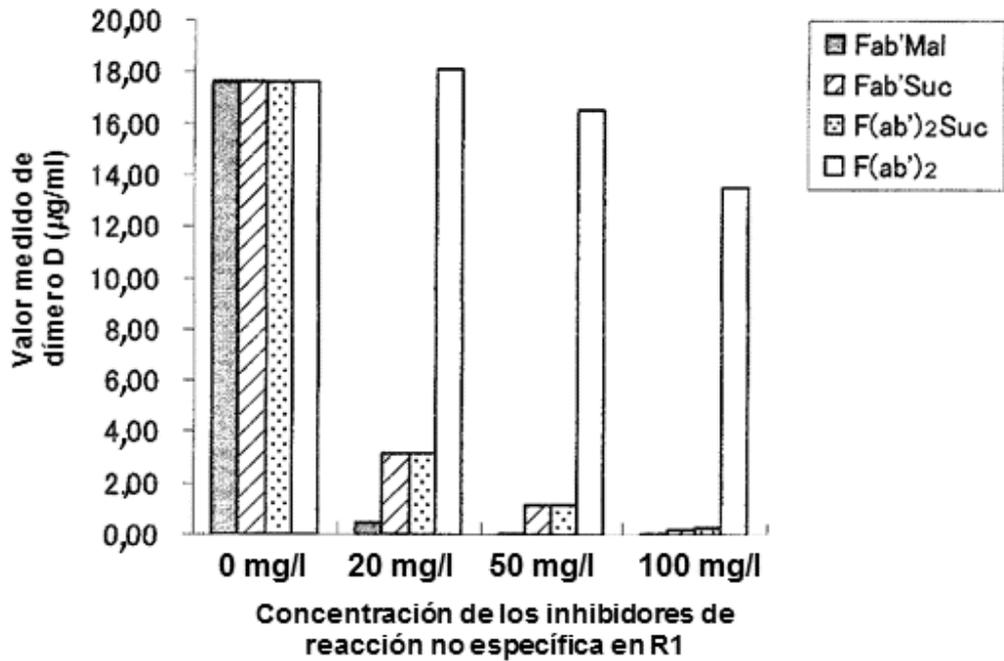


Figura 4

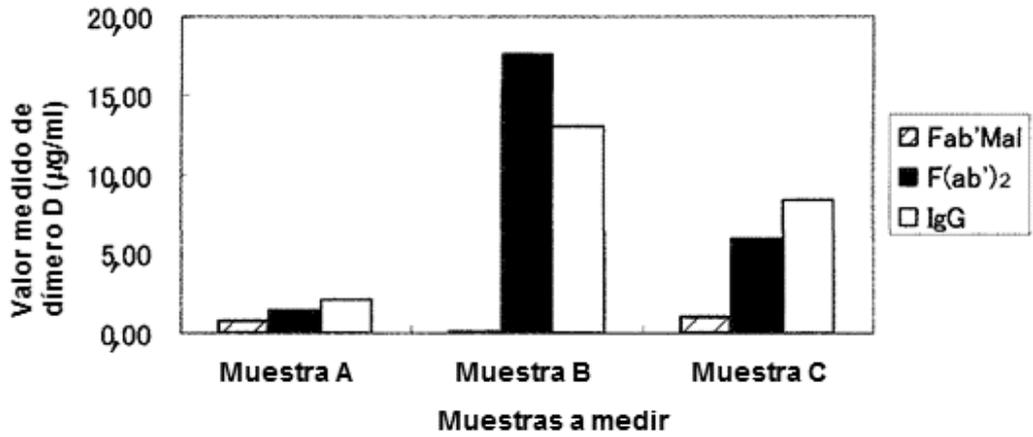


Figura 5

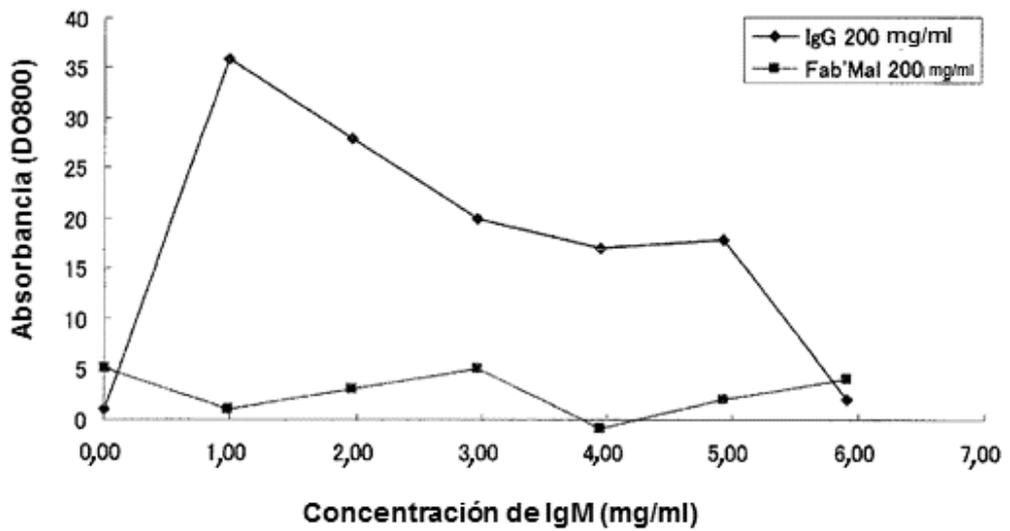


Figura 6

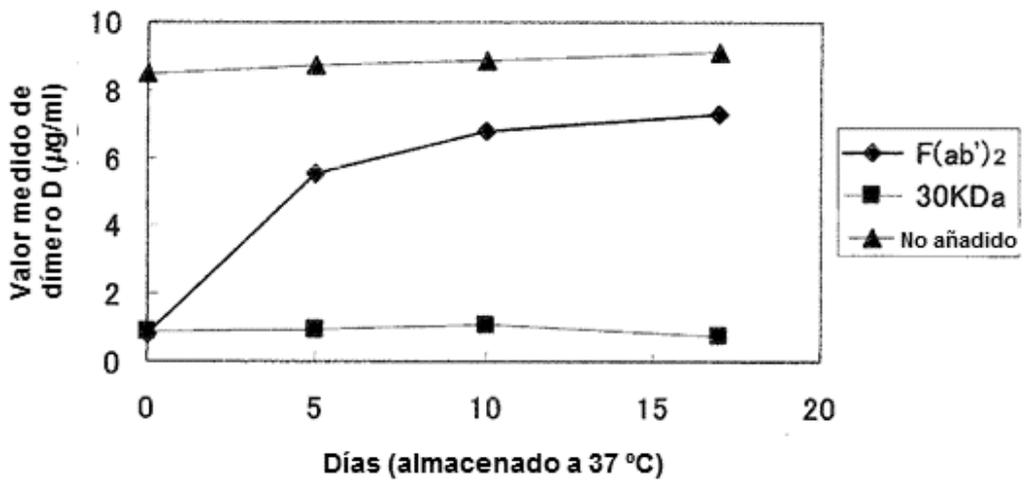


Figura 7

