

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 118**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2015 PCT/EP2015/073902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2015 E 15780895 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 3207372**

54 Título: **Determinación de constantes de unión por desplazamiento del equilibrio**

30 Prioridad:

**16.10.2014 DE 102014115088**

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

**22.10.2019**

73 Titular/es:

**3B PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)**

**Magnusstrasse 11**

**12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**BORISS, HINNERK**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

ES 2 728 118 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

Determinación de constantes de unión por desplazamiento del equilibrio

5 La invención se refiere a un procedimiento para determinar constantes de unión entre una sustancia o una mezcla de sustancias y una diana según la reivindicación 1. La determinación de interacciones y constantes de unión entre una sustancia o una mezcla de sustancias y una diana desempeña un papel principal en la industria farmacéutica, en particular en la investigación y el desarrollo farmacológico. Estas dos áreas implican interacciones entre una sustancia o mezclas de sustancias y seres vivos. En este caso, es esencial cuantificar las características de unión de sustancias individuales con parámetros de unión y constantes de unión.

15 Se conoce un procedimiento para determinar constantes de unión a partir del documento DE 10 2010 018 965 A1. En este procedimiento, se ponen en contacto proteínas inmovilizadas sobre sólidos, por ejemplo, con una solución acuosa de la sustancia que se someterá a prueba y se incuban durante un periodo suficiente para la unión de la sustancia disuelta con las proteínas. A continuación, las proteínas con soporte sólido se separan de la solución (por ejemplo, por sedimentación). Usando procedimientos de medida adecuados, se determina la concentración de la sustancia que se someterá a prueba en la solución residual (sobrenadante), u opcionalmente en las proteínas con soporte sólido separadas, específicamente para una pluralidad de diferentes proporciones de mezclado de las proteínas con soporte sólido con la sustancia que se someterá a prueba. Para este fin, se incuban cantidades idénticas de la sustancia que se someterá a prueba para la unión en volúmenes de solución uniformes con diferentes cantidades de las proteínas con soporte sólido. El volumen total de la fase líquida de la muestra que se someterá a prueba, que consiste en el volumen de la solución tampón en la que se disuelve la sustancia o mezcla de sustancias que se someterá a prueba, se mantuvo constante en todos los casos. Un inconveniente de este procedimiento es que las sustancias que tienen afinidades muy altas por el plástico o el vidrio se adhieren de forma no específica a los recipientes de muestra y así se pierden o precipitan debido a su baja solubilidad.

25 Por otra parte, el documento EP 1 658 499 A1 describe un procedimiento para determinar las constantes de unión o la fracción libre de sustancias en plasma y suero diluido en el que se determina la unión de una sustancia a membranas inmovilizadas (Diana 1) y plasma diluido (Diana 2). El inconveniente de este procedimiento es que las interacciones entre sustancias y dianas que muestran una afinidad extremadamente alta o baja por membranas no pueden determinarse. Por ejemplo, este último es el caso de los péptidos, que por ejemplo están conjugados con ácidos grasos como anclajes de lípidos, mientras que el primero se produce frecuentemente en lípidos sin dichos anclajes.

35 El documento WO 2005/017528 describe la determinación de fracciones libres de sustancias farmacológicamente activas en soluciones acuosas y suero. Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para determinar constantes de unión entre una sustancia o una mezcla de sustancias y una diana que supere los inconvenientes asociados con los procedimientos conocidos. En particular, debería ser posible determinar constantes de unión entre sustancias y dianas que, en el uso de procedimientos convencionales, muestren una afinidad extremadamente alta o baja por membranas o una afinidad extremadamente alta por el recipiente de muestras. Según una realización adicional, también se proporcionará un procedimiento en el que las constantes de unión entre la sustancia y la diana inmovilizada y entre la sustancia y la diana soluble pueden determinarse simultáneamente.

45 Este objetivo se consigue mediante el procedimiento con las características de la reivindicación 1. Las realizaciones son dianas de las reivindicaciones 2 a 13. La invención se refiere a un procedimiento para determinar constantes de unión de una sustancia o una mezcla de sustancias con respecto a una diana soluble y una diana insoluble, que comprende las etapas siguientes:

- 50 • incubación de una primera muestra de la sustancia o la mezcla de sustancias con una diana inmovilizado en un sólido, preferentemente vehículo de partículas en un primer recipiente de muestras que contiene una solución tampón y una diana disuelta,
- 55 • incubación de una segunda muestra de la sustancia o la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un sólido, preferentemente vehículo de partículas en un segundo recipiente de muestras que contiene solución tampón y diana disuelta,
- 60 • incubación de una tercera muestra de la sustancia o la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un sólido, preferentemente vehículo de partículas en un tercer recipiente de muestras que contiene solución tampón y diana disuelta,
- 65 • incubación de una cuarta muestra de la sustancia o la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un sólido, preferentemente vehículo de partículas en un cuarto recipiente de muestras que contiene solución tampón y diana disuelta,

proporcionándose que según la invención se incuban la primera y la segunda muestra de la sustancia que contienen diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada y la misma cantidad de sustancia de la diana disuelta, y se incuban la tercera y la cuarta muestra de la sustancia que contienen las mismas cantidades de sustancia de la

diana inmovilizada que la primera y la segunda muestra de la sustancia y que contiene la misma cantidad de sustancia de la diana soluble, en el que la cantidad de sustancia de la diana soluble en los recipientes de muestra tres y cuatro difiere de la cantidad de sustancia de la diana soluble en los recipientes de muestra uno y dos, y los recipientes de muestra durante la incubación contienen el mismo volumen de fase líquida, compuesto por solución tampón, diana disuelta y muestra de sustancia, y el procedimiento según la invención comprende además las etapas siguientes:

- separación del sólido, preferentemente vehículo de partículas de los lotes de incubación respectivos,
- medida de la concentración de la sustancia no unida a la diana inmovilizada o la mezcla de sustancias no unida a la diana inmovilizada (concentración APA) en el sobrenadante del lote de incubación respectivo,
- determinación de una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana inmovilizada y una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana disuelta basándose en las concentraciones APA medidas.

La invención se refiere en particular a un procedimiento para determinar constantes de unión entre una sustancia individual y una diana. Sin embargo, en el sentido de la presente invención, las constantes de unión también pueden determinarse alternativamente para una mezcla de sustancias con respecto a una diana. En este caso, debe entenderse que una mezcla de sustancias se refiere en particular a una mezcla que contiene al menos dos sustancias que se unen opcionalmente a una diana. Con el procedimiento según la invención, la constante de unión con respecto a la diana puede determinarse para cada sustancia en dicha mezcla de sustancias. Esto se aplica en particular en el multiplexado. Salvo que se diferencie explícitamente a continuación, el uso del término sustancia también incluye la mezcla de sustancias.

El principio funcional básico del procedimiento según la invención es la determinación de las constantes de unión de la sustancia para las dianas desplazando el equilibrio de unión. En este caso, las concentraciones de las dos dianas, es decir, la diana inmovilizada y la disuelta, son variadas, y las afinidades por las dianas se determinan mediante el desplazamiento de los equilibrios de unión en los lotes individuales.

El procedimiento según la invención se usa así para determinar constantes de unión entre una sustancia o una mezcla de sustancias y una diana. Sin embargo, en el procedimiento según la invención, a diferencia de la técnica anterior, no sólo se modifica la concentración de la diana inmovilizada, sino que también se introduce una segunda fase de la misma diana o una diana diferente en solución, cuya concentración también se modifica. La ventaja del procedimiento según la invención es por tanto que también pueden determinarse las interacciones entre una sustancia o una mezcla de sustancias y dos dianas diferentes. Por otra parte, la introducción de la segunda diana disuelta aumenta la solubilidad de las sustancias o mezclas de sustancias. Para la determinación de las constantes de unión se requieren al menos cuatro muestras: dos para diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada combinadas con dos para diferentes cantidades de sustancias de la diana soluble. Esto proporciona una concentración medida mínima de la sustancia en el sobrenadante (libre o unido a la diana soluble) requerido para determinar las constantes de unión de la sustancia con respecto a la diana inmovilizada y disuelto según la invención. Dado que el procedimiento según la invención también comprende una diana soluble además de la diana inmovilizada, y no sólo se modifica la concentración de la diana inmovilizada, sino también la de la diana soluble, el procedimiento según la invención hace posible determinar simultáneamente las constantes de unión entre la sustancia y la diana inmovilizada y las constantes de unión entre la sustancia y la diana soluble.

Según una realización esencial de la presente invención, el equilibrio de unión se desplaza con el fin de determinar las constantes de unión. En este caso, se modifican las concentraciones de la diana inmovilizada y la diana disuelta. La primera y la segunda muestra de la sustancia se incuban con diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada. Esto hace que la cantidad de sustancia de la diana inmovilizada en el lote de incubación uno sea diferente de la cantidad de sustancia de la diana inmovilizada en el lote de incubación dos. Por otra parte, la tercera y la cuarta muestra de la sustancia se incuban con una cantidad de sustancia diferente de la diana soluble. Esto hace que la cantidad de sustancia de la diana soluble en el lote de incubación tres y cuatro difiera de la cantidad de sustancia de la diana soluble en el lote de incubación uno y dos. La diferencia respectiva la cantidad de sustancia requerida para alcanzar dicha variación en la concentración de la diana puede variar en cada caso, con independencia unos de otros, en un intervalo de un factor de 1,5 a 100, y en particular de 2 a 10.

La tercera y la cuarta muestra de la sustancia se incuban con las mismas cantidades de sustancia de la diana inmovilizada que la primera y la segunda muestra de la sustancia. Como consecuencia, se modifica por tanto la cantidad de sustancia de la diana inmovilizada en los lotes de incubación tres y cuatro de la misma forma que en los lotes de incubación uno y dos.

Dicho de otro modo, de lo anterior se desprende que los lotes de incubación uno y tres contienen la misma cantidad de sustancia de la diana inmovilizada. Los lotes de incubación dos y cuatro también contienen la misma cantidad de sustancia de la diana inmovilizada, pero esta difiere de la cantidad de sustancia de la diana inmovilizada de los lotes de incubación uno y tres. Los lotes de incubación uno y dos contienen la misma cantidad de sustancia de la diana disuelta, y los lotes de incubación tres y cuatro también contienen la misma cantidad de sustancia de la diana disuelta,

pero la última cantidad de sustancia difiere de la cantidad de sustancia de los lotes de incubación uno y dos.

En la medida de la concentración APA, se determina la concentración de la sustancia no unida a la diana inmovilizada o la mezcla de sustancias no unida a la diana inmovilizada en el sobrenadante del lote de incubación respectivo. La concentración APA es la concentración total de la sustancia no unida a la diana inmovilizada o la mezcla de sustancias no unida a la diana inmovilizada en el sobrenadante del lote de incubación respectivo, es decir, que contiene la sustancia libre o mezcla de sustancias libre y la sustancia o mezcla de sustancias unidas a la diana soluble.

Puede observarse que, en el procedimiento según la invención, se determinan al menos cuatro concentraciones APA, ya que se usan al menos cuatro recipientes de muestra con lotes de incubación correspondientes.

Lo que se describe en la presente memoria es que además de las muestras primera, segunda, tercera y cuarta muestra de la sustancia, se incuba al menos una muestra adicional de la sustancia o la mezcla de sustancias, preferentemente entre 1 y 21 muestras adicionales, con la diana inmovilizada en un sólido, preferentemente vehículo de partículas en al menos un recipiente de muestras adicional que contiene solución tampón y diana disuelta, y preferentemente en 1-21 recipientes de muestra adicionales que contienen solución tampón, en los que se incuban las muestras adicionales que contienen diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada, se incuban las muestras adicionales que contienen diferentes cantidades de sustancias de la diana disuelta, y se incuba al menos una de las muestras adicionales en dos recipientes de muestra con la misma concentración de diana inmovilizada, y al mismo tiempo, concentraciones diferentes de la diana disuelta y todos los recipientes de muestra adicionales contienen la misma cantidad de solución tampón durante la incubación que los recipientes de muestra primero, segundo, tercero y cuarto. La ventaja del aumento en el número de muestras es que la tasa de errores disminuye al aumentar el número de valores de concentración que pueden usarse para la determinación.

Con el fin de estimar las constantes de unión, la concentración de la diana inmovilizada se modifica opcionalmente en de 2 a 5 lotes de reacción respectivamente, y se añade una cantidad de sustancia constante. Por otra parte, se añade también un volumen constante de la diana disuelta (plasma, albúmina, etc.) a estos lotes de reacción. En este caso, debe observarse que la concentración de la diana disuelta en el volumen puede diferir debido a la dilución con tampón. Se usan hasta 5 concentraciones diferentes de dianas disueltas en de 2 a 5 lotes paralelos, lo que da origen a de 4 a 25 lotes reacción con diferentes concentraciones de diana inmovilizada y diana disuelta.

Tal como se describe en la presente memoria, además de las muestras de sustancia primera, segunda, tercera y cuarta, se usan al menos cinco muestras adicionales de la sustancia o la mezcla de sustancias (es decir, 9 muestras, que corresponden a 3 fases de concentración de la diana inmovilizada en combinación con 3 fases de concentración de la diana soluble). Preferentemente se usan 25 muestras. En este caso, se combinan 5 diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada con 5 cantidades de sustancias diferentes de la diana soluble, de manera que cada cantidad de sustancia individual de la diana inmovilizada se incuba con cada cantidad de sustancia de la diana soluble, para producir 25 equilibrios de unión diferentes. Sin embargo, durante la incubación, los recipientes de muestra siempre contienen la misma cantidad de solución tampón que los recipientes de muestra primero, segundo, tercero y cuarto. Con el fin de estimar las constantes de unión, la concentración de la diana se modifica en 25 lotes de reacción, y se añade una cantidad de sustancia constante. Se usan así al menos dos concentraciones diferentes de las dos dianas, es decir, las dianas disuelta e inmovilizada.

Una realización adicional proporciona que la concentración de la sustancia o la mezcla de sustancias (APA) en el sobrenadante del lote de incubación respectivo se determina con respecto a una muestra de referencia. En particular, dicha muestra de referencia es una muestra que contiene sólo solución tampón, diana soluble y la sustancia o mezcla de sustancias que se someterá a prueba, pero no la diana inmovilizada.

En una realización del procedimiento según la invención, las dianas disuelta e inmovilizada son idénticas. Según una variante adicional, las dianas disuelta e inmovilizada son diferentes.

La diana según la invención debe ser preferentemente un compuesto diana o un receptor diana. Por tanto, las dianas también pueden referirse como receptores. Por ejemplo, a la diana pueden unirse ingredientes activos o dañinos. En particular, las dianas adecuadas incluyen dianas biológicas como proteínas, preferentemente enzimas, anticuerpos, o mezclas tales como plasma. Específicamente, las dianas pueden ser proteínas no unidas a membrana o dominios de proteínas extracelulares responsables de la unión tales como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteínas del plasma tales como albúmina sérica humana (ASH) o glucoproteína ácida alfa-1 (AGP), mezclas de proteínas tales como plasma o suero, u homogeneizados tisulares. Las dianas pueden ser de ocurrencia natural o dianas fabricadas artificialmente. Puede verse que la diana puede ser una mezcla de diferentes compuestos diana o receptores diana. Una característica común de todas las dianas inmovilizados es que se inmovilizan en un sólido.

La sustancia o mezcla de sustancias que se someterá a prueba puede referirse también como un ligando. Dichas sustancias que se someterán a prueba pueden ser péptidos, ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos, lípidos y otras biomoléculas. Las sustancias que se someterán a prueba también pueden ser sustancias químicas tales como fármacos o toxinas. La interacción entre la diana y la sustancia o mezcla de sustancias puede implicar enlaces

específicos o no específicos. Los enlaces son generalmente no covalentes. En este caso, las sustancias de prueba compiten en la unión a las dianas. A diferencia de las membranas, el uso de dianas inmovilizadas que incluyen proteínas tales como albúmina o anticuerpos hace posible determinar las interacciones entre sustancias y dianas que muestran sólo una afinidad por membranas extremadamente alta o extremadamente baja. Los péptidos son un ejemplo de dichas sustancias.

En el procedimiento según la invención, las constantes de unión que se determinarán son constantes de afinidad o de disociación.

La determinación de las constantes de afinidad o de disociación se realiza en el procedimiento según la invención según la ecuación I:

$$APA = \frac{c_0 \cdot K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)}{[inmoT] \cdot K_D^P + K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)} \quad (I),$$

en la que

APA es la concentración de la sustancia que no está unida a la diana inmovilizada, es decir, sustancia libre y sustancia unida a la diana soluble,

$K_D^H$  es la constante de disociación de la diana inmovilizada,

$K_D^P$  es la constante de disociación de la diana disuelta,

$c_0$  es la concentración de sustancia añadida constante total,

$[inmoT]$  es la concentración de la diana inmovilizada, y

$[P]$  es la concentración de la diana disuelta.

En consecuencia, se determinan las constantes de disociación de la sustancia con respecto a la diana inmovilizada y las constantes de disociación de la sustancia con respecto a la diana disuelta. Se sabe que las constantes de asociación respectivas se deducen matemáticamente de las constantes de disociación, y a la inversa.

Para que se use esta ecuación, las interacciones entre la sustancia y las dianas deben seguir una cinética de unión de primer orden o aproximadamente de primer orden.

La determinación de las constantes de disociación se realiza por tanto por medio de un procedimiento según una de las realizaciones mencionadas anteriormente, que comprenden preferentemente además las etapas siguientes:

- uso de una matriz de constantes de disociación para  $K_D^H$  y  $K_D^P$  en la ecuación I,
- cálculo de las concentraciones APA respectivas que se esperan para la matriz de constantes de disociación,
- comparación de las concentraciones APA calculadas con la concentración APA medida,
- selección del par de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que muestra la menor desviación entre la concentración APA calculada y la concentración APA medida como constantes de disociación especificadas de la sustancia que se someterá a prueba con respecto a la diana inmovilizada o disuelta.

En una realización preferida de este procedimiento, la selección del par de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que muestra la menor desviación entre concentración APA calculada y concentración APA medida se realiza por medio de un procedimiento de optimización numérica.

De acuerdo con una mejora del procedimiento según la invención, las constantes de unión se determinan usando la ecuación  $APA = \frac{c_0 \cdot K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)}{[inmoT] \cdot K_D^P + K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)}$ , mencionada anteriormente en la que primero se inserta en la ecuación una pluralidad de valores de constantes de unión para  $K_D^H$  y  $K_D^P$  y se calculan las concentraciones APA respectivas que se esperarán para estos valores. A continuación, se comparan las concentraciones APA calculadas con la concentración APA medida. En una etapa adicional, se determina la menor desviación entre la concentración APA calculada y la concentración APA medida por medio de un procedimiento de optimización numérica, preferentemente el procedimiento de optimización de "mínimos cuadrados", y la fórmula  $r = (APA_{medida} - APA_{calculada})^2$ . El valor más bajo para la desviación se selecciona a partir de estas desviaciones. A continuación, se selecciona el par de valores correspondientes para las constantes de unión  $K_D^H$  y  $K_D^P$  a las que se asignará este valor de la menor desviación. Estas

constituyen así las constantes de unión de la sustancia que se someterá a prueba.

Según una realización preferida, así puede construirse una matriz de constantes de disociación  $K_D^H$  y  $K_D^P$ . La matriz se rellena con los restos obtenidos de los valores APA medidos y los valores APA calculados a partir de los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  de la fila y la columna respectivas de la matriz según la fórmula siguiente:

$$r = (APA_{medida} - APA_{calculada})^2$$

La combinación de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que proporciona la menor desviación constituye la combinación óptima de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que mejor explica los valores de medida. Los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  determinados de esta manera son las constantes de unión obtenidas según la invención.

En una realización del procedimiento, se proporciona un vehículo para la diana inmovilizada que es insoluble en una solución acuosa. Esto permite separar fácilmente el vehículo del lote de incubación y que sea reutilizable opcionalmente para repetir el procedimiento.

En una realización preferida en particular, el vehículo consiste en un polímero orgánico o inorgánico, prefiriéndose en particular agarosa. La ventaja de la agarosa reside en su baja unión no específica de las sustancias que se someterán a prueba, tales como péptidos en particular.

De acuerdo con una realización adicional del procedimiento según la invención, se proporciona que el vehículo esté en forma de partículas, siendo las partículas al menos parcialmente partículas de microescala o nanoescala. En este caso, las partículas pueden ser nanopartículas magnéticas o no magnéticas, partículas de sílice o microperlas de sefarosa.

En una realización preferida en particular del procedimiento, el vehículo es un vehículo de agarosa en partículas. Una ventaja adicional de dicho vehículo es que está disponible comercialmente.

Se prefiere en particular una realización en variante del procedimiento según la invención en la que la diana inmovilizada es albúmina. La albúmina está especialmente bien adaptada como diana inmovilizada dado que puede inmovilizarse según procedimientos estándar.

En una realización ventajosa adicional del procedimiento, la diana soluble es plasma o suero de origen humano o animal. La ventaja del plasma o suero reside en la relevancia fisiológica especial de los resultados de medida.

Una realización adicional del procedimiento según la invención proporciona que la separación del vehículo se realiza por filtración, centrifugación o decantación de la solución tampón. Dichos procedimientos permiten que el vehículo se separe del lote de incubación sin aumentar el tiempo y los costes requeridos.

En una realización preferida, el vehículo está en forma de partículas, y las partículas tienen propiedades magnéticas. En este caso, se proporciona una realización según la invención en la que el vehículo se separa aplicando un campo magnético para desprenderlo. El uso de partículas magnéticas y separación magnética ofrece ventajas considerables con respecto a otras tecnologías. Las partículas magnéticas pueden aislarse de forma directa y selectiva del lote de incubación y purificarse. En comparación con los procedimientos de separación convencionales, la separación magnética es sencilla y rápida. Además, etapas como el cambio del tampón o las etapas de lavado pueden realizarse de una manera sencilla.

Preferentemente en particular, la medida de la concentración de la sustancia o la mezcla de sustancias se realiza por espectrometría de masas, espectroscopia por fluorescencia, procedimientos que usan radiactividad o procedimientos de cromatografía o una combinación de dichos procedimientos. Estos procedimientos pueden modificarse de forma extensa, y pueden adaptarse de forma correspondiente y modificarse según la sustancia de ensayo. De esta forma, cada concentración de la sustancia puede determinarse con la máxima precisión posible.

Según una realización adicional del procedimiento según la invención, la solución tampón es una solución salina acuosa. Dichas soluciones están especialmente bien adaptadas para probar constantes de unión, ya que las dianas usadas son estables en las mismas y las soluciones están disponibles comercialmente.

En una realización preferida en particular del procedimiento según la invención, los recipientes de muestra son cavidades de placas de microvaloración o tienen en particular propiedades superficiales que no interfieren con la sustancia o la mezcla de sustancias.

En la presente memoria se describe un kit para determinar constantes de unión entre una sustancia o una mezcla de sustancias y una diana por un procedimiento según una de las realizaciones mencionadas anteriormente. Lo que se contempla en este caso es que el kit contiene al menos 4 recipientes de muestra o al menos 4 cavidades de una placa de microvaloración, solución tampón, una cantidad de una diana disuelta y una cantidad de una diana inmovilizada en

un sólido, preferentemente vehículo de partículas, en el que las dianas disueltas e inmovilizadas pueden ser idénticas o diferentes.

5 Tal como se describe en la presente memoria, el procedimiento para determinar constantes de unión de una sustancia o una mezcla de sustancias con respecto a una diana soluble y una diana inmovilizada se configura de manera que, en particular, la determinación de una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana inmovilizada y una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana disuelta se realiza basándose en las concentraciones APA medidas ejecutando un programa informático. Lo que se describe así también en este caso es un programa informático para determinar constantes de unión de una sustancia o una  
 10 mezcla de sustancias con respecto a una diana soluble y una diana inmovilizada que se configura de manera que la determinación de una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana inmovilizada y una constante de unión de la sustancia o la mezcla de sustancias con respecto a la diana disuelta pueden realizarse basándose en las concentraciones APA medidas. En la presente memoria se describe un producto de programa informático tal como un vehículo de datos, un medio de almacenamiento o un medio legible por máquina de dicho programa informático. Si fuera necesario, el kit mencionado anteriormente puede comprender además dicho  
 15 producto de programa informático.

**Realización de ejemplo 1:**

20 A) Diseño experimental

Una realización preferida en particular es una placa de microvaloración en la que se usan 5 columnas con 7 cavidades para el procedimiento descrito anteriormente, de manera que se incuban 25 muestras con diana inmovilizada y 10  
 25 muestras como referencias sin diana inmovilizada. Se usó albúmina sérica humana (ASH) como diana inmovilizada (Diana 1). La ASH se inmovilizó según un procedimiento estándar en perlas de sefrosa comercial (medio de perlas Mini-Leak, Kem-En-Tec Nordic A/S). Se usó plasma humano como una diana soluble. La sustancia que se someterá a prueba es un péptido. Se usan 5 concentraciones de ASH inmovilizada para cada una de las 5 concentraciones de plasma. Para este fin, las cavidades de una placa de microvaloración se rellenan de la forma siguiente:

30

Columna I de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | I-1     | I-2  | I-3    | I-4    | I-5    | I-6    | I-7    |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10   | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma puro en $\mu\text{L}$          | 150     | 150  | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna II de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | II-1    | II-2 | II-3   | II-4   | II-5   | II-6   | II-7   |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |

ES 2 728 118 T3

|  |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$             | 290 | 290 | 265 | 246 | 212 | 148 | 35  |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$             | 0   | 0   | 11  | 20  | 37  | 66  | 119 |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$            | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Volumen de plasma diluido 1:2 en $\mu\text{L}$ | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |

Columna III de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |       |        |        |        |        |        |
|--|---------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | III-1   | III-2 | III-3  | III-4  | III-5  | III-6  | III-7  |
|  | Ref 1   | Ref2  | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0     | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0     | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290   | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0     | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10    | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma diluido 1:4 en $\mu\text{L}$   | 150     | 150   | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna IV de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | IV-1    | IV-2 | IV-3   | IV-4   | IV-5   | IV-6   | IV-7   |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10   | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma diluido 1:8 en $\mu\text{L}$   | 150     | 150  | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna V de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|                                       | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|---------------------------------------|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                                       | V-1     | V-2  | V-3    | V-4    | V-5    | V-6    | V-7    |
|                                       | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$ | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |

## ES 2 728 118 T3

|  |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0   | 0   | 36  | 64  | 115 | 208 | 374 |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290 | 290 | 265 | 246 | 212 | 148 | 35  |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0   | 0   | 11  | 20  | 37  | 66  | 119 |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Volumen de plasma diluido 1:16 en $\mu\text{L}$  | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |

En este caso, el plasma se prediluye según la tabla siguiente y se añade a las cavidades respectivas:

| Dilución de plasma | Volumen y concentración de plasma                         | Adición a las cavidades de las columnas |
|--------------------|---|---|
| 1:3                | 150 $\mu\text{L}$ plasma puro                             | Columna I                               |
| 1:6                | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:2  | Columna II                              |
| 1:12               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:4  | Columna III                             |
| 1:24               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:8  | Columna IV                              |
| 1:48               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:16 | Columna V                               |

5 <sup>1</sup>En el cálculo de las constantes de disociación, se supone arbitrariamente que el plasma completo tiene una concentración de 600  $\mu\text{M}$ . Esta suposición es una aproximación de la realidad, aunque no es problemático, ya que la constante de disociación calculada se refiere a esta concentración, y por tanto se obtienen valores de unión correctos en el sentido del porcentaje de sustancia unida al plasma incluso aunque la concentración "verdadera" sea diferente.

10 Puede observarse que en este caso se aplica el principio según la invención de cambiar las concentraciones de las dos dianas, es decir, las dianas inmovilizada y disuelta. Se incubó una primera y una segunda muestra de la sustancia que contiene diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada y la misma cantidad de sustancia de la diana disuelta (por ejemplo, cavidad I-3 y I-7 con una concentración de ASH inmovilizada de 11  $\mu\text{M}$  o 120  $\mu\text{M}$ , en el que las dos cavidades contienen plasma diluido 1:3). Por otra parte, se incubó una tercera y una cuarta muestra de la sustancia con las mismas cantidades de sustancia de la diana inmovilizada que la primera y la segunda muestra de la sustancia y que contienen la misma cantidad de sustancia de la diana soluble (por ejemplo, cavidad V-3 y V-7 con una concentración de ASH inmovilizada de 11  $\mu\text{M}$  o 120  $\mu\text{M}$ , en el que las dos cavidades contienen plasma diluido 1:48), en el que las cantidades de sustancia de la diana soluble en los recipientes de muestra tres y cuatro difieren de la cantidad de sustancia de la diana soluble en los recipientes de muestra uno y dos.

### 20 B) Procedimiento experimental

Se añaden 10  $\mu\text{L}$  de cada una de una solución de reserva de 10 a 2.000  $\mu\text{M}$  de las sustancias de ensayo a las cavidades. En este ejemplo, se usó una solución de reserva 1.012,5  $\mu\text{M}$  del péptido. Después de la adición de 10  $\mu\text{L}$  a la configuración experimental descrita anteriormente, la concentración del péptido en todas las cavidades fue 22,5  $\mu\text{M}$ . Después de un mezclado por resuspensión de las perlas en las que se inmoviliza la diana 1 (en este caso, albúmina sérica humana), se separa la diana fijada en el material del vehículo. Para este fin, se centrifuga la placa de microvaloración de manera que las perlas experimentan sedimentación. La concentración en el sobrenadante se determina por medio de procedimientos adecuados, tales como LC/MS/MS o recuento por centelleo. Se determina la fracción no unida de la sustancia en las cavidades con la diana inmovilizada con respecto a las muestras de referencia. Esto elimina la necesidad de calibrado, siempre y cuando la proporción entre señal y concentración para las sustancias de ensayo y el sistema de cuantificación usado sigan un curso lineal.

### 35 C) Evaluación del experimento

Si se multiplican las concentraciones medidas para las 25 muestras con respecto a las muestras de referencia por las concentraciones de la sustancia de ensayo usada en el experimento (en este caso 22,5  $\mu\text{M}$ ), se obtienen las concentraciones APA en las 25 muestras (mostradas en la columna 3). Según la fórmula mencionada anteriormente para APA, los valores APA que se esperarán pueden calcularse a partir de las constantes de disociación  $K_D^H$  y  $K_D^P$ . Con el fin de determinar estas constantes de disociación, se usa un procedimiento de optimización de "mínimos cuadrados" numérico conocido en general. La configuración de este procedimiento puede mostrar amplias diferencias. Para este ejemplo, se construyó una matriz de constante de disociación  $K_D^H$  comprendida entre  $1,9 \cdot 10^{-5}$  y  $1,1 \cdot 10^{-7}$   $\mu\text{M}$

## ES 2 728 118 T3

y de constante de disociación  $K_D^P$  comprendida entre  $6,0 \cdot 10^{-4}$  y  $1,8 \cdot 10^{-11}$   $\mu\text{M}$ . La matriz se llenó con los restos derivados de los valores APA medidos y los valores APA calculados a partir de los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  de la fila y columna respectivas de la matriz según la fórmula siguiente:

$$r = (APA_{medida} - APA_{calculada})^2$$

La combinación de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que proporciona la menor desviación constituye la combinación óptima de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que mejor explica los valores de medida. Los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  determinados de esta manera se toman como resultado para las constantes de unión. Los valores APA calculados a partir de esta combinación de valores se muestran en la columna 4 de la tabla siguiente, y los restos se muestran en la columna 5.

|              | 1   | 2   | 3  | 4   | 5       |
|--------------|---|---|--|---|---------|
|              | Concentración de plasma humano [P] en $[\mu\text{M}]$ | Concentración de ASH inmovilizada $[\mu\text{M}]$ | Concentración APA medida $[\mu\text{M}]$ | Concentración APA predicha con constantes óptimas $[\mu\text{M}]$ | Restos  |
| Columna I:   | 200   | 11,4  | 20,8280                                  | 19,861  | 0,00277 |
|              | 200   | 20,6  | 20,9611                                  | 18,157  | 0,02748 |
|              | 200   | 37,0  | 17,2881                                  | 15,729  | 0,01665 |
|              | 200   | 66,7  | 14,4100                                  | 12,677  | 0,04559 |
|              | 200   | 120,0   | 10,2862                                  | 9,395   | 0,04305 |
| Columna II:  | 100   | 11,4  | 20,7373                                  | 18,074  | 0,02555 |
|              | 100   | 20,6  | 19,6240                                  | 15,617  | 0,08655 |
|              | 100   | 37,0  | 15,4196                                  | 12,546  | 0,11166 |
|              | 100   | 66,7  | 11,7731                                  | 9,267   | 0,26716 |
|              | 100   | 120,0   | 6,1804                                   | 6,302   | 0,00492 |
| Columna III: | 50  | 11,4  | 19,3799                                  | 15,810  | 0,06874 |
|              | 50  | 20,6  | 16,5692                                  | 12,772  | 0,16304 |
|              | 50  | 37,0  | 12,0566                                  | 9,489   | 0,25492 |
|              | 50  | 66,7  | 7,0854                                   | 6,488   | 0,08551 |
|              | 50  | 120,0   | 3,8316                                   | 4,134   | 0,18473 |
| Columna IV:  | 25  | 11,4  | 16,7864                                  | 13,509  | 0,10571 |
|              | 25  | 20,6  | 13,0066                                  | 10,237  | 0,21905 |
|              | 25  | 37,0  | 7,4661                                   | 7,129   | 0,02034 |
|              | 25  | 66,7  | 4,1302                                   | 4,609   | 0,32078 |
|              | 25  | 120,0   | 2,7004                                   | 2,817   | 0,11962 |
| Columna V:   | 12,5  | 11,4  | 13,4437                                  | 11,643  | 0,06701 |
|              | 12,5  | 20,6  | 8,5339                                   | 8,400   | 0,00176 |
|              | 12,5  | 37,0  | 4,7166                                   | 5,595   | 0,56109 |
|              | 12,5  | 66,7  | 2,9723                                   | 3,495   | 1,28026 |
|              | 12,5  | 120,0   | 2,3312                                   | 2,085   | 1,29411 |

Para este ejemplo, las constantes de disociación de la sustancia de ejemplo determinadas de esta manera son  $K_D^P = 18,7 \mu\text{M}$  y  $K_D^H = 7,3 \mu\text{M}$ . A continuación, se determina la fracción del péptido usado unido al plasma humano completo según la siguiente fórmula conocida en general,

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + [P]/K_D^P}$$

5 en la que [P] es la concentración de plasma seleccionada arbitrariamente y  $K_D^P$  es el valor, obtenido por el procedimiento de optimización, de la constante de disociación del péptido a partir del plasma. En este ejemplo, la fracción del péptido unido al plasma humano completo (sin diluir) es del 97 %. Esto significa que sólo el 3 % del péptido disuelto en el plasma está en forma libre o no unida.

### Realización de ejemplo 2:

#### 10 A) Diseño experimental

15 Una realización preferida en particular es una placa de microvaloración en la que se usan 5 columnas con 7 cavidades para el procedimiento descrito anteriormente, de manera que se incuban 25 muestras con diana inmovilizada y 10 muestras como referencias sin diana inmovilizada. Se usó albúmina sérica humana (ASH) como diana inmovilizada (Diana 1). La ASH se inmovilizó según procedimientos estándar sobre perlas de sefarosa comercial (medio de perlas Mini-Leak, Kem-En-Tec Nordic A/S). Se usó plasma humano como diana soluble. La sustancia que se someterá a prueba es el péptido liraglutida. Se usan 5 concentraciones de ASH inmovilizada para cada una de las 5 concentraciones de plasma. Para este fin, las cavidades de una placa de microvaloración se rellenan de la forma siguiente:

20

Columna I de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | I-1     | I-2  | I-3    | I-4    | I-5    | I-6    | I-7    |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10   | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma puro en $\mu\text{L}$          | 150     | 150  | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna II de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | II-1    | II-2 | II-3   | II-4   | II-5   | II-6   | II-7   |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10   | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |

## ES 2 728 118 T3

|  |     |     |     |     |     |     |     |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volumen de plasma diluido 1:2 en $\mu\text{L}$ | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

Columna III de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |       |        |        |        |        |        |
|--|---------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | III-1   | III-2 | III-3  | III-4  | III-5  | III-6  | III-7  |
|  | Ref 1   | Ref2  | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0     | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0     | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290   | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0     | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10    | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma diluido 1:4 en $\mu\text{L}$   | 150     | 150   | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna IV de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | IV-1    | IV-2 | IV-3   | IV-4   | IV-5   | IV-6   | IV-7   |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$              | 10      | 10   | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
| Volumen de plasma diluido 1:8 en $\mu\text{L}$   | 150     | 150  | 150    | 150    | 150    | 150    | 150    |

Columna V de la placa de microvaloración (usando las líneas 1 a 7):

|  | Cavidad |      |        |        |        |        |        |
|--|---------|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|  | V-1     | V-2  | V-3    | V-4    | V-5    | V-6    | V-7    |
|  | Ref 1   | Ref2 | ASH V1 | ASH V2 | ASH V3 | ASH V4 | ASH V5 |
| Concentración de ASH en $\mu\text{M}$            | 0       | 0    | 11     | 21     | 37     | 67     | 120    |
| Volumen de suspensión de perlas en $\mu\text{L}$ | 0       | 0    | 36     | 64     | 115    | 208    | 374    |
| Volumen de tampón en $\mu\text{L}$               | 290     | 290  | 265    | 246    | 212    | 148    | 35     |
| Volumen de perlas en $\mu\text{L}$               | 0       | 0    | 11     | 20     | 37     | 66     | 119    |

|   |     |     |     |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Volumen de muestra en $\mu\text{L}$             | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  | 10  |
| Volumen de plasma diluido 1:16 en $\mu\text{L}$ | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 | 150 |

En este caso, el plasma se prediluye según la tabla siguiente y se añade a las cavidades respectivas:

| Dilución de plasma | Volumen y concentración de plasma                         | Adición a las cavidades de las columnas |
|--------------------|---|---|
| 1:3                | 150 $\mu\text{L}$ plasma puro                             | Columna I                               |
| 1:6                | 150 $\mu\text{L}$ Plasma en predilución 1:2               | Columna II                              |
| 1:12               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:4  | Columna III                             |
| 1:24               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:8  | Columna IV                              |
| 1:48               | 150 $\mu\text{L}$ Plasma <sup>1</sup> en predilución 1:16 | Columna V                               |

- 5 <sup>1</sup>En el cálculo de las constantes de disociación, se supone arbitrariamente que el plasma completo tiene una concentración de 600  $\mu\text{M}$ . Esta suposición es una aproximación de la realidad, aunque no es problemático, ya que la constante de disociación calculada se refiere a esta concentración, y por tanto se obtienen valores de unión correctos en el sentido del porcentaje de sustancia unida al plasma incluso aunque la concentración "verdadera" sea diferente.
- 10 Puede observarse que en este caso se aplica el principio según la invención de cambiar las concentraciones de las dos dianas, es decir, las dianas inmovilizada y disuelta. Se incubó una primera y una segunda muestra de la sustancia que contiene diferentes cantidades de sustancias de la diana inmovilizada y la misma cantidad de sustancia de la diana disuelta (por ejemplo cavidad V-3 y V-6), y se incubó una tercera y una cuarta muestra de la sustancia con las mismas cantidades de sustancia de la diana inmovilizada que la primera y la segunda muestra de la sustancia y una cantidad diferente de sustancia de la diana soluble (por ejemplo, cavidad IV3 y V3).

#### B) Procedimiento experimental

20 Se añaden 10  $\mu\text{L}$  de cada una de una solución de reserva 0,022  $\mu\text{M}$  de la sustancia de ensayo liraglutida a las cavidades. Después de la adición de 10  $\mu\text{L}$  a la configuración experimental descrita anteriormente, la concentración del péptido en todas las cavidades fue 22 nM. Después de mezclado por resuspensión de las perlas en el que se inmoviliza la diana 1 (en este caso, albúmina sérica humana), se separa la diana fijada en el material de vehículo. Para este fin, se centrifuga la placa de microvaloración de manera que las perlas experimentan sedimentación. La concentración en el sobrenadante se determina por medio de procedimientos adecuados, tales como LC/MS/MS o recuento por centelleo. Se determina la fracción no unida de la sustancia en las cavidades con la diana inmovilizada con respecto a las muestras de referencia. Esto elimina la necesidad de calibrado, siempre y cuando la proporción entre señal y concentración para las sustancias de ensayo y el sistema de cuantificación usado sigan un curso lineal.

#### C) Evaluación del experimento

30 Si se multiplican las concentraciones medidas para las 25 muestras con respecto a las referencias por las concentraciones de la sustancia de ensayo usada en el experimento (en este caso 22 nM), se obtienen las concentraciones APA en las 25 muestras (mostrado en la columna 3). Según la fórmula anterior para APA, los valores APA que se esperarán pueden calcularse a partir de las constantes de disociación  $K_D^H$  y  $K_D^P$ . Con el fin de determinar estas constantes de disociación, se usa un procedimiento de optimización de "mínimos cuadrados" numérico conocido en general. La configuración de este procedimiento puede mostrar amplias diferencias. Para este ejemplo, se construyó una matriz de constante de disociación  $K_D^H$  comprendida entre  $1,9 \cdot 10^{-5}$  y  $1,1 \cdot 10^{-7}$   $\mu\text{M}$  y de constante de disociación  $K_D^P$  comprendida entre  $6,0 \cdot 10^{-4}$  y  $1,8 \cdot 10^{-11}$   $\mu\text{M}$ . La matriz se llenó con los restos derivados de los valores APA medidos y los valores APA calculados a partir de los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  de la fila y columna respectivas de la matriz según la fórmula siguiente:

$$r = (APA_{medida} - APA_{calculada})^2$$

45 La combinación de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que proporciona la menor desviación constituye la combinación óptima de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que mejor explica los valores de medida. Los valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  determinados de esta manera se toman como resultado de las constantes de unión. Los valores APA calculados a partir de esta combinación de valores se muestran en la columna 4 de la tabla siguiente, y los restos se muestran en la columna 5.

|              | 1  | 2                                      | 3                             | 4  | 5      |
|--------------|--|--|-------------------------------|--|--------|
|              | Concentración de plasma humano [P] en [μM] | Concentración de ASH inmovilizada [μM] | Concentración APA medida [μM] | Concentración APA predicha con constantes óptimas [μM] | Restos |
| Columna I:   | 200  | 11,4                                   | 19,9                          | 22   | -2,1   |
|              | 200  | 20,6                                   | 20,2                          | 21,8   | -1,6   |
|              | 200  | 37,0                                   | 20,5                          | 21,5   | -1     |
|              | 200  | 66,7                                   | 19,3                          | 20,9   | -1,7   |
|              | 200  | 120,0                                  | 17,2                          | 20   | -2,8   |
| Columna II:  | 100  | 11,4                                   | 21,1                          | 21,8   | -0,7   |
|              | 100  | 20,6                                   | 22,1                          | 21,4   | 0,6    |
|              | 100  | 37,0                                   | 19,9                          | 20,9   | -1     |
|              | 100  | 66,7                                   | 18,5                          | 19,9   | -1,4   |
|              | 100  | 120,0                                  | 18,4                          | 18,3   | 0      |
| Columna III: | 50   | 11,4                                   | 20,8                          | 21,4   | -0,6   |
|              | 50   | 20,6                                   | 20,9                          | 20,8   | 0,1    |
|              | 50   | 37,0                                   | 19,2                          | 19,8   | -0,6   |
|              | 50   | 66,7                                   | 17,2                          | 18,2   | -1,1   |
|              | 50   | 120,0                                  | 16,3                          | 15,9   | 0,3    |
| Columna IV:  | 25   | 11,4                                   | 21,0                          | 20,8   | 0,1    |
|              | 25   | 20,6                                   | 19,6                          | 19,8   | -0,2   |
|              | 25   | 37,0                                   | 17,8                          | 18,3   | -0,5   |
|              | 25   | 66,7                                   | 16,1                          | 16   | 0,1    |
|              | 25   | 120,0                                  | 14,7                          | 13,1   | 1,6    |
| Columna V:   | 12,5                                       | 11,4                                   | 19,5                          | 20   | -0,6   |
|              | 12,5                                       | 20,6                                   | 18,8                          | 18,6   | 0,2    |
|              | 12,5                                       | 37,0                                   | 15,3                          | 16,4   | -1,1   |
|              | 12,5                                       | 66,7                                   | 12,8                          | 13,6   | -0,8   |
|              | 12,5                                       | 120,0                                  | 10,5                          | 10,4   | 0,2    |

5 Para este ejemplo, las constantes de disociación de liraglutida, un péptido, determinadas de esta manera son  $K_D^P = 7,53 \mu\text{M}$  y  $K_D^H = 39,6 \mu\text{M}$ . A continuación, se determina la fracción del péptido usado unido al plasma humano completo según la siguiente fórmula conocida en general,

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + [P]/K_D^P}$$

10 en la que  $[P]$  es la concentración de plasma seleccionada arbitrariamente y  $K_D^P$  es el valor, obtenido por el procedimiento de optimización, de la constante de disociación del péptido a partir del plasma. En este ejemplo, la fracción del péptido unido al plasma humano completo (sin diluir) es del 98,8 %. Esto significa que sólo el 1,2 % del péptido disuelto en el plasma está en forma libre o no unida.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para determinar constantes de unión de una sustancia o de una mezcla de sustancias con referencia a una diana disuelta y una diana inmovilizada, que comprende las etapas de

5 • incubación de una primera muestra de la sustancia o de la mezcla de sustancias con una diana inmovilizada en un vehículo sólido, preferentemente de partículas, en un primer recipiente de muestras, que contiene una solución tampón y una diana disuelta,

10 • incubación de una segunda muestra de la sustancia o de la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un vehículo sólido, preferentemente de partículas, en un segundo recipiente de muestras, que contiene solución tampón y diana disuelta,

15 • incubación de una tercera muestra de la sustancia o de la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un vehículo sólido, preferentemente de partículas, en un tercer recipiente de muestras, que contiene solución tampón y diana disuelta,

20 • incubación de una cuarta muestra de la sustancia o de la mezcla de sustancias con la diana inmovilizada en un vehículo sólido, preferentemente de partículas, en un cuarto recipiente de muestras, que contiene solución tampón y diana disuelta,

en el que

25 la primera y la segunda muestra de la sustancia se incuban con cantidades de material diferentes de la diana inmovilizada y la misma cantidad de material de la diana disuelta, la tercera y la cuarta muestra de la sustancia se incuban con las cantidades de material de la diana inmovilizada como la primera y la segunda muestra de la sustancia y con una cantidad de material idéntica de la diana disuelta, en el que la cantidad de material de la diana disuelta en los recipientes de muestra tres y cuatro difiere de la cantidad de material de la diana disuelta en los recipientes de muestra uno y dos

y

35 los recipientes de muestra en la incubación contienen el mismo volumen de fase líquida, que consiste en solución tampón, diana disuelta y muestra de sustancia,

comprendiendo además las etapas de

40 • separación del vehículo sólido, preferentemente de partículas, de los lotes de incubación respectivos,

• medida de la concentración de la sustancia que no está unida a la diana inmovilizada o de la mezcla de sustancias que no está unida a la diana inmovilizada (concentración APA) en el sobrenadante del

lote de incubación respectivo,

45 • determinación de una constante de unión de la sustancia o de la mezcla de sustancias a la diana inmovilizada y de una constante de unión de la sustancia o de la mezcla de sustancias a la diana disuelta con la ayuda de las concentraciones APA medidas,

50 • en el que las constantes de unión son constantes de disociación y la determinación de las constantes de disociación se consigue con la ayuda de la ecuación I

$$APA = \frac{c_0 \cdot K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)}{[inmoT] \cdot K_D^P + K_D^H \cdot ([P] + K_D^P)} \quad (I)$$

en el que

55 APA denota la concentración de la sustancia que no está unida a la diana inmovilizada, es decir, sustancia libre y sustancia unida a la diana disuelta,

60  $K_D^H$  denota la constante de disociación a partir de la diana inmovilizada,

$K_D^P$  la constante de disociación a partir de la diana disuelta,

$c_0$  la concentración de sustancia añadida constantemente total,

[inmoT] la concentración de la diana inmovilizada y

[P] la concentración de la diana disuelta.

- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la determinación de las constantes de disociación comprende además las etapas siguientes:
- inserción de una matriz de constantes de disociación para  $K_D^H$  y  $K_D^P$  en la ecuación I,
  - 10 • cálculo de las concentraciones APA esperadas respectivas para la matriz de constantes de disociación,
  - comparación de las concentraciones APA calculadas con la concentración APA medida,
  - selección del par de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$  que conduce a la menor divergencia entre la concentración APA calculada y la concentración APA medida como constantes de disociación especificadas de la sustancia que se someterá a prueba con respecto a la diana inmovilizada o la diana disuelta.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la selección del par de valores  $K_D^H$  y  $K_D^P$ , que conduce a la menor divergencia entre concentración APA calculada y concentración APA medida se consigue mediante un procedimiento de optimización numérica.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de la sustancia o de la mezcla de sustancias (APA) se determina en el sobrenadante del lote de incubación respectivo con respecto a una muestra de referencia.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las dianas disuelta e inmovilizada son idénticas o diferentes.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el vehículo es insoluble en solución acuosa.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el vehículo consiste en polímero orgánico o inorgánico, en particular agarosa.
- 35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el vehículo está presente en forma de partículas, en el que las partículas son al menos en parte de microescala o nanoescala.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la diana inmovilizada es albúmina.
- 40 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la diana soluble es plasma o suero de origen humano o animal.
- 45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la separación del vehículo se consigue separando el vehículo a través de la aplicación de un campo magnético.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la medida de la concentración de la sustancia o de la mezcla de sustancias se consigue por procedimientos de espectrometría de masas, espectroscopia por fluorescencia, radiactivos o cromatográficos o una combinación de estos procedimientos.
- 50 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque los recipientes de muestra son cavidades de placas de microvaloración o tienen características superficiales que no interfieren con la sustancia o con la mezcla de sustancias.