

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 807**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2016** **PCT/EP2016/069563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017** **WO17029346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2016** **E 16754484 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 3338094**

54 Título: **Inmunoensayo basado en partículas que usa un agente de unión específica a un analito pegilado**

30 Prioridad:

20.08.2015 EP 15181763

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

12.12.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ZARNT, TORALF;
HEINDL, DIETER;
NICHTL, ALFONS y
SICHERL-BIRK, FRANK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 734 807 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

Inmunoensayo basado en partículas que usa un agente de unión específica a un analito pegilado

La presente invención se refiere a un procedimiento para la medición de un analito en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, en el que dichas micropartículas se recubren con el primer socio de un par de unión, comprendiendo el procedimiento mezclar las micropartículas recubiertas, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, y una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), uniendo de este modo el analito por medio de un agente de unión específica a un analito a las micropartículas recubiertas, separar de la mezcla las micropartículas que comprenden el analito unido por medio del par de unión y el agente de unión específica a un analito y medir el analito unido a las micropartículas.

Antecedentes de la invención

Se han desarrollado numerosos procedimientos y sistemas para la detección y cuantificación de analitos de interés en muestras bioquímicas y biológicas. Los procedimientos y sistemas que pueden medir cantidades mínimas de microorganismos, productos farmacéuticos, hormonas, virus, anticuerpos, ácidos nucleicos y otras proteínas son de gran valor para los investigadores y médicos.

Muchos procedimientos de ensayo hacen uso de un agente de unión específica a un analito para capturar una molécula diana específica de interés de una muestra y permitir la determinación de la molécula diana.

Se ha desarrollado un conjunto sustancial de la técnica basado en reacciones de unión, por ejemplo, reacciones antígeno-anticuerpo, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y sistemas proteína-ligando. El alto grado de especificidad en muchos sistemas de unión bioquímicos y biológicos ha dado lugar a muchos procedimientos y sistemas de ensayo de gran valor en investigación y diagnóstico. Típicamente, la existencia de un analito de interés se indica por la presencia o ausencia de un "marcador" observable unido a uno o más de los agentes de unión específica a un analito.

La sensibilidad de los ensayos está limitada en gran medida por fenómenos de unión inespecífica. Por tanto, la principal dificultad es concebir una tecnología de ensayo que sea muy sensible y que, al mismo tiempo, no sufra intrínsecamente de una señal de fondo alta, por ejemplo, causada por el fluido problema a que se somete a prueba. La unión inespecífica da lugar, típicamente, a un aumento de la señal de fondo, a una detección inexacta y a un límite de detección más alto (peor). En particular, la unión inespecífica es aún más problemática cuando se usan matrices biológicas complejas tales como muestras plasmáticas o séricas humanas como fluidos problema.

En los últimos años se han desarrollado ensayos más exactos y sensibles que se basan en el uso de micropartículas (por ejemplo, superparamagnéticas). Especialmente en dichos ensayos basados en partículas, las importantes contribuciones a señales inespecíficas provienen de interacciones partícula-partícula y/o de interacciones partícula-superficie.

El documento US 5.212.063 divulga un procedimiento para la detección de analitos en fluidos corporales que contienen biotina libre mediante inmunoensayo que hace uso de conjugados de biotina. El documento menciona micropartículas de polímero que consisten en un núcleo y que contienen un polímero que tiene una pluralidad de sitios de unión para biotina y, como recubrimiento, al menos una capa de proteína.

El documento WO 2013/001447 describe una micropartícula prerecubierta que tiene un recubrimiento que comprende una estructura de cubierta, en la dicha estructura de cubierta comprende una primera capa que comprende una o más moléculas de afinidad (es decir, un agente de unión específica a un analito) y además una segunda capa que se une a la primera capa, y en la que dicha primera y segunda capas comprenden moléculas espaciadoras no afines que forman una malla, en la que dicha una o más moléculas de afinidad se insertan dentro de la estructura de recubrimiento y en la que dicha malla genera un impedimento estérico para moléculas inespecíficas. Usando dichas micropartículas especialmente tratadas/recubiertas, el fondo causado por la unión inespecífica se podría reducir.

Sin embargo, incluso los ensayos más avanzados todavía presentan niveles significativos de unión inespecífica que afectan al límite de detección (LDD) inferior, al intervalo de medición o a ambos. Los desarrolladores de pruebas a menudo tienen que alcanzar un compromiso entre la sensibilidad del ensayo, el intervalo de medición y la especificidad del ensayo. Al mismo tiempo, las pruebas tienen que ser rápidas, sensibles, cuantitativas, exactas e incluso rentables. Además, la plataforma en la que se va a realizar la prueba debe ser fácil de usar y fiable.

Siempre existe un deseo de mejorar los ensayos incrementando la proporción de la señal frente al ruido de fondo y, por lo tanto, la sensibilidad del ensayo. Incrementar la señal de un ensayo también tiene varias ventajas instrumentales, que incluyen: i) se requieren sistemas de detección menos sensibles (y menos costosos); ii) se requieren cantidades más pequeñas de muestras valiosas; iii) la instrumentación se puede miniaturizar para permitir instrumentos que sean más pequeños y/o dispositivos que ejecuten muchos ensayos simultáneamente en un área pequeña.

Sin embargo, especialmente en ensayos basados en partículas, las contribuciones importantes a señales inespecíficas provienen de interacciones partícula-partícula e interacciones partícula-superficie.

Por tanto, existe la necesidad de diseñar novedosas estructuras y procedimientos para mejorar los procedimientos de ensayo basados en partículas. Existe una gran necesidad de evitar la unión inespecífica a micropartículas y su agrupamiento, que es un factor limitante en un gran número de ensayos de detección.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que las moléculas de conector que comprenden entre 12 y 30 unidades de polietilenglicol, unidas por una parte a un miembro de un par de unión y por otra parte a un agente de unión específica a un analito, se pueden usar con gran ventaja en un ensayo de unión basado en micropartículas, en el que las micropartículas se recubren con el otro miembro del par de unión.

Sumario de la invención

Se divulga un procedimiento para la medición de un analito en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, en el que dichas micropartículas se recubren con el primer socio de un par de unión, comprendiendo el procedimiento a) mezclar las micropartículas recubiertas, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, y una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), uniendo de este modo el analito por medio de un agente de unión específica a un analito a las micropartículas recubiertas, b) separar de la mezcla las micropartículas que comprenden el analito unido por medio del par de unión y el agente de unión específica a un analito y c) medir el analito unido a las micropartículas.

También se divulga un kit que comprende, en recipientes separados o en compartimientos separados de una unidad de recipiente único, al menos micropartículas recubiertas con el primer miembro de un par de unión y un agente de unión específica a un analito unido al segundo miembro de este par de unión, en el que dicho segundo miembro de dicho par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30).

Divulgación detallada de la invención

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la medición de un analito en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, en el que dichas micropartículas se recubren con el primer socio de un par de unión, comprendiendo el procedimiento a) mezclar las micropartículas recubiertas, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, y una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), uniendo de este modo el analito por medio de un agente de unión específica a un analito a las micropartículas recubiertas, b) separar de la mezcla las micropartículas que comprenden el analito unido por medio del par de unión y el agente de unión específica a un analito y c) medir el analito unido a las micropartículas.

Los ensayos de unión específica a un analito basados en partículas se usan ampliamente en, por ejemplo, determinados ensayos nefelométricos, determinados ensayos de aglutinación en látex y muchos ensayos sensibles de tipo sándwich que emplean una amplia variedad de técnicas de marcado o detección.

Una "partícula", como se usa en el presente documento, significa un objeto pequeño y localizado al que se le puede atribuir una propiedad física tal como volumen, masa o tamaño promedio. En consecuencia, las micropartículas pueden ser de conformación simétrica, globular, esencialmente globular o esférica, o pueden tener una forma o conformación irregular y asimétrica. El tamaño de una partícula prevista por la presente invención puede variar. En un modo de realización usado son de conformación globular, por ejemplo, micropartículas con un diámetro en el intervalo de nanómetros y micrómetros. En un modo de realización, las micropartículas usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación tienen un diámetro de 50 nanómetros a 20 micrómetros. En otro modo de realización, las micropartículas tienen un diámetro de entre 100 nm y 10 μ m. En un modo de realización, las micropartículas usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación tienen un diámetro de 200 nm a 5 μ m o de 750 nm a 5 μ m.

Las micropartículas como se definen anteriormente en el presente documento pueden comprender o consistir en cualquier material adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, pueden comprender o consistir en o consistir esencialmente en material orgánico o inorgánico. Típicamente, pueden comprender o consistir en o consistir esencialmente en metal o una aleación de metales, o un material orgánico, o comprender o consistir en o consistir esencialmente en elementos de hidrato de carbono. Los ejemplos de material previsto para micropartículas incluyen agarosa, poliestireno, látex, poli(alcohol vinílico), sílice y metales ferromagnéticos, aleaciones o materiales de composición. En un modo de realización, las micropartículas son metales magnéticos o ferromagnéticos, aleaciones o composiciones. En otros modos de realización, el material puede tener propiedades específicas y, por ejemplo, ser hidrófobo o hidrófilo. Dichas micropartículas se dispersan típicamente en soluciones acuosas y retienen una pequeña carga superficial negativa que mantiene las micropartículas separadas y evita su agrupación inespecífica.

En un modo de realización de la presente invención, las micropartículas son micropartículas paramagnéticas y la separación de dichas partículas en el procedimiento de medición de acuerdo con la presente divulgación se facilita mediante fuerzas magnéticas. Se aplican fuerzas magnéticas para extraer las partículas paramagnéticas o magnéticas de la solución/suspensión y para retenerlas como se desee, mientras que el líquido de la solución/suspensión se puede eliminar y las partículas, por ejemplo, se pueden lavar.

Las micropartículas usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente invención se recubren con el primer miembro de un par de unión específico.

Un "par de unión", como se usa en el presente documento, consiste en dos socios que se unen entre sí con alta afinidad, es decir, con una afinidad nanomolar o mejor. Los modos de realización para los pares de unión son, por ejemplo, los pares de unión que consisten en receptor y ligando, hapteno y anticuerpo antihapteno, y pares de unión basados en los pares de unión de alta afinidad naturales.

Un ejemplo de un par de unión receptor-ligando es un par que consiste en un receptor de hormona esteroide y la hormona esteroide correspondiente.

Un tipo de par de unión que es adecuado para el procedimiento de acuerdo con la presente invención es un par de unión de hapteno y anticuerpo antihapteno. Un hapteno es una molécula orgánica con un peso molecular de 100 a 2000 Dalton, preferentemente de 150 a 1000 Dalton. Dicha molécula pequeña se puede volver inmunogénica al acoplarla a una molécula portadora y se pueden generar anticuerpos antihapteno de acuerdo con los procedimientos estándar. El hapteno se puede seleccionar del grupo que comprende esteroides, ácidos biliares, hormonas sexuales, corticoides, cardenólidos, glucósidos cardenólidos, bufadienólidos, sapogeninas de esteroides y alcaloides esteroides, cardenólidos y glucósidos cardenólidos. Representantes de estas clases de sustancias son la digoxigenina, la digitoxigenina, la gitoxigenina, la estrofantidina, la digoxina, la digitoxina, la ditoxina y la estrofantina. Otro hapteno adecuado es, por ejemplo, la fluoresceína.

Ejemplos de pares de unión basados en pares de unión de alta afinidad naturales son biotina o análogos de la biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina, y avidina o estreptavidina, así como el par de unión de FimG y DsF. El par de unión biotina-(estrept)avidina es bien conocido en la técnica. Los principios básicos del par de unión FimG-DsF se describen, por ejemplo, en el documento WO2012/028697.

En un modo de realización, los pares de unión se seleccionan de hapteno y anticuerpo antihapteno, biotina o análogos de la biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina y avidina o estreptavidina, FimG y DsF, y receptor y ligando.

En un modo de realización, los pares de unión se seleccionan de hapteno y anticuerpo antihapteno, y biotina o análogos de la biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, FimG y DsF.

En un modo de realización, el par de unión es biotina (o análogos de la biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina) y avidina o estreptavidina.

En un modo de realización, el par de unión consiste en biotina y estreptavidina.

En un modo de realización, el par de unión de acuerdo con la presente invención consiste en un primer socio de dicho par de unión que tiene un peso molecular de 10 kD o más y de un segundo socio de dicho par de unión que tiene un peso molecular de 1 kD o menos. Como se indica anteriormente, el primer socio de un par de unión, en un modo de realización que tiene un peso molecular de 10 kD o más, se une a (recubre) las micropartículas usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación.

En un modo de realización en el procedimiento basado en micropartículas de acuerdo con la presente divulgación, dicho primer socio del par de unión se selecciona de avidina y/o estreptavidina, y FimG, respectivamente, y en el que dicho segundo socio del par de unión se selecciona de biotina o análogos de la biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina y DsF, respectivamente.

En un modo de realización en el procedimiento basado en micropartículas de acuerdo con la presente divulgación, dicho primer socio del par de unión es avidina y/o estreptavidina y en el que dicho segundo socio del par de unión es biotina.

Las micropartículas usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente invención se recubren con el primer socio de un par de unión. Dicho recubrimiento se realiza de acuerdo con los procedimientos del estado de la técnica. El primer socio del par de unión se puede unir a la superficie de la partícula por adsorción, por unión covalente o una combinación de ambos procedimientos. Opcionalmente, las micropartículas se pueden incubar además, por ejemplo, con proteínas, como seroalbúmina bovina, para reducir la unión inespecífica de otros componentes del ensayo. El experto es plenamente consciente de los procedimientos usados para dicho bloqueo opcional de la unión inespecífica. De acuerdo con la terminología usada en la técnica, dichas micropartículas recubiertas y bloqueadas también se denominan simplemente micropartículas recubiertas.

Las moléculas del primer socio del par de unión están presentes en la micropartícula en estrecha proximidad, lo que proporciona muchos sitios de unión cercanos para el segundo socio de este par de unión. Para las aplicaciones más prácticas/rutinarias, el primer socio del par de unión se aplica como recubrimiento de las micropartículas a una concentración de saturación, lo que da como resultado una densidad de recubrimiento óptima. Como los expertos aprecian, la densidad de recubrimiento, si se desea, se podría reducir usando concentraciones subóptimas del primer socio de un par de unión. En caso de que se usara para el recubrimiento una concentración subóptima del primer socio de un par de unión, el experto en la técnica elegiría la densidad de recubrimiento promedio para que se ajuste a la longitud del conector usado para la unión del agente de unión específica a un analito al segundo socio del par de unión. En términos generales: La distancia promedio entre las moléculas de un primer socio de un par de unión en una micropartícula recubierta será como máximo el doble de la longitud del conector usado para unir el agente de unión específica a un analito al segundo socio del par de unión. La distancia según el presente documento es desde el centro de una molécula al centro de otra molécula. Como ejemplo: La longitud promedio de una unidad de polietilenglicol es de aproximadamente 0,38 nm. Por tanto, un conector con 12 unidades PEG tiene aproximadamente 4,5 nm de longitud. Para permitir que las moléculas del segundo socio de un par de unión se unan a los primeros socios de dicho par de unión en la misma micropartícula, la distancia promedio entre las moléculas del primer socio del par de unión en la partícula sería de 9 nm o menos. En un modo de realización, la distancia promedio de las moléculas del primer socio de un par de unión es de 9 nm o menos. En un modo de realización, la distancia promedio de las moléculas del primer socio de un par de unión es de 9 nm u 8 nm, respectivamente. En un modo de realización se usan micropartículas que se han recubierto a una concentración de saturación de/con el primer socio de un par de unión.

Un "analito" o "analito de interés" o "molécula diana" puede ser cualquier molécula que se pueda unir por un agente de unión específica a un analito. En un modo de realización, un analito dentro del contexto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico (ADN o ARN), un péptido, una proteína, una molécula de fármaco, una hormona o una vitamina. En un modo de realización, un analito dentro del contexto de la presente invención es un péptido, una proteína, una molécula de fármaco, una hormona o una vitamina.

Se pueden usar muestras líquidas en un procedimiento para la detección *in vitro* específica de un analito en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación. Se puede saber que la muestra comprende el analito o se puede sospechar que comprende el analito. En un modo de realización, una muestra para diagnóstico *in vitro* usada en un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación es un fluido corporal seleccionado de sangre completa, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, líquido amniótico, orina o saliva. En un modo de realización, la muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito es suero, plasma o líquido amniótico. En un modo de realización, la muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito es suero o plasma.

El procedimiento para la medición de un analito de acuerdo con la presente divulgación hace uso de un agente de unión específica a un analito. El término "agente de unión específica a un analito" se refiere a una molécula que se une específicamente al analito de interés. Un agente de unión específica a un analito en el sentido de la presente divulgación comprende típicamente moléculas de unión o captura que se pueden unir a un analito (otros términos son analito de interés; molécula diana). En un modo de realización, el agente de unión específico de analito tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol por su molécula diana correspondiente, es decir, el analito. El agente de unión específica a un analito en otros modos de realización tiene una afinidad de 10^8 l/mol o incluso de 10^9 l/mol por su molécula diana. Como el experto en la técnica apreciará, el término "específico" se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para el analito. En algunos modos de realización, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana da como resultado una afinidad de unión que es solo un 10 %, más preferentemente solo un 5 % de la afinidad de la molécula diana o menos. En un modo de realización no se puede medir la afinidad de unión a otras moléculas distintas del analito. En un modo de realización, el agente de unión específica a un analito cumplirá los criterios mínimos anteriores tanto para la afinidad como para la especificidad.

En un modo de realización, el agente de unión específica a un analito se selecciona del grupo que consiste en aptámeros, aptámeros peptídicos, proteínas, oligonucleótidos y polímeros de impresión molecular.

5 Un "aptámero", como se usa dentro del contexto de un agente de unión específica a un analito, puede ser una molécula de ácido nucleico corta, por ejemplo, una molécula de ARN, ADN, PNA, CNA, HNA, LNA o ANA o cualquier otro formato de ácido nucleico adecuado conocido por experto en la técnica, que se pueda unir a un analito.

10 Los aptámeros peptídicos son aptámeros que se pueden unir específicamente a proteína(s), polipéptido(s) o péptido(s) que comprenden una secuencia de aminoácidos específica. Típicamente, un aptámero peptídico tiene un bucle peptídico, que comprende, por ejemplo, de 10 a 20 aminoácidos. En el contexto de la presente divulgación, un aptámero peptídico se puede unir en modos de realización específicos en uno o ambos extremos a una estructura de andamiaje. La estructura de andamiaje puede ser cualquier molécula, preferentemente una proteína, por ejemplo una proteína, que tenga buenas propiedades de solubilidad. Las moléculas de andamiaje adecuadas serían conocidas por el experto en la técnica. Los ejemplos de moléculas de andamiaje adecuadas se basan en la proteína bacteriana tiorredoxina A, y chaperonas FkpA o SlyD, respectivamente. El bucle peptídico del aptámero se puede insertar preferentemente dentro de un sitio activo reductor de la molécula de andamiaje. De forma alternativa, la proteína A estafilocócica y dominios de la misma y derivados de estos dominios, tales como proteína Z o lipocalinas, se pueden usar como aptámeros peptídicos.

20 Los aptámeros de ácido nucleico o péptido se pueden generar de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo, por medio de PCR o enfoques de síntesis molecular o enfoques de doble híbrido de levaduras.

25 Un "péptido", como se usa dentro del contexto de un agente de unión específica a un analito, puede comprender o, de forma alternativa, consistir en un tramo de 2 a 49 aminoácidos, derivados de aminoácidos o una mezcla de los mismos. El péptido puede ser lineal, ramificado, circular o una mezcla de los mismos. Un agente de unión específica a un analito peptídico también se puede unir a una estructura de andamiaje como se define anteriormente en el presente documento.

30 Un "polipéptido" o "proteína", como se usa dentro del contexto de un agente de unión específica a un analito, puede comprender o, de forma alternativa, consistir en un tramo de más de aproximadamente 50 aminoácidos, derivados de aminoácidos o una mezcla de los mismos. La proteína puede tener una forma lineal, ramificada y circular o estar compuesta de una mezcla de estas formas.

35 En un modo de realización, el agente de unión específica a un analito es un polipéptido de al menos 50 aminoácidos. Aunque en teoría no hay un límite superior para la longitud del polipéptido de un agente de unión específica a un analito, en un modo de realización tendrá como máximo 10 000 aminoácidos.

40 Un "oligonucleótido", como se usa dentro del contexto de un agente de unión específica a un analito, puede comprender o, de forma alternativa, consistir en un tramo de 10 a 120 nucleótidos, o de 12 a 60, o de 15 a 40 nucleótidos.

45 Un agente de unión específica a un analito que sea un oligonucleótido puede ser una molécula de ARN o una molécula de ADN, o una mezcla de ambas.

50 El término "polímero de impresión molecular", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que se formó en presencia de una molécula que se extrae posteriormente, dejando una cavidad complementaria (una impresión) detrás. Típicamente, un polímero de impresión molecular muestra una determinada afinidad química por la molécula original. Un polímero de impresión molecular puede estar compuesto de cualquier unidad polimérica adecuada conocida por el experto en la técnica. Las técnicas para su producción incluyen técnicas de polimerización tales como polimerización en masa, por precipitación, por emulsión, por suspensión, por dispersión, por gelación, por hinchamiento en múltiples etapas y procedimientos de impresión jerárquica.

55 Un "anticuerpo", como se usa en el contexto de un agente de unión específica a un analito, se refiere a una molécula de inmunoglobulina y a una porción (fragmento) inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina, es decir, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente al analito. Las moléculas de inmunoglobulina usadas en un procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos se pueden describir o especificar en términos del(de los) epítipo(s) o porción(es) de un polipéptido que reconocen o al que se unen específicamente. Los epítopos específicos y su interacción con anticuerpos serían conocidos por los expertos en técnica.

El término "unión específica a un analito", como se usa en el contexto de un anticuerpo, se refiere a la unión inmuno-específica de un anticuerpo a un epítipo en el analito. El concepto de unión específica a un analito de un anticuerpo por medio de su epítipo en un analito está completamente claro para el experto en la técnica.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos diferentes, y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo en el sentido de la presente divulgación también puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otras una o más proteínas o péptidos.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % en peso de anticuerpo y, en algunos modos de realización, a más de un 99 % según se determina por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con azul de Coomassie o plata.

Los anticuerpos de la clase de la inmunoglobulina G son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos de inmunoglobulina diferentes. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar "VH". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar "VL". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en las secuencias entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , que se conectan mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Se pueden asignar las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los anticuerpos usados en un procedimiento de acuerdo con la presente invención pueden ser de cualquier origen animal. En un modo de realización, los anticuerpos son anticuerpos humanos, murinos (por ejemplo, de ratón y rata), de burro, mono, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo o pollo.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.*, *Cellular and Mol. Immunology*, 4.^a ed. (W. B. Saunders, Co., 2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente inalterada, no a fragmentos de anticuerpo como se definen más adelante. Los términos se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo inalterado, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; moléculas de anticuerpo monocatenario; scFv, sc(Fv)₂; diacuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de cadena pesada y ligera, y contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para un Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden unir covalentemente un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada mediante un conector peptídico flexible, de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario (sc(Fv)₂). Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Conjuntamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a que los dominios se emparejen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en el documento EP 404097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Holliger *et al.*, *PNAS USA* 90: 6444-6448 (1993). También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades menores. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de distintos anticuerpos. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único entre una pluralidad de clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fagos o clones de ADN recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada se puede alterar además, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a la diana alterada es también un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, el procedimiento del hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Haemmerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *PNAS USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o la totalidad de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, el documento WO 1998/24893; el documento WO 1996/34096; el documento WO 1996/33735; el documento WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *PNAS USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425 y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, *PNAS USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, por la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales ("FR") de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden elaborar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.* *PNAS USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de un anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Varias delimitaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las HVR que son regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan en el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(Numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones de HVR extendidas.

La expresión "numeración de residuos de dominio variable según Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos según Kabat", y las variaciones de la misma, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de residuos de Kabat se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "estándar".

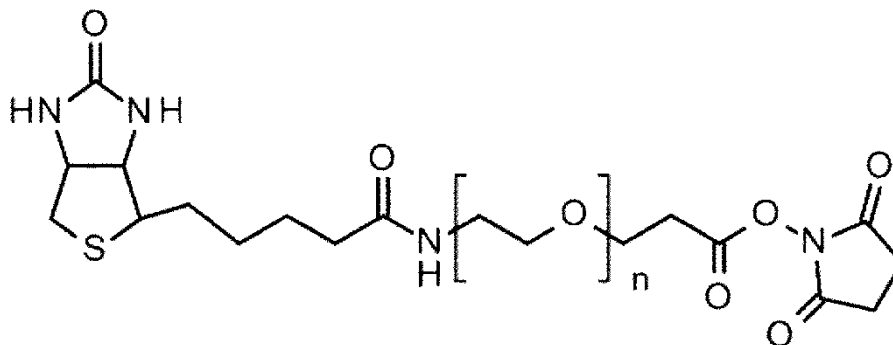
Como se divulga en el presente documento, el segundo socio del par de unión se une al agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30).

El término "conector" indica un resto bifuncional o multifuncional que se puede usar para conjugar (enlazar) un primer resto con un segundo resto o más restos. Se pueden preparar convenientemente conjugados que comprenden un primer y un segundo resto unidos entre sí usando un conector que tiene dos funcionalidades reactivas. En dicho conjugado, los dos restos se unen "por medio de" este conector. Como es obvio para el experto en la técnica, en dicho conjugado, los restos funcionales del conector están presentes como parte de un enlace y no como un resto funcional sin reaccionar.

Sin querer limitarse por la teoría, se cree que el conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol es clave para los hallazgos sorprendentes divulgados en el presente documento. En la técnica anterior en ensayos basados en micropartículas para la medición de un analito solo se consideran seriamente las moléculas cortas de conector que contienen PEG. El documento US 5.521.319 divulga un novedoso reactivo que demostró ser muy útil para la biotinylation de biomoléculas. Se enseña que la longitud del conector es corta, es decir, hasta 5 unidades de óxido de etileno, preferentemente de solo 1 a 3 unidades de óxido de etileno y lo más preferente de

dos de dichas unidades. Contrariamente a esta enseñanza, ahora se ha encontrado sorprendentemente que, en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, las moléculas de conector largas, que comprenden entre 12 y 30 unidades de óxido de etileno (= PEG 12 a 30), son ventajosas si se usan para acoplar el segundo miembro de un par de unión, por ejemplo, una biotina, al agente de unión específica a un analito.

Un reactivo apropiado para unir o acoplar biotina por medio de un conector PEG a una molécula diana es, por ejemplo, un reactivo de acuerdo con la fórmula I



Como se apreciará, (n) en la fórmula I se refiere al número de unidades de etilenglicol. n es preferentemente de 12 a 30.

Los procedimientos de la invención se pueden construir en una amplia variedad de formatos. Dichos formatos incluyen formatos conocidos en la técnica, tales como ensayos tipo sándwich y ensayos de unión competitiva (véanse, por ejemplo, las siguientes referencias: *Nonradioactive Labeling and Detection of Molecules*, Kessler, C., ed., Springer-Verlag: Berlín 1992; *The Immunoassay Handbook*, Wild, D., ed., Stackton Press: New York 1994; Keller, G.H. y Manak, M.M. *DNA Probes*, 2.^a Ed., MacMillan Publishers Ltd.: London, 1993; *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 2.^a Edición, Burtis *et al.* Ed., W.B. Saunders and Co.: Philadelphia, 1994).

En un procedimiento de acuerdo con la presente divulgación se mide un analito. Como el experto en la técnica apreciará fácilmente, la medición del analito unido a las micropartículas se realiza normalmente mediante la medición de una señal transportada o generada por un marcador en un componente de ensayo apropiado y calculando la concentración del analito a partir de una curva de calibración para el analito, es decir, midiendo de este modo el analito. El componente del ensayo al que normalmente se acopla un marcador es un segundo agente de unión específica a un analito (ensayos tipo sándwich) o el ensayo hace uso de la competencia entre un analito marcado y el analito en la muestra. Antes de medir el marcador, las micropartículas que comprenden parte del componente de ensayo marcado se separan de la parte del componente de ensayo marcado que no está unido a las micropartículas.

En un modo de realización, los procedimientos de la presente divulgación se practican en un formato de ensayo tipo sándwich.

Un formato de ensayo típicamente de tipo sándwich incluye mezclar una micropartícula recubierta con el primer socio de un par de unión, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), y un segundo agente de unión específica a un analito que está marcado de manera detectable. Como es obvio para el experto en la técnica, estos componentes se mezclan e incuban durante un período de tiempo suficiente para unir al agente de unión específica a un analito marcado de manera detectable por medio del analito, el agente de unión específica a un analito (unido a) el segundo socio del par de unión y el primer socio del par de unión a las micropartículas. En un modo de realización, un ensayo tipo sándwich sin etapa de lavado, dicha mezcla/incubación se realiza en un solo recipiente de reacción. La secuencia de adición y mezcla de los cuatro ingredientes (micropartículas recubiertas, muestra, agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión y agente de unión específica a un analito marcado de manera detectable, respectivamente) no es crítica. En un modo de realización, un ensayo tipo sándwich con una etapa de lavado, la adición y mezcla de micropartículas recubiertas con el primer miembro de un par de unión, la muestra y el agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión se realizan en un solo recipiente de reacción. Después de esta primera etapa (captura de analito), se lavan las micropartículas a las que ahora está unido el analito antes de añadir el agente de unión específica a un analito marcado de manera detectable. La secuencia de adición y mezcla de los tres primeros ingredientes (micropartículas recubiertas, muestra y agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, respectivamente) no es crítica.

En un formato de ensayo tipo sándwich en un modo de realización, el agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión y el agente de unión específica a un analito marcado de manera detectable, respectivamente, se unen cada uno al analito en epítomos diferentes y no superponibles.

- 5 En un modo de realización, los procedimientos de acuerdo con la presente invención se practican en un formato de ensayo competitivo.

Un formato de ensayo típicamente competitivo incluye mezclar una micropartícula recubierta con el primer socio de un par de unión, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), y una cantidad de analito que está marcado de manera detectable. Como es obvio para el experto en la materia, estos componentes se mezclan e incuban durante un período de tiempo suficiente para unir la fracción del analito marcado de manera detectable que, después de la competencia por el analito en la muestra, se puede unir a las micropartículas por medio del agente de unión específica a un analito (unido a) el segundo socio del par de unión y el primer socio del par de unión que recubre las micropartículas.

Los procedimientos para marcar un agente de unión específica a un analito o de un analito son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen abundantemente, por ejemplo, en Haugland (2003) *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labeling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer *et al.* *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. y Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I y II, CRC Press, New York; Pfeleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; y Wong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); DeLeon-Rodriguez *et al.*, *Chem. Eur. J.* 10 (2004) 1149-1155; Lewis *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 320-324; Li *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 13 (2002) 110-115; Mier *et al.* *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 240-237.

El término "marcado de forma detectable" engloba marcadores que se pueden detectar directa o indirectamente.

Marcado indirectamente de forma detectable se refiere, por ejemplo, al marcado con un hapteno y a la detección de dicho compuesto haptenilado por un anticuerpo antihapteno que lleva un marcador directamente detectable o al marcado con una enzima y a la detección de dicha enzima por su actividad enzimática correspondiente que da como resultado la conversión de un sustrato de tinción apropiado. Se encuentran disponibles o se divulgan diversos marcadores enzimáticos de sustrato (véase, por ejemplo, el documento US 4.275.149). En general, la enzima cataliza una alteración química de un sustrato cromógeno que se puede medir usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que se puede medir espectrofotométricamente. De forma alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y puede a continuación emitir luz que se puede medir (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; documento US 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), 3-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con polipéptidos se describen en O'Sullivan *et al.* "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzym.* (ed. por J. Langone e IT Van Vunakis), Academic Press, New York, 73 (1981) 147-166.

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato (documento US 4.275.149; documento US 4.318.980) incluyen, por ejemplo: peroxidasa de rábano picante (HRP) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de tinte (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)); fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromógeno; y 3-D-galactosidasa (3-D-Gal) con un sustrato cromógeno (por ejemplo, *p*-nitro-fenil-3-D-galactosidasa) o sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil-3-D-galactosidasa.

Los marcadores directamente detectables proporcionan una señal detectable o interactúan con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o el segundo marcador, por ejemplo, para dar FRET (transferencia de energía fluorescente por resonancia). Marcadores tales como tintes fluorescentes y tintes luminiscentes (incluyendo quimioluminiscentes y electroquimioluminiscentes) (Briggs *et al.* "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1* (1997) 1051-1058) proporcionan una señal detectable y son aplicables, en general, para el

marcado. En un modo de realización, "marcado de forma detectable" se refiere a un marcador que proporciona o al que se puede inducir para proporcionar una señal detectable, es decir, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o un marcador electroquimioluminiscente, respectivamente.

5 En un modo de realización de acuerdo con la presente divulgación, el ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas hace uso de un marcador quimioluminiscente o electroquimioluminiscente y un sistema de detección de luz correspondiente. La luz producida por el marcador se mide e indica directa o indirectamente la presencia o la cantidad del analito.

10 Los ensayos de electroquimioluminiscencia (ECL) proporcionan una medición sensible y precisa de la presencia y concentración de un analito de interés. Dichas técnicas utilizan marcadores u otros reactantes en los que se puede inducir luminiscencia cuando se oxidan o reducen electroquímicamente en un entorno químico apropiado. Dicha electroquimioluminiscencia se activa por una tensión impuesta sobre un electrodo de trabajo en un momento particular y de una manera particular. La luz producida por el marcador se mide e indica la presencia o la cantidad del analito. Para una descripción más completa de dichas técnicas de ECL, se hace referencia a la patente de EE. UU. n.º 5.221.605, la patente de EE. UU. n.º 5.591.581, la patente de EE. UU. n.º 5.597.910, la solicitud publicada PCT WO90/05296, la solicitud publicada PCT WO92/14139, la solicitud publicada PCT WO90/05301, la solicitud publicada PCT WO96/24690, la solicitud publicada PCT US95/03190, la solicitud PCT US97/16942, la solicitud publicada PCT US96/06763, la solicitud publicada PCT WO95/08644, la solicitud publicada PCT WO96/06946, la solicitud publicada PCT WO96/33411, la solicitud publicada PCT WO87/06706, la solicitud publicada PCT WO96/39534, la solicitud publicada PCT WO96/41175, la solicitud publicada PCT WO96/40978, PCT/US97/03653 y la solicitud de patente de EE. UU. 08/437,348 (patente de EE. UU. n.º 5.679.519). También se hace referencia a una revisión de 1994 de las aplicaciones analíticas de ECL por Knight, *et al.* (Analyst, 1994, 119: 879-890) y las referencias citadas en la misma. En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la presente descripción se practica usando un marcador electroquimioluminiscente.

30 Como se menciona anteriormente, la electroquimioluminiscencia se activa por una tensión impuesta en un electrodo de trabajo en un momento particular y de una manera particular. Lo que no se menciona en detalle en la técnica anterior es el hecho de que la distribución de micropartículas en el electrodo de trabajo tiene un impacto importante en la calidad de un ensayo. Cuantos más agregados hay presentes entre las micropartículas, como regla general, menor será la calidad de una o más características del ensayo. Las partículas agregadas a menudo dan lugar a un mayor coeficiente de variación entre mediciones, a señales de fondo más altas y/o a sensibilidad de ensayo reducida.

35 Como se puede imaginar fácilmente, el uso de un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión y que comprende dos o más moléculas del segundo socio de unión por cada molécula del agente de unión específica a un analito puede fácilmente dar lugar a la agregación de micropartículas recubiertas con (muchas moléculas de) el primer socio del par de unión. Por lo tanto, en la técnica anterior se han hecho muchos intentos de producir conjugados que consisten en una molécula de agente de unión específica a un analito y una molécula del segundo socio del par de unión. Los procedimientos apropiados para obtener dichos conjugados 1:1 se describen, por ejemplo, en el documento US 6.391.571.

45 Uno de los enfoques recientes más importantes para el marcado de proteínas específicas de sitio, especialmente el monomarcado de proteínas específicas de sitio, consiste en incorporar funcionalidades bioortogonales a estas proteínas en sitios específicos por medio de reacciones enzimáticas. Para una revisión reciente sobre el "marcado enzimático de proteínas", véase M. M. Rashidian *et al.*, Bioconjugate Chemistry 24 (2013) 1277-1294. Las enzimas usadas para la conjugación específica de sitio que se trata en esta revisión incluyen la enzima generadora de formilglicina, sialiltransferasas, fosfopanteteiniltransferasas, modificación postraducciona de O-GlcNAc, transpeptidación mediada por sortasa ("sortagging"), transglutaminasa, farnesiltransferasa, ligasa de biotina, ligasa de ácido lipico, y ácido N-miristoiltransferasa.

50 Sorprendentemente, como se muestra a lo largo de la sección de ejemplos, un agente de unión específica a un analito unido a una única molécula del segundo socio del par de unión por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), por ejemplo, un anticuerpo monobiotinilado, da lugar a un rendimiento de ensayo muy bueno tanto con respecto al coeficiente de variación como a la relación señal/ruido.

55 Además, el uso de un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), parece no requerir monobiotinilación o retirada de conjugados de una estequiometría superior a 1:1 obtenida mediante el uso de la química de acoplamiento estándar. Como se esperaba, las preparaciones de conjugados que comprenden conjugados de estequiometría superior a 1:1 tienden a dar lugar a la agregación en microesferas. Sin embargo, este efecto es mucho menos visible y pronunciado si el segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), incluso a una estequiometría superior a 1:1.

Sin querer limitarse por esta teoría, una posible explicación podría ser que estos conectores de PEG relativamente largos y flexibles permiten la unión rápida de muchos de los segundos socios del par de unión a los sitios de unión del primer socio de dicho par de unión presente y dentro del alcance de las micropartículas recubiertas. Por el contrario, los varios segundos socios de un par de unión en un agente de unión específica a un analito pueden tener conectores demasiado cortos para unirse a otro primer socio de unión en la misma micropartícula y tienden a encontrar un primer socio de unión apropiado en una segunda micropartícula, promoviendo obviamente de este modo una tendencia a la agregación en microesferas. Las figuras 1 y 2 son intentos de ilustrar esquemáticamente esta teoría.

Para evitar el "sobremarcado" con el segundo socio del par de unión, la química hasta ahora estándar debe usar una proporción relativamente baja del agente de unión específica a un analito y del segundo miembro del par de unión. Para lograr una estequiometría 1:1 de una preparación de conjugado en promedio, el segundo socio del par de unión (por ejemplo, biotina en un reactivo de biotilación) se usa normalmente en un exceso de 1,3 veces con respecto al agente de unión específica a un analito (por ejemplo, un anticuerpo). En dichas condiciones de acoplamiento de 1,3 a 1, la preparación de conjugado resultante comprende aproximadamente un 37 % de anticuerpo no conjugado; aproximadamente un 37 % del anticuerpo monobiotinilado, pero también un 18 %, un 6 % y un 2 % de anticuerpo con biotilación doble, triple o más que triple, respectivamente. Normalmente, la fracción que representa el conjugado 1:1 se debe purificar para lograr resultados óptimos en un inmunoensayo comercial.

Por el contrario, si el segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), se puede usar la química de acoplamiento estándar, incluso con el segundo miembro del par de unión que se va a acoplar/unir en proporciones molares más altas, y no requerir el aislamiento de la fracción que comprende los conjugados 1:1. Como es obvio, además del rendimiento de dichos conjugados en los procedimientos divulgados en el presente documento, esto es una tremenda ventaja en la producción de dichos conjugados.

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un agente de unión específica conjugado unido al segundo socio del par de unión comprendido en una composición, en el que en dicha composición la proporción molar promedio entre el segundo socio del par de unión unido al agente de unión específica a un analito es 1,1 o más.

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un agente de unión específica conjugado unido al segundo socio del par de unión comprendido en una composición, en el que en dicha composición la proporción molar promedio entre el segundo socio del par de unión unido al agente de unión específica a un analito es entre 1,1 y 10.

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un agente de unión específica conjugado unido al segundo socio del par de unión comprendido en una composición, en el que en dicha composición la proporción molar promedio entre el segundo socio del par de unión unido al agente de unión específica a un analito es entre 1,2 y 6.

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para la medición de un analito en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, en el que dichas micropartículas se recubren con el primer socio de un par de unión, comprendiendo el procedimiento a) mezclar las micropartículas recubiertas, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, y una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), uniendo de este modo el analito por medio de un agente de unión específica a un analito a las micropartículas recubiertas y en el que dicho agente de unión específica conjugado unido al segundo socio del par de unión está comprendido en una composición, en el que en dicha composición la proporción molar promedio entre el segundo socio del par de unión unido al agente de unión específica a un analito es 1,1 o más, b) separar de la mezcla las micropartículas que comprenden el analito unido por medio del par de unión y el agente de unión específica a un analito y c) medir el analito unido a las micropartículas.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un kit que comprende, en recipientes separados o en compartimentos separados de una unidad de recipiente único, al menos micropartículas recubiertas con un primer socio de un par de unión y un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio de dicho par de unión, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30).

El término "unidad de recipiente único" se refiere al hecho de que para muchos analizadores automáticos, como la serie de analizadores Elecsys® de Roche diagnostics, los reactivos necesarios para medir un determinado analito se proporcionan en forma de un "paquete de reactivos", es decir, como una unidad de recipiente que se

coloca en el analizador y que contiene en diferentes compartimentos todos los reactivos clave necesarios para la medición del analito de interés.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un kit en el que dicho primer socio de un par de unión es avidina o estreptavidina, y en el que dicho segundo socio de dicho par de unión se selecciona de biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina.

En un modo de realización, la presente divulgación se refiere a un kit que comprende, en recipientes separados o en compartimentos separados de una unidad de recipiente único, al menos micropartículas recubiertas con avidina o estreptavidina, y un agente de unión específica a un analito biotinilado, en el que dicha biotina se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30).

Descripción de las figuras

Figura 1 Ilustración esquemática de la agregación en microesferas causada por un agente de unión específica a un analito unido a varios restos de biotina (Bi) por medio de un conector del estado de la técnica y la unión a moléculas de estreptavidina (cruces en las microesferas) en diferentes microesferas.

Figura 2 Ilustración esquemática de la ausencia de agregación en microesferas debido al uso de un agente de unión específica a un analito unido a varios restos de biotina (Bi) por medio de un conector que comprende entre 12 y 30 unidades de etilenglicol y la unión a moléculas de estreptavidina (cruces en las microesferas) en la misma microesfera.

Figura 3 Patrón de microesferas en el electrodo de medición (de trabajo) de un analizador cobas® e601 automatizado (Roche Diagnostics GmbH) como se obtuvo en un ensayo experimental de antígeno central del VHC con Biotina-DDS para biotinilación: Las dos imágenes de la fila superior representan la distribución de las microesferas en una muestra negativa o de control. Las dos imágenes de la fila inferior representan la distribución de las microesferas en una muestra positiva para el VHC. Las dos imágenes del lado izquierdo representan la distribución de las microesferas con el anticuerpo monobiotinilado. Las dos imágenes del lado derecho representan la distribución de las microesferas con una preparación de conjugado obtenida usando 3,5 equivalentes de reactivo de biotinilación por anticuerpo en la preparación del conjugado. Como resulta obvio en las imágenes de la derecha, la distribución de las microesferas es muy desigual/perturbada, con la mayoría de las microesferas en la parte izquierda del electrodo.

Figura 4 Patrón de microesferas en el electrodo de medición (de trabajo) de un analizador cobas® e601 automatizado (Roche Diagnostics GmbH) como se obtuvo en un ensayo experimental de antígeno central del VHC con Biotina-PEG24-NHS para biotinilación: Las dos imágenes de la fila superior representan la distribución de las microesferas en una muestra negativa o de control. Las dos imágenes de la fila inferior representan la distribución de las microesferas en una muestra positiva para el VHC. Las dos imágenes del lado izquierdo representan la distribución de las microesferas con el anticuerpo monobiotinilado. Las dos imágenes del lado derecho representan la distribución de las microesferas con una preparación de conjugado obtenida usando 5 equivalentes de reactivo de biotinilación por anticuerpo en la preparación del conjugado. Incluso en esta alta proporción de reactivo de biotinilación por anticuerpo, las microesferas muestran una distribución homogénea en el electrodo.

Se proporcionan los siguientes ejemplos, figuras y secuencias para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Se preparan anticuerpos monoclonales mediante tecnología de hibridoma estándar como se describe anteriormente en el presente documento o mediante técnicas de ADN recombinante.

Técnicas de ADN recombinante

Se usaron procedimientos habituales para manipular el ADN como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. Se usaron los reactivos biológicos moleculares de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Síntesis de genes y oligonucleótidos

Se prepararon los segmentos de genes deseados mediante síntesis química en Geneart GmbH (Regensburg, Alemania). Los fragmentos génicos sintetizados se clonaron en un plásmido de *E. coli* para propagación/amplificación. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron por
10 secuenciación de ADN. De forma alternativa, fragmentos cortos de ADN sintético se ensamblaron por hibridación de oligonucleótidos sintetizados químicamente o por medio de PCR. Los oligonucleótidos respectivos fueron preparados en metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Alemania).

15 Descripción del plásmido de expresión de mamífero básico/estándar

Para la expresión de un gen/proteína deseado (por ejemplo, cadena pesada de anticuerpo de longitud completa, cadena ligera de anticuerpo de longitud completa o una cadena de Fc que contiene una oligoglicina en su extremo N) se usa una unidad de transcripción que comprende los siguientes elementos funcionales:

- 20 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (P-CMV), incluyendo el intrón A,
- una región 5' no traducida de inmunoglobulina de cadena pesada humana (5'UTR),
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina,
- 25 - un gen/proteína que se va a expresar (por ejemplo, cadena pesada del anticuerpo de longitud completa), y
- la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA de BGH).
- 30 Además de la unidad de expresión/casete que incluye el gen que se desea expresar, el plásmido de expresión de mamífero básico/estándar contiene
- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli* y
- 35 - un gen de betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*.

Determinación de proteínas

La concentración de proteína de los polipéptidos purificados se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a
40 280 nm, usando el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos del polipéptido o usando el procedimiento de BCA colorimétrico.

Ejemplo 1

45 **Síntesis de reactivos de biotinylation activados**

La síntesis de conectores que comprenden biotina activada del estado de la técnica (reactivos de biotinylation) como el conector ampliamente utilizado Biotina-DDS se divulga en el documento EP 632 810.

50 Los reactivos de biotinylation Biotina-PEG_n-NHS (N.º CAS 365441-71-0; n = número de unidades de óxido de etileno) se obtuvieron de IRIS Biotech GmbH o se sintetizaron internamente. Biotina-PEG~110-NHS (Biotina-PEG-NHS, PM 5000 Da) se adquirió de Iris Biotech GmbH (Alemania).

En la síntesis *de novo*, el control del número discreto de unidades de óxido de etileno se aseguró mediante el
55 alargamiento gradual de PEG más cortos, tal como el tetraetilenglicol, siguiendo el procedimiento descrito por Chen y Baker, J. Org. Chem. 1999, 64, 6840-6873.

En una primera etapa se obtuvo bis-tritil-PEG_n **1** (como es obvio, n representa el número de unidades de
60 etilenglicol).

La desprotección de **1** se llevó a cabo agitando en HCl 1 M en dioxano durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la evaporación, el residuo se calentó a reflujo en metanol hasta que se obtuvo una solución transparente y el matraz se mantuvo a 4 °C durante la noche. Después de la filtración, se extrajo la solución con hexano, se evaporó la fase metanólica y se secó para obtener el correspondiente PEG_n-diol **2** en forma de aceite
65 o cera (la consistencia depende de la longitud/número de unidades (n) del PEG).

A continuación, se llevó a cabo la introducción de la función ácida mediante la adición catalizada por sodio de PEG_n-diol a acrilato de *tert*-butilo de acuerdo con Seitz y Kunz, J. Org. Chem. **1997**, 62, 813-826. De esta manera se obtiene el compuesto **3**.

- 5 A una solución de HO-PEG_n-COOtBu **3** (1 equivalente) y trietilamina (2,5 equivalentes) en cloruro de metileno se le añadió cloruro de metilsulfonilo (2 equivalentes) gota a gota a 0 °C. Después de agitar durante 1 h, se procedió a un tratamiento acuoso y siguió la evaporación.

- 10 Se hizo reaccionar directamente el mesilato **4** (1 equivalente) con NaN₃ (2 equivalentes) por agitación en dimetilformamida a temperatura ambiente durante dos días. Después de la retirada de los sólidos y de la dimetilformamida, se realizó un tratamiento acuoso con éter dietílico y se secó con Na₂CO₃.

- 15 El producto bruto **5** se purificó por cromatografía en columna sobre sílice en acetato de etilo/metanol 15/1. Se realizó la reducción de la azida **5** (1 equivalente) agitando durante 24 h con trifenilfosfina (1,1 equivalentes) en tetrahidrofurano/agua 4/1 a temperatura ambiente. Después de la evaporación, se suspendió el residuo en agua y se lavó con acetato de etilo varias veces. Se evaporó la fase acuosa y se secó para dar la amina **6** en forma de un aceite incoloro.

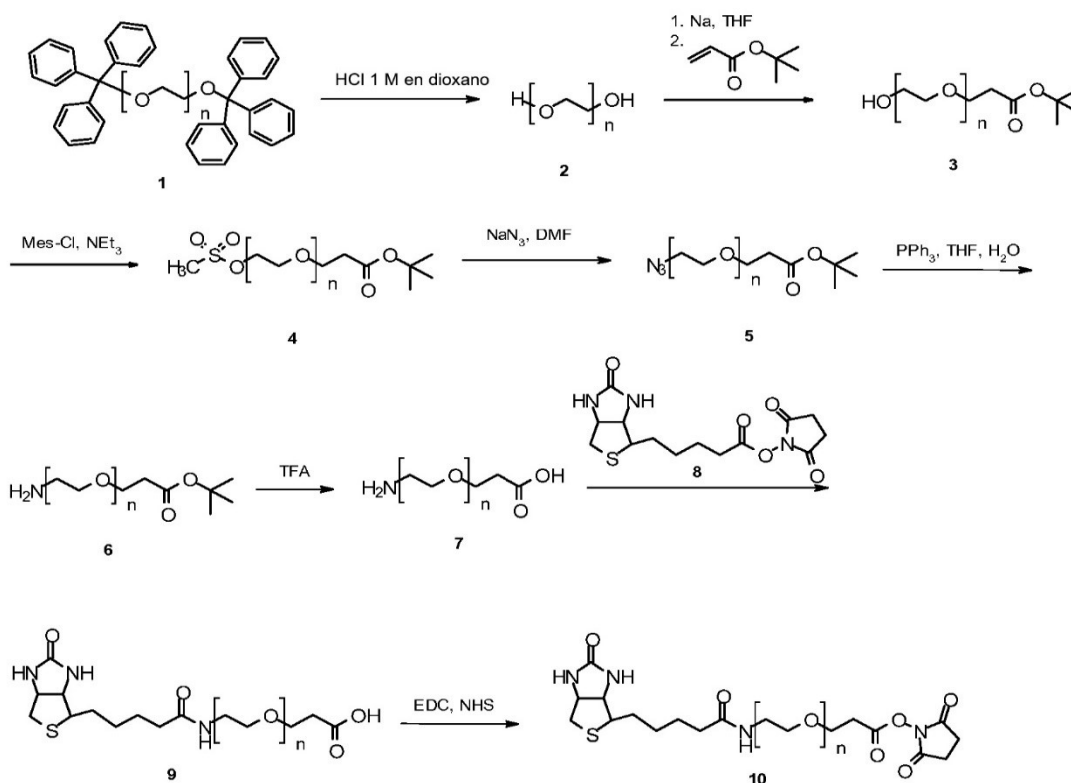
- 20 Se llevó a cabo la escisión del éster *tert*-butilico con ácido trifluoroacético al 5 % en agua. Se obtuvo amino-PEG_n-ácido **7** por evaporación con agua varias veces.

Se introdujo biotina por acoplamiento con el correspondiente éster de *N*-hidroxisuccinimida **8** (1,05 equivalentes) con trietilamina (4 equivalentes) en dimetilformamida a temperatura ambiente durante la noche.

- 25 Después de la evaporación, se purificó el producto bruto **9** por RP-HPLC en acetonitrilo/agua.

Finalmente, se formó el éster de *N*-hidroxisuccinimida **10** por reacción con *N*-hidroxisuccinimida (1,1 equivalentes) y etil dimetilaminopropil carbodiimida (1,1 equivalentes) en cloruro de metileno. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc y se lavó con agua. La evaporación y el secado dieron lugar a Biotina-PEG_n-NHS **10** puro como aceite, cera o sólido, respectivamente, dependiendo del número de unidades de óxido de etileno.

- 30



- 35 **Esquema 1** Síntesis de Biotina-PEG(n)-NHS

Ejemplo 2**Acoplamiento de restos de biotina y rutenio, respectivamente, a anticuerpos**

- 5 Se obtuvieron anticuerpos y se purificaron de acuerdo con los procedimientos del estado de la técnica que son completamente familiares para un experto en la técnica.

Para el acoplamiento, en general, los grupos lisina ϵ -amino de los anticuerpos fueron seleccionados por compuestos activados por *N*-hidroxisuccinimida. A una concentración de proteína de 10 mg/ml, se hicieron reaccionar anticuerpos con reactivos de biotilación activados con *N*-hidroxisuccinimida y reactivos de marcado de rutenio activados con *N*-hidroxisuccinimida, respectivamente. La proporción molar de reactivo de biotilación o marcado, respectivamente y de proteína (anticuerpo) varió de 1,3:1 a 5:1, dependiendo del conjugado de anticuerpo respectivo. El tampón de reacción fue fosfato de potasio 50 mM (pH 8,5), KCl 150 mM. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo añadiendo L-lisina hasta una concentración final de 10 mM. Después de la reacción de acoplamiento, se eliminó el marcador/biotina libre sin reaccionar pasando el conjugado de anticuerpo bruto sobre una columna de filtración en gel (Superdex 200 HI Load) o por diálisis.

Para obtener conjugados de anticuerpos monobiotinilados se añadió sulfato de amonio 0,5-1 M a la solución de conjugado. La solución se pasó a través de un adsorbente de muteína de estreptavidina (véase el documento DE19637718) equilibrado con fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), KCl 150 mM, sulfato de amonio 0,5-1 M. Los anticuerpos sin ninguna biotina acoplada/unida a ellos no se pueden unir al adsorbente y se eliminaron por lavado. Los conjugados de anticuerpos monobiotinilados se eluyeron con fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), KCl 150 mM y DMSO al 2 %. Los conjugados de anticuerpos con más de una biotina por anticuerpo se eluyeron con fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), KCl 150 mM y biotina 2 mM ("mSA").

Ejemplo 3**Influencia del conector en un reactivo de biotilación sobre la detección inmunológica del antígeno central del VHC**

Uno y el mismo anticuerpo anti-VHC (captura) se conjugó con biotina mediante el uso de reactivos de biotilación que comprenden diversos conectores. El rendimiento de los diferentes conjugados biotina-conector-anticuerpo se evaluó en un analizador cobas® e601 automatizado (Roche Diagnostics GmbH).

Las mediciones se llevaron a cabo en un formato de ensayo tipo sándwich. La detección de señales en el analizador cobas® e601 se basa en electroquimioluminiscencia. En este ensayo tipo sándwich, el conjugado de biotina (es decir, el anticuerpo de captura) se inmoviliza sobre la superficie de una microesfera magnética recubierta con estreptavidina (tamaño promedio de la microesfera de 2,8 μ m). El anticuerpo de detección lleva un catión de rutenio complejado como resto de señalización. En presencia de analito, el complejo cromógeno de rutenio se une a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de la excitación en el electrodo de platino comprendido en la celda de medición del analizador cobas® e601. La salida de señal está en unidades de luz arbitrarias. Las mediciones se realizaron con muestras de suero y plasma humano positivas y negativas para el antígeno del núcleo del VHC adquiridas de varias fuentes.

El ensayo experimental de antígeno del núcleo del VHC se realizó de la siguiente manera. Se incubaron juntos durante 9 minutos 50 μ l de muestra normal o positiva para el antígeno del VHC y 25 μ l de un detergente que contiene reactivo de pretratamiento para liberar el antígeno, seguido de la adición de 35 μ l de 2 μ g/ml de conjugado anticuerpo de captura-biotina y 40 μ l de 1 μ g/ml de conjugado de anticuerpo de detección marcado con rutenio en el mismo tampón fisiológico de pH 7,0 y que comprende fosfato de potasio 100 mM y KCl 225 mM. Después de 9 minutos adicionales de incubación, se añadieron 50 μ l de micropartículas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina y se incubaron durante otros 9 minutos. Posteriormente, se detectó el antígeno del núcleo del VHC (por medio de la señal electroquimioluminiscente generada en estos experimentos).

Tabla 1**Comparación de diferentes conjugados de anticuerpos de captura contra el VHC**

	Conjugado de anticuerpos de captura contra el VHC			
	Biotina-DDS, mono	Biotina-DDS, 1:3,5	Biotina-PEG24, mono	Biotina-PEG24, 1:5
	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos
muestra normal 1	1.247	956	1.265	960
Muestra positiva para antígeno del VHC 1	742.023	1.162.932	1.792.054	2.112.645
S/R	595	1.216	1,417	2,201
muestra normal 1 (medición por un factor de 21)				
media	1.302	949	1,298	973
mín.	1.243	894	1.233	933
máx.	1.595	1.182	1,462	1,064
desviación estándar (DE)	74	72	46	29
coeficiente de variación (CV)	5,7 %	7,6%	3,5%	3,0%
Muestra positiva para antígeno del VHC 2 (medición por un factor de 21)				
media	138.927	189.659	315.036	382.808
mín.	125.384	177.906	308.373	373.402
máx.	143.586	199.343	320.929	392.804
desviación estándar (DE)	4.194	4.591	2.991	4.573
coeficiente de variación (CV)	3,0%	2,4%	1,0%	1,2%

En general, una alta proporción señal/ruido (S/R) y un bajo coeficiente de variación (CV), en particular para señales de fondo, son parámetros importantes de rendimiento del ensayo, especialmente en relación con el límite inferior de detección de un ensayo (sensibilidad del ensayo). Como se divulga en el documento EP 632 810 en ensayos basados en micropartículas recubiertas con estreptavidina, el reactivo de biotilación Biotina-DDS es preferente respecto a otros reactivos de biotilación como Biotina-NHS o Biotina-X-NHS que comprenden conectores más cortos o más largos, respectivamente.

Para evaluar el patrón de distribución de las microesferas en el electrodo de trabajo, se reemplazó el fotomultiplicador por una cámara. En general, se sabe que la agregación en microesferas de las micropartículas recubiertas con estreptavidina paramagnética y/o un patrón de distribución de microesferas no homogéneo durante la captura magnética en el electrodo de trabajo da lugar a una pérdida parcial de la señal y especialmente a un CV mayor. También se sabe que los llamados efectos de matriz presentes en algunas muestras pueden aumentar aún más los problemas causados por la agregación en microesferas.

Los datos en la tabla 1 muestran que un anticuerpo conjugado con múltiples restos de Biotina-DDS por anticuerpo, si se compara con un conjugado de un anticuerpo con solo un solo resto de Biotina-DDS, tiene valores de S/R más altos. Sin embargo, esto es a expensas de un valor de CV más alto para un suero sin analitos en comparación con su contraparte biotilada única. Además, la biotilación múltiple de anticuerpos con Biotina-DDS induce la agregación en microesferas de las micropartículas recubiertas con estreptavidina paramagnética, lo que se hace evidente por un patrón de distribución de las microesferas muy poco homogéneo durante la captura magnética en el electrodo de trabajo (figura 3). (Dado que el suero negativo utilizado aquí está libre de efectos de matriz, el impacto negativo en el CV es solo moderado). El conjugado Biotina-DDS estrictamente monobiotilado muestra un patrón de microesferas mucho más homogéneo en el electrodo de trabajo y, por tanto, es menos propenso a los efectos de matriz (figura 3).

Usando Biotina-PEG24-NHS que comprende un conector mucho más largo para biotilación para producir un conjugado monobiotilado, la proporción señal-ruido y el valor de CV se podrían aumentar y disminuir, respectivamente. El patrón de microesferas es muy homogéneo, en cuanto al monoconjugado basado en Biotina-DDS (figura 4). Sorprendentemente, con Biotina-PEG24 monoconjugado se pudieron obtener muy buenos resultados, tanto con respecto a la proporción señal-ruido como al coeficiente de variación. Usando un anticuerpo

conjugado con múltiples reactivos de biotinilación Biotina-PEG24-NHS por anticuerpo se podría obtener un patrón de distribución homogéneo de las microesferas y valores de CV bajos similares a los resultados obtenidos para el conjugado monobiotinilado (figura 4). La proporción señal-ruido aumenta con el número creciente de residuos de biotina por anticuerpo al menos en el intervalo de residuos de biotina por anticuerpo usado en estos experimentos.

Ejemplo 4

Influencia del conector en un reactivo de biotinilación sobre la detección inmunológica de troponina T (TnT)

Uno y el mismo anticuerpo anti-troponina T (anti-TnT) (captura) se conjugó con biotina mediante el uso de reactivos de biotinilación que comprenden diversos conectores. El rendimiento de los diferentes conjugados biotina-conector-anticuerpo se evaluó en un analizador cobas® e601 automatizado (Roche Diagnostics GmbH) basado en un protocolo experimental de acuerdo con las instrucciones para el kit de ensayo Elecsys Troponin T hs.

Las mediciones se llevaron a cabo en un formato de ensayo tipo sándwich. La detección de señales en el analizador cobas® e601 se basa en electroquimioluminiscencia. En este ensayo tipo sándwich, el conjugado de biotina (es decir, el anticuerpo de captura) se inmoviliza sobre la superficie de una microesfera magnética recubierta con estreptavidina (tamaño promedio de la microesfera de 2,8 µm). El anticuerpo de detección lleva un catión de rutenio complejado como resto de señalización. En presencia de analito, el complejo cromógeno de rutenio se une a la fase sólida y emite luz a 620 nm después de la excitación en el electrodo de platino comprendido en la celda de medición del analizador cobas® e601. La salida de señal está en unidades de luz arbitrarias.

Las mediciones se realizaron con suero humano complementado con cantidades definidas de TnT cardíaca humana recombinante como calibradores y los resultados se proporcionan en la tabla 2.

Tabla 2

Resultados obtenidos con un ensayo experimental de troponina T

Calibradores de TnT	Conjugado de anticuerpo de captura contra TnT			
	Biotina-DDS, mono	Biotina-PEG24, mono	Biotina-DDS, 1:1,3, +mSA	Biotina-PEG24, 1:1,3, +mSA
pg/ml	recuentos	recuentos	recuentos	recuentos
0	942	958	947	1.021
15	1.486	1.728	1.351	1.631
72	3.704	5.178	3.149	4.530
167	8.686	13.161	7.069	11.407
2.885	219.509	414.720	201.995	380.924
10.910	840.288	1.566.614	793.111	1.576.584

Se puede concluir a partir de los datos que figuran en la tabla 2 que los conjugados de anticuerpos de captura producidos con el reactivo de biotinilación Biotina-PEG24-NHS largo son superiores a los del reactivo de biotinilación Biotina-DDS más corto, independientemente de la proporción promedio entre biotina y anticuerpo. (Como se explica en el ejemplo 1, un conjugado con la noción "+mSA" representa la fracción que comprende dos o más restos de biotina por anticuerpo).

Ejemplo 5

Variación de la longitud del conector en el reactivo de biotinilación en un ensayo prototipo de antígeno del núcleo del VHC

Para determinar la longitud óptima del conector, se conjugaron diferentes derivados de Biotina-PEG(n)-NHS con el anticuerpo de captura contra el VHC y se midieron en el ensayo experimental de antígeno del núcleo del VHC como se describe en el ejemplo 3. Para cada reactivo de biotinilación se generaron conjugados tanto monobiotinilados como multibiotinilados y los resultados se dan en la tabla 3.

Tabla 3

Influencia de la longitud del conector PEG en el rendimiento de un ensayo experimental de antígeno del núcleo del VHC

Conjugado de anticuerpos de captura contra el VHC	muestra normal 1	Muestra positiva para antígeno del VHC	S/R
	recuentos	recuentos	
Biotina-PEG4, mono	1.070	380.906	356
Biotina-PEG12, mono	970	550.556	568
Biotina-PEG24, mono	884	605.566	685
Biotina-PEG30, mono	1.028	515.176	501
Biotina-PEG~110, mono	1.193	109.534	92
Biotina-PEG4, 1:1,3, +mSA	921	463.375	503
Biotina-PEG12, 1:1,3, +mSA	956	707.700	740
Biotina-PEG24, 1:1,3, +mSA	1.075	943.744	878
Biotina-PEG30, 1:1,3, +mSA	995	629.536	633
Biotina-PEG~110, 1:1,3, +mSA	1.409	697.707	495

Como se puede ver en la tabla 3, se han obtenido muy buenos resultados por medio de la proporción señal/ruido (S/R) con conectores que comprenden entre 12 y 30 unidades de etilenglicol. Las variantes generadas por el uso del reactivo de biotilación Biotina-PEG24-NHS tendieron a mostrar una proporción señal/ruido óptima. Sin embargo, como es obvio a partir de la tabla 3, los conectores que comprenden entre 12 y 30 unidades de etilenglicol son bastante superiores en comparación con el conector más corto, así como el más largo, también sometidos a prueba y dan buenos resultados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la medición de un analito en un ensayo de unión específica a un analito basado en micropartículas, en el que dichas micropartículas están recubiertas con el primer socio de un par de unión, comprendiendo el procedimiento
 - a) mezclar las micropartículas recubiertas, un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio del par de unión, y una muestra que se sospecha que comprende o que comprende el analito,
 - en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30), uniendo de este modo el analito por medio de un agente de unión específica a un analito a las micropartículas recubiertas ,
 - b) separar las micropartículas que comprenden el analito unido por medio del par de unión y el agente de unión específica a un analito de la mezcla y
 - c) medir el analito unido a las micropartículas.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas micropartículas tienen un diámetro de 50 nm a 20 μ m
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichas micropartículas son paramagnéticas y la separación en la etapa 1(b) es por fuerzas magnéticas.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente de unión específica a un analito es un polipéptido de al menos 50 aminoácidos.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho agente de unión específica a un analito es un polipéptido de como máximo 10.000 aminoácidos.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho agente de unión específica a un analito es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho analito se mide en un formato de ensayo competitivo.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho analito se mide en un formato de ensayo tipo sándwich.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha medición del analito unido a las micropartículas se basa en el uso de un marcador electroquimioluminiscente.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho primer socio del par de unión se selecciona de avidina y/o estreptavidina, y FimG, respectivamente, y en el que dicho segundo socio del par de unión se selecciona de biotina o análogos de la biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina y DsF, respectivamente.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho primer socio del par de unión es avidina y/o estreptavidina y en el que dicho segundo socio del par de unión es biotina.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho agente de unión específica conjugado unido al segundo socio del par de unión está comprendido en una composición, en el que en dicha composición la proporción molar promedio entre el segundo socio del par de unión unido al agente de unión específica a un analito es 1,1 o más.
13. Un kit que comprende, en recipientes separados o en compartimentos separados de una unidad de recipiente único, al menos micropartículas recubiertas con un primer socio de un par de unión y un agente de unión específica a un analito unido al segundo socio de dicho par de unión, en el que dicho segundo socio del par de unión se une a dicho agente de unión específica a un analito por medio de un conector que comprende de 12 a 30 unidades de etilenglicol (PEG 12 a 30).
14. El kit de la reivindicación 13, en el que dicho primer socio de un par de unión es avidina o estreptavidina, y en el que dicho segundo socio de dicha par de unión se selecciona de biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina.

15. El kit de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, que comprende además en un recipiente separado o en un compartimento separado de una unidad de recipiente único un segundo agente de unión específica a un analito que está marcado de manera detectable.

Figura 1

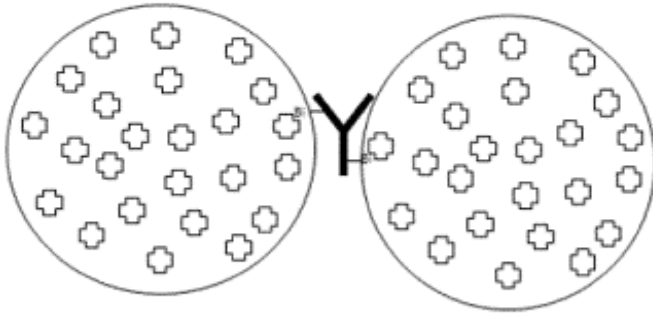


Figura 2

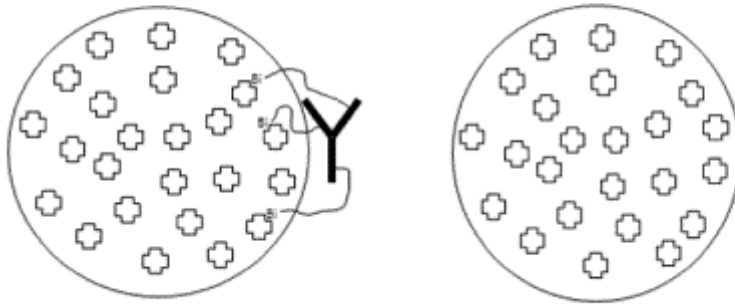


Figura 3

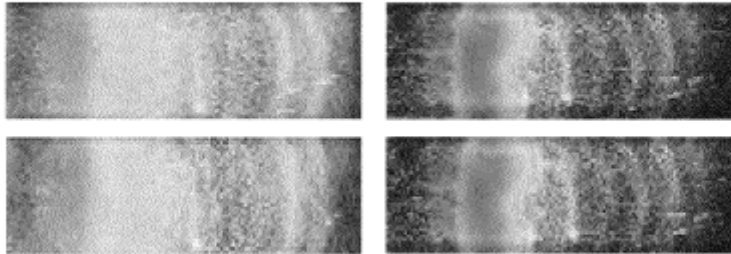


Figura 4

