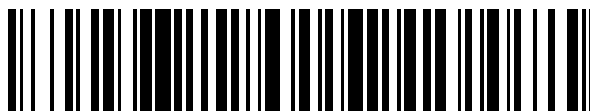


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 253**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013** **PCT/IB2013/051193**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13121368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013** **E 13749422 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 2815238**

54 Título: **Un proceso para la detección y la cuantificación opcional de un analito**

30 Prioridad:

15.02.2012 IN 566CH2012

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

26.11.2020

73 Titular/es:

BIOCON LIMITED (50.0%)
20th K.M. Hosur Road Electronics City
Bangalore 560 100, Karnataka, IN y
MYLAN GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

SENGUPTA, NILANJAN;
UDIAVAR, ANITA, RAO;
THANGAMUTHU, SENTHIL;
NAYAK, VIVEK, GOPAL;
PILLAI, RANJIT, RAVINDRAN;
VASHISHTA, LAXMIKANT;
RAMASWAMY, SHILPA, GOVINDA;
HEGDE, VISHIKA y
MELARKODE, RAMAKRISHNAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 796 253 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

Un proceso para la detección y la cuantificación opcional de un analito

5 Campo técnico de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un proceso para la utilización de un tampón ácido único de disociación en un ensayo de unión a ligando de una única etapa para cuantificar la cantidad total de un analito presente en una matriz biológica que contiene una diana soluble del analito. Más específicamente, la divulgación se refiere a un proceso para el desarrollo de inmunoensayos utilizando un formato ELISA para cuantificar de forma fiable el analito total utilizando este tampón único. La divulgación puede extenderse a ensayos de inmunogenicidad para la detección de anticuerpos antianalito en presencia de un exceso de analito libre.

15 Antecedentes de la divulgación

Los inmunoensayos se utilizan principalmente para la detección y la cuantificación de una amplia variedad de analitos, tales como hormonas, antígenos tumorales, antígenos bacterianos o víricos, productos terapéuticos proteicos, etc. en muestras biológicas. Los inmunoensayos cuantitativos son críticos para comprender el perfil farmacocinético de las proteínas terapéuticas en apoyo de estudios de eficacia y de seguridad. Además, los inmunoensayos también se utilizan para cuantificar las dianas solubles de las proteínas terapéuticas y de los anticuerpos antiproteínas terapéuticas. Para dianas proteicas solubles o dianas receptoras desprendidas del analito, existen dos formas distintas del analito en la matriz biológica: el analito libre y el analito combinado con la diana soluble. Para obtener un perfil farmacocinético preciso del analito, es ideal desarrollar métodos de ensayo de unión a ligando que tengan como objetivo cuantificar las concentraciones totales de analito en vez de únicamente las concentraciones de analito libre.

Un problema frecuente que se da a menudo en los inmunoensayos cuantitativos es la estimación precisa de las concentraciones totales de analito en presencia de una sustancia interferente (diana soluble) que compite con los reactivos de inmunoensayo para unirse al analito. Esto da lugar a una subestimación del analito y ponen en peligro la evaluación verdadera del perfil farmacocinético del analito. La sustancia interferente puede eliminarse mediante un tratamiento previo de las muestras. Sin embargo, esta etapa da lugar a la pérdida de muestra e introduce una variabilidad adicional.

El documento US 4.604.348 desvela un proceso para determinar la presencia de un antígeno o anticuerpo en un suero que contiene tal antígeno o anticuerpo en forma de un complejo inmunitario. El documento US 5.641.640 desvela un método para valorar un analito en una muestra de fluido en la que se mide un cambio en el índice de refracción en una superficie óptica sólida en contacto con la muestra. El documento US 2008/182796 se refiere a toxinas Cry3A modificadas y a métodos para crearlas y utilizarlas, al igual que a métodos de detección de estas toxinas. El documento US 2002/0090662 se refiere a un método para determinar la cantidad de un analito en una muestra de fluido en presencia de una sustancia interferente, tal como la cantidad de Herceptin® que circula en suero o plasma de pacientes con cáncer sometidos a una terapia con Herceptin®.

Exposición de la divulgación

La presente invención se define por el proceso de la reivindicación 1, el método de la reivindicación 6 y el uso de la reivindicación 7.

La presente divulgación también se refiere a un proceso para la detección y la cuantificación opcional de analito en una muestra biológica, comprendiendo dicho proceso proporcionar a la muestra un tampón citrato modificado antes de llevar a cabo el ensayo para dicha detección y dicha cuantificación opcional del analito en la muestra biológica; un método para disociar un complejo formado mediante la interacción del analito y al menos una sustancia interferente como diana para el analito en una muestra biológica, comprendiendo dicho método la acción de proporcionar un tampón citrato modificado a la muestra biológica para disociar el complejo; un equipo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar y cuantificar opcionalmente un analito en la muestra biológica, comprendiendo dicho equipo componentes seleccionados entre un grupo que comprende tampón citrato modificado, anticuerpo de captura, anticuerpo de detección, reactivo para reaccionar con el anticuerpo de detección, placas de microtitulación, tampón de recubrimiento, solución de lavado y solución de parada o cualquier combinación de los mismos; y un tampón citrato modificado para detectar y cuantificar opcionalmente la presencia de un analito en una muestra biológica.

Breve descripción de las figuras adjuntas

Para que se pueda comprender fácilmente la divulgación y se pueda poner en efecto de forma práctica, se hace referencia a realizaciones a modo de ejemplo ilustradas con referencia a las figuras adjuntas. Las figuras, junto con una descripción detallada a continuación, se incorporan en la memoria descriptiva, y forman parte de la misma, y sirven para ilustrar adicionalmente las realizaciones y explicar diversos principios y ventajas, según la presente

divulgación, donde:

La **Figura 1** muestra gráficos que muestran la interferencia de HER2-ECD recombinante en una curva de calibración de Trastuzumab.

La **Figura 1A** muestra un gráfico que muestra que la adición de HER2-ECD tiene como resultado un desplazamiento de la ubicación dependiente de la dosis de las curvas de calibración de Trastuzumab cuando se diluye en suero salino tamponado con fosfato Tween20 (PBST).

La **Figura 1B** muestra un gráfico que muestra que el diluyente de tampón citrato modificado anula la interferencia dependiente de la dosis de HER2-ECD en una curva de calibración de Trastuzumab.

La **Figura 2** muestra la comparación de distintos tampones ácidos a un pH de 3,5, para anular la interferencia de HER2-ECD recombinante en una curva de calibración de Trastuzumab. En particular, la **Figura 2** es un gráfico que muestra que el uso de diluyente de tampón citrato modificado tiene como resultado un mínimo desplazamiento de la ubicación inducido por la adición de 1 µg/ml de HER2-ECD en suero.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un proceso para la detección y la cuantificación opcional de un analito en una muestra biológica, comprendiendo dicho proceso proporcionar un tampón citrato modificado a la muestra antes de llevar a cabo un ensayo para dicha detección y dicha cuantificación opcional del analito en la muestra biológica.

En una realización de la presente divulgación, el proceso comprende:

- (a) proporcionar un tampón citrato modificado a la muestra para obtener una muestra biológica diluida; y
- (b) llevar a cabo un ensayo convencional para la detección y la cuantificación opcional del analito en la muestra.

En otra realización de la presente divulgación, la muestra biológica comprende al menos una sustancia interferente como diana para el analito, y en donde dicha sustancia interferente y dicho analito se combinan para formar un complejo.

En otra realización más de la presente divulgación, la formación del complejo reduce la cantidad de analito libre en la muestra biológica, dificultando, de ese modo, la detección y la cuantificación precisas de dicho analito.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el tampón citrato modificado disocia el complejo y restaura el analito libre en la muestra para permitir la detección y la cuantificación precisas de dicho analito.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el tampón citrato modificado comprende citrato-HCl a una concentración de aproximadamente 125 mM y Tween-20 a una concentración de aproximadamente 0,1 % p/v y en donde el pH del tampón varía desde 2,5 hasta 3,8, preferentemente 3,5.

En otra realización adicional de la presente divulgación, se selecciona la muestra biológica del grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización adicional de la presente divulgación, se selecciona el analito del grupo que comprende una hormona, un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, un antígeno vírico, un producto terapéutico proteico y un anticuerpo o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el analito es un anticuerpo.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2).

En otra realización adicional de la presente divulgación, la sustancia interferente es un dominio extracelular de HER-2 (HER-2-ECD).

En otra realización adicional de la presente divulgación, el ensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En otra realización adicional de la presente divulgación, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fase doble y se lleva a cabo en presencia de componentes seleccionados del grupo que comprende un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, un reactivo para reaccionar con el anticuerpo de detección, una placa de microtitulación, un tampón de recubrimiento, una solución de lavado y una solución de parada o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el anticuerpo de captura es un anticuerpo contra el analito en la muestra biológica.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el anticuerpo de detección está marcado con una enzima seleccionada entre el grupo que comprende peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina y rutenio.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el reactivo para reaccionar con el anticuerpo marcado es un sustrato cromogénico seleccionado entre ABTS (sal diamónica de ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y un sustrato compatible electroquimioluminiscente.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el tampón de recubrimiento es suero salino tamponado con fosfato.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la solución de lavado comprende suero salino tamponado con fosfato y Tween-20.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la solución de parada es ácido sulfúrico 0,1 N.

En otra realización adicional de la presente divulgación, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) comprende:

- a. recubrir una superficie sólida con el anticuerpo de captura contra el analito; proporcionar un tampón citrato modificado a la muestra biológica para obtener una muestra biológica diluida;
- b. añadir la muestra diluida al soporte o superficie sólida recubierta con anticuerpo de la etapa (a);
- c. incubar y lavar el soporte para eliminar cualquier analito no unido;
- d. añadir un anticuerpo marcado de detección contra el analito y lavar el soporte para eliminar cualquier anticuerpo no unido de detección; y
- e. añadir un reactivo para reaccionar con el anticuerpo marcado para detectar y cuantificar opcionalmente el analito en la muestra.

La presente divulgación se refiere, adicionalmente, a un método de disociación de un complejo formado por la interacción del analito y al menos una sustancia interferente como diana para el analito en una muestra biológica, comprendiendo dicho método la acción de proporcionar un tampón citrato modificado a la muestra biológica para disociar el complejo.

La presente divulgación se refiere, adicionalmente, a un equipo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar y cuantificar opcionalmente un analito en una muestra biológica, comprendiendo dicho equipo componentes seleccionados entre el grupo que comprende tampón citrato modificado, un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, un reactivo para reaccionar con el anticuerpo de detección, placas de microtitulación, tampón de recubrimiento, solución de lavado y solución de parada o cualquier combinación de los mismos.

La presente divulgación se refiere, adicionalmente, a un tampón citrato modificado para detectar y cuantificar opcionalmente la presencia de un analito en una muestra biológica.

En una realización de la presente divulgación, el tampón citrato modificado comprende citrato-HCl a una concentración de aproximadamente 125 mM y polisorbato-20 a una concentración de aproximadamente 0,1 % p/v, y en donde el pH del tampón varía desde 2,5 hasta 3,8, preferentemente 3,5.

En otra realización de la presente divulgación, la muestra biológica comprende al menos una sustancia interferente como diana para el analito, y en donde dicha sustancia interferente y dicho analito interactúan para formar el complejo.

En otra realización más de la presente divulgación, el analito es un anticuerpo del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2).

En otra realización adicional de la presente divulgación, la sustancia interferente es un dominio extracelular del HER-2 (HER-2-ECD).

Definición de expresiones

Tampón citrato modificado: Un tampón citrato modificado según la presente divulgación es un tampón citrato que comprende citrato de sodio y ácido cítrico, comprendiendo también polisorbato 20 y HCl. Se añade el HCl para reducir el pH del tampón hasta un intervalo deseado de 2,5-3,8.

La presente divulgación se refiere a un proceso de utilización de un tampón ácido único de disociación en un ensayo analítico/ensayo de unión a ligando de una única etapa para cuantificar con precisión la cantidad total de un analito

presente en la matriz biológica que contiene una diana soluble del analito (también denominado en la presente memoria sustancia interferente). El uso de este tampón elimina el problema de una subestimación del analito debido a la presencia de la sustancia interferente, sin introducir ningún tratamiento previo de las muestras, manteniendo, de esta manera, la sencillez y la facilidad de los inmunoensayos. El proceso comprende las siguientes etapas:

- a) Recubrir una superficie sólida, tal como una placa de microtitulación, con un anticuerpo específico para el analito.
- b) Diluir las muestras biológicas que contienen el analito y la sustancia interferente en tampón citrato modificado y añadir las muestras diluidas a la superficie sólida recubierta de la anterior etapa.
- c) Detectar el complejo de anticuerpo de captura-analito añadiendo un anticuerpo marcado contra el analito.
- d) Añadir un reactivo con capacidad para reaccionar con el anticuerpo marcado y cuantificar la señal.

En una realización de la presente divulgación, se prepara tampón citrato modificado modificando un tampón citrato mediante la adición de un ácido fuerte; es decir, el tampón citrato modificado de la presente divulgación es una combinación de la sal de un ácido débil (citrato de sodio) y de un ácido débil (ácido cítrico) con la adición de un ácido fuerte para obtener el pH requerido de entre 2,5 y 3,8.

En un aspecto, el tampón citrato modificado contiene polisorbato. En otro aspecto, el tampón citrato modificado contiene polisorbato-20.

En otra realización más de la presente divulgación, los anticuerpos de captura y de detección pueden ser de origen monoclonal o policlonal. El epítipo en el analito reconocido por el anticuerpo de detección es distinto del epítipo reconocido por el anticuerpo de captura. La etiqueta conjugada con el anticuerpo de detección puede ser una enzima, tal como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina u otras enzimas. Se utiliza como indicador un sustrato para la enzima conjugada con el anticuerpo de detección. Los sustratos habituales utilizados se seleccionan entre ABTS (sal diamónica de ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico y TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina).

En otra realización adicional, la presente divulgación se refiere a un proceso para utilizar un tampón ácido único de disociación en un ensayo de unión a ligando de una única etapa para cuantificar la cantidad total de analito presente en la matriz sérica que contiene la sustancia interferente.

En otra realización adicional, la divulgación desvela un método para determinar con precisión los niveles de un anticuerpo anti-HER2 en presencia de una sustancia interferente, un dominio extracelular (ECD) de receptores HER2. La muestra biológica en la que se busca la determinación precisa del nivel de anticuerpo anti-HER2 puede ser suero o plasma derivado de un paciente de cáncer sometido a una terapia anti-HER2.

En otra realización adicional de la presente divulgación, la precisión (recuperación analítica) de los controles de calidad (QC) de trastuzumab realizados en sueros de cáncer metastásico de mama que contienen HER2-ECD endógeno es máxima cuando se utiliza tampón citrato modificado como diluyente.

La presente divulgación se ilustra mediante su aplicación a la recuperación analítica precisa de trastuzumab en suero al que se añade HER2-ECD recombinante, diana soluble de trastuzumab. Se produce sobreexpresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu) en un 25 % de los cánceres de mama humanos y está asociada con un pronóstico desfavorable. El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el dominio extracelular (ECD) del receptor HER-2/neu y su unión tiene como resultado la inhibición de la proliferación de células cancerosas. El trastuzumab está autorizado para el tratamiento del cáncer metastásico de mama que sobreexpresa HER-2/neu. La concentración sérica de trastuzumab debería mantenerse por encima de 10 µg/ml durante la terapia, para inhibir de forma eficaz el crecimiento de las células de cáncer metastásico de mama que sobreexpresa HER-2/neu. Por lo tanto, durante la terapia es crítica una cuantificación precisa de las concentraciones séricas de trastuzumab.

En una realización de la presente divulgación, la proteína HER-2/neu de longitud completa está compuesta de un dominio citoplasmático, un dominio transmembranario y un dominio extracelular (ECD) que se desprende de la superficie de las células. Se desprende ECD en la sangre de individuos normales y, a menudo, está elevado en pacientes de cáncer metastásico de mama. El trastuzumab administrado para el tratamiento de estas pacientes existe en dos formas distintas en la matriz: el fármaco libre y el fármaco combinado con el ECD. Los niveles elevados de ECD endógeno que circulan tienen como resultado niveles mayores de trastuzumab combinado. Los inmunoensayos estándar para cuantificar el trastuzumab únicamente miden el trastuzumab libre, lo que da lugar a la subestimación de los niveles totales de trastuzumab en circulación. El ensayo desvelado en la presente memoria elimina el problema de la interferencia de ECD y, por lo tanto, la subestimación utilizando un tampón ácido único de disociación que disocia el complejo de trastuzumab-ECD en una única etapa.

La presente divulgación se desarrolla adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos y las figuras asociadas. Sin embargo, no se debería interpretar que estos ejemplos limiten el alcance de la presente divulgación.

Ejemplos**Ejemplo 1:**Preparación de tampón citrato modificado

- 5 En la presente divulgación, se añaden 13,04 g de ácido cítrico monohidratado y 18,48 g de citrato de sodio dihidratado a 950 ml de agua Milli Q y se disuelven. Se regula el pH de la solución a 3,5 añadiendo HCl concentrado (~ 4 ml). Se completa el volumen de la solución hasta 1000 ml y se filtra la solución utilizando una unidad de filtro de 0,22 micrómetros para obtener el tampón citrato modificado.

10 **Ejemplo 2:**ELISA de una única etapa para una cuantificación precisa de trastuzumab en presencia de HER2-ECD interferente

- 15 En la presente divulgación, se recubren con 100 µl de un anticuerpo monoclonal contra la región determinante de la complementariedad (CDR) del trastuzumab placas de microtitulación de 96 pocillos en un tampón PBS a una concentración final de aproximadamente 1 µg/ml y se incuban durante la noche a aproximadamente 4 °C. Se preparan calibradores y controles de calidad (QC) utilizando trastuzumab en muestras de suero a las que se añade o no HER2-ECD recombinante. Se diluyeron muestras aproximadamente 50 veces (dilución requerida mínima, MRD) en tampón citrato modificado que contenía 125 mM de citrato-HCl y 0,1 % de Tween-20 (polisorbato 20) a un pH entre 2,8 a 3,5, y se añaden a las placas de microtitulación recubiertas con anticuerpo bloqueado. Se incuban las placas a 22 °C durante una hora y se lavan cinco veces con PBST. Después del lavado, se añaden a cada pocillo aproximadamente 100 µl de anticuerpo policlonal de detección conjugado con peroxidasa contra la CDR del trastuzumab (1:2500 en PBST) y se incuban a 22 °C durante una hora. Se lavan las placas siete veces con PBST y se añaden aproximadamente 100 µl de sustrato cromogénico TMB a cada pocillo. Después de una incubación de 15 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 0,1 N y se leyó la placa a 450 nm con una sustracción de fondo a 630 nm.

Ejemplo 3:

- 30 Investigación de la interferencia de HER2-ECD sobre la curva de calibración del suero de Trastuzumab y estudio del efecto del tampón citrato modificado sobre la misma

- En la presente divulgación, para investigar la interferencia de HER2-ECD sobre la curva de calibración del suero de trastuzumab, se crean curvas de calibración de trastuzumab en un suero acumulado de una hembra sana que contiene bien 0 ng/ml, bien 250 ng/ml o bien 500 ng/ml de HER2-ECD recombinante añadido. Se hace que las muestras experimenten una MRD de 50 veces en diluyentes apropiados — Figura 1. La curva de calibración de Trastuzumab se creó utilizando el ensayo ELISA según se ha descrito anteriormente.

- La Figura (1A) muestra que el aumento de la cantidad de HER2-ECD recombinante añadido tuvo como resultado un desplazamiento de la ubicación de las curvas de calibración de Trastuzumab en diluyente de PBST. La Figura (1B) muestra que se superó la interferencia de HER2-ECD añadido cuando las muestras de suero experimentaron la MRD en el diluyente de tampón citrato modificado (pH de 3,5) que contenía polisorbato 20. La dilución de muestras que contenían HER2-ECD añadido y trastuzumab en el tampón citrato modificado que contenía polisorbato 20 tuvo como resultado la disociación del complejo inmunitario formado entre el analito (trastuzumab) y la diana (HER2-ECD).

Ejemplo 4:Determinación del pH ácido óptimo del tampón para disociar el complejo de Trastuzumab-HER2-ECD

- 50 En la presente divulgación, para determinar el pH ácido óptimo requerido para disociar el complejo de trastuzumab-HER2-ECD, se somete a ensayo un tampón ácido, citrato en tres valores distintos de pH como diluyentes de ensayo para MRD. También se utiliza un diluyente de PBST como control. Se crean curvas de calibración de Trastuzumab en suero sin HER2-ECD añadido y se preparan muestras QC de trastuzumab (500 ng/ml en suero puro) en 500 ng/ml de suero al que se había añadido HER2-ECD recombinante. Se hace que los patrones de calibración y los QC experimenten una MRD en cada uno de los cuatro diluyentes. Se retrocalcula la recuperación analítica de las muestras QC en cada diluyente a partir de la curva de calibración preparada en el diluyente correspondiente. Cuanto menor sea el error relativo porcentual de recuperación del QC de trastuzumab, mejor es el tampón. Según se muestra en la anterior tabla 1, se requiere un pH de 2,5 a 3,8 para obtener la máxima recuperación de las muestras QC de trastuzumab realizadas en suero al que se había añadido HER2-ECD, mostrando el pH de 3,5 el mejor resultado. La curva de calibración de Trastuzumab se realizó utilizando el ensayo ELISA, según se ha descrito anteriormente.

65

TABLA 1: pH óptimo del diluyente del ensayo para una recuperación analítica máxima de LLOQ-QC (límite inferior de cuantificación del control de calidad) de Trastuzumab

M. n.º	Tampón	pH	% de recuperación analítica del QC de trastuzumab (500 ng/ml) en 500 ng/ml de suero al que se había añadido HER2 ECD	% de error relativo de recuperación del QC de trastuzumab (500 ng/ml) en 500 ng/ml de suero al que se había añadido HER2 ECD
1	PBST	7,4	32,4	67,6
2	Tampón citrato + 0,1 % de polisorbato-20	4,5	46,5	53,5
3	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	4,0	74,78	25,22
4	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	3,8	90,29	9,71
5	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	3,5	104,67	4,67
6	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	3,0	108,41	8,41
7	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	2,5	88,77	11,23
8	Citrato modificado + 0,1 % de polisorbato-20	2,0	ND	ND

Ejemplo 5:Comparación de tampones para obtener una recuperación analítica máxima del QC de trastuzumab

5 En la presente divulgación, se comparan diversos tampones ácidos a un pH de 3,5 para MRD de muestras para evaluar la combinación más adecuada de sal y de ácido débil para anular la interferencia provocada por HER2-ECD y maximizar la recuperación analítica de muestras QC. Se crean la curva de calibración de Trastuzumab, los QC de trastuzumab (500 ng/ml y 1500 ng/ml en suero puro) en 1 µg/ml de suero al que se había añadido HER2-ECD y se hace que experimenten una MRD 50 veces en cuatro diluyentes distintos. El ensayo ELISA también incluye una

10 curva de calibración de trastuzumab de control realizada en suero sin HER2-ECD añadido y diluido 50 veces en PBST. La recuperación analítica de muestras QC en cada diluyente se retrocalcula a partir de la curva de calibración de trastuzumab de control realizada en suero sin HER2-ECD añadido y diluido 50 veces en PBST.

15 La Figura 2 muestra que el uso de diluyente de tampón citrato modificado tiene como resultado un desplazamiento mínimo de la curva de calibración inducido por 1 µg/ml de HER2-ECD añadido, en comparación con la curva de calibración de suero de control diluido en PBST sin adición.

20 En la presente divulgación, la dilución de muestras en otros tampones ácidos del mismo pH (tampón convencional de citrato sin la adición de HCl y de glicina-HCl) no llegó a anular el desplazamiento de la curva de calibración inducido por HER2-ECD, según se muestra en la siguiente Tabla 2. La máxima recuperación de las muestras del QC de trastuzumab (500 ng/ml y 1500 ng/ml en suero puro) se observa cuando se utiliza diluyente de tampón citrato modificado.

TABLA 2: Comparación de diversos tampones para obtener una recuperación analítica máxima del QC de trastuzumab

M. n.º	Tampón	% de recuperación analítica del QC de trastuzumab en 1 µg/ml de suero al que se había añadido HER2-ECD	
		LLOQ QC (500 ng/ml))	QC bajo (1500 ng/ml(
1	PBST	10,28	40,97
2	Glicina HCl, pH de 3,5	Fuera de intervalo	9,82
3	Tampón citrato + 0,1 % de polisorbato 20, pH de 3,5	72,56	75,16
4	Tampón citrato modificado + 0,1 % de polisorbato 20, pH de 3,5	86,06	86,82

30 Esto hace hincapié en la criticidad de la composición del tampón citrato modificado sobre la recuperación del QC de trastuzumab en presencia de HER2-ECD.

Ejemplo 6:Determinación de tolerancia HER2-ECD del inmunoensayo modificado utilizando diluyente de tampón citrato modificado

En la presente divulgación, para determinar la máxima concentración de HER2-ECD desprendido que puede ser tolerada por el inmunoensayo mejorado que utiliza diluyente de tampón citrato modificado que contiene polisorbato 20, se crean QC (375 ng/ml, 1125 ng/ml y 7500 ng/ml) de trastuzumab en muestras de suero que contienen cantidades crecientes de HER2-ECD recombinante. Se hace que los patrones de calibración y las muestras QC experimenten una MRD 50 veces en tampón citrato modificado que contiene polisorbato 20. Las recuperaciones analíticas de QC se retrocalculan a partir de una curva de calibración de trastuzumab realizada en suero sin adición. Se observa que los QC de trastuzumab pueden ser recuperados de forma fiable a partir de muestras que contienen hasta 2 µg/ml de HER2-ECD, según se muestra en la siguiente Tabla 3. El ensayo utilizado en este experimento es ELISA.

TABLA 3- Determinación de la tolerancia a HER2-ECD del inmunoensayo modificado utilizando diluyente de tampón citrato modificado

M. n.º	Nivel de HER2-ECD añadido (ng/ml)	% de recuperación analítica del QC de trastuzumab en muestras a las que se había añadido HER2-ECD recombinante		
		375 ng/ml	1125 ng/ml	7500 ng/ml
1	50	106,11	100,37	93,11
2	500	97,11	98,27	95,04
3	1000	96,45	94,49	94,64
4	2000	98,01	92,09	95,30

Ejemplo 7:Recuperación analítica del QC de trastuzumab en muestras de paciente con cáncer metastásico de mama con niveles variables de HER2-ECD desprendido

En la presente divulgación, la recuperación analítica de los QC de trastuzumab realizados en muestras de suero de cáncer metastásico de mama (MBC) que contienen niveles variables de HER2-ECD desprendido endógeno se muestra en la siguiente Tabla 4. Una curva de calibración de trastuzumab creada en sueros acumulados de una hembra sana sin adiciones y los QC de trastuzumab creados en muestras de suero de MBC se diluyen 50 veces utilizando bien PBST o bien tampón citrato modificado que contiene polisorbato 20. Las recuperaciones analíticas de QC se retrocalculan a partir de la correspondiente curva de calibración del diluyente. Como puede verse en la siguiente Tabla 4, el uso de diluyente de tampón citrato modificado tiene como resultado recuperaciones óptimas del QC de trastuzumab en comparación con el diluyente de PBST. El ensayo llevado a cabo es ELISA. Las concentraciones de HER2-ECD desprendido endógeno se evalúan en muestras de paciente de MBC mediante un equipo ELISA disponible.

TABLA 4: Recuperación analítica del QC de trastuzumab en muestras de paciente de cáncer metastásico de mama con niveles variables de HER2-ECD desprendido. El uso de diluyente de tampón citrato modificado tuvo como resultado recuperaciones óptimas del QC de trastuzumab en comparación con el diluyente de PBST.

N.º de paciente	Nivel de HER2-ECD desprendido (ng/ml)	% de recuperación analítica de los QC de trastuzumab en pacientes de cáncer metastásico de mama en LLOQ QC (500 ng/ml)	
		Diluyente de PBST	Diluyente de tampón citrato modificado que contiene polisorbato 20
1	33,7	95,02	99,93
2	56,8	87,37	97,02
3	77,5	86,23	100
4	170	83,02	103,32
5	211,6	74,22	95,3
6	580	67,06	106,17
7	716,9	ND	104,48
8	833,6	ND	95,09
9	4761,8	BQL	87,29

*ND: No realizado; BQL: por debajo del límite de cuantificación.

Por lo tanto, a partir de los ejemplos anteriores, es evidente que el proceso de la presente divulgación que utiliza el tampón citrato modificado es capaz de determinar y de cuantificar analitos con precisión, tales como el anticuerpo HER-2 en una muestra biológica que contiene una diana soluble para el analito, tal como HER-2 ECD. Se observa que los QC de Trastuzumab pueden recuperarse de forma fiable a partir de las muestras que contienen hasta 4,7

µg/ml de HER2-ECD, según se muestra en la Tabla 4 anterior.

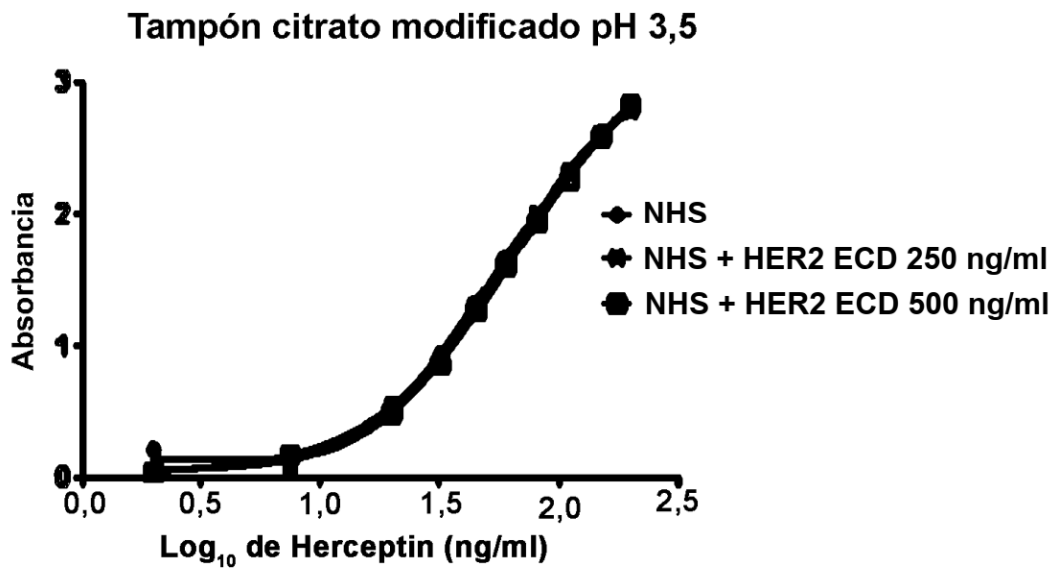
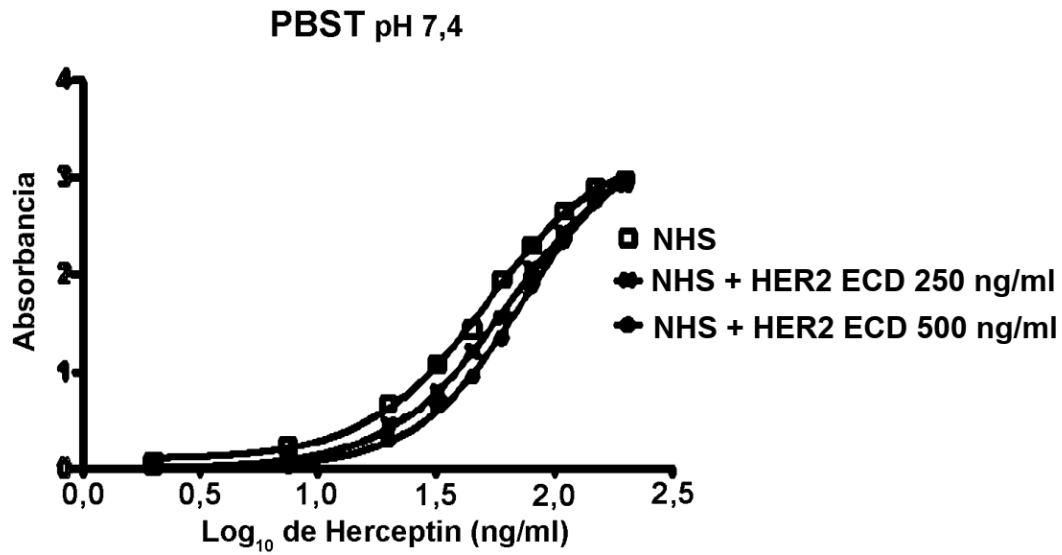
Otras realizaciones

- 5 Aunque se han descrito en la presente memoria varias realizaciones y ejemplos de la presente invención, es evidente que estos ejemplos y realizaciones pueden ser alterados para proporcionar realizaciones y ejemplos adicionales que utilizan los procesos de la presente invención. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de la presente invención ha de definirse por las reivindicaciones adjuntas, en vez de por las realizaciones específicas que se han representado anteriormente a título de ejemplo.

10

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la detección y la cuantificación opcional del anticuerpo trastuzumab en una muestra biológica, en donde la muestra biológica comprende un dominio extracelular de HER-2 (HER-2-ECD) como una sustancia interferente y HER-2-ECD tiene capacidad para formar un complejo con el anticuerpo trastuzumab, comprendiendo el proceso
 - (a) proporcionar un tampón citrato a la muestra biológica, comprendiendo el tampón citrato citrato de sodio, ácido cítrico, polisorbato-20 y HCl, que tiene un pH desde 2,5 hasta 3,8, en donde el tampón citrato comprende citrato-HCl a una concentración de aproximadamente 125 mM y polisorbato-20 a una concentración de aproximadamente el 0,1 % p/v, y
 - (b) llevar a cabo un ensayo para dicha detección y dicha cuantificación opcional del analito en la muestra biológica.
2. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es sangre, plasma, suero o cualquier combinación de los mismos.
3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
4. El proceso de la reivindicación 3, en donde el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fase doble y se lleva a cabo en presencia de un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, un reactivo para reaccionar con el anticuerpo de detección, una placa de microtitulación, un tampón de recubrimiento, una solución de lavado, una solución de parada o cualquier combinación de los mismos, en donde, opcionalmente:
 - (a) el anticuerpo de captura es un anticuerpo contra el analito en la muestra biológica, o
 - (b) el anticuerpo de detección está marcado con una enzima seleccionada del grupo que comprende peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina y rutenio, o
 - (c) el reactivo para reaccionar con el anticuerpo marcado es sustrato cromogénico seleccionado entre ABTS (sal diamónica de ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico], TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y sustrato electroquimioluminiscente, o
 - (d) el tampón de recubrimiento es solución salina tamponada con fosfato, o
 - (e) la solución de lavado comprende solución salina tamponada con fosfato y Tween-20, o
 - (f) la solución de parada es ácido sulfúrico 0,1 N.
5. El proceso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el ELISA comprende:
 - a. recubrir una superficie sólida con el anticuerpo de captura contra el analito;
 - b. proporcionar el tampón citrato a la muestra biológica para obtener una muestra biológica diluida;
 - c. añadir la muestra diluida al soporte recubierto con anticuerpo de la etapa (a);
 - d. incubar y lavar el soporte para eliminar cualquier analito no unido;
 - e. añadir un anticuerpo marcado de detección contra el analito y lavar el soporte para eliminar cualquier anticuerpo no unido de detección; y
 - f. añadir reactivo para reaccionar con el anticuerpo marcado para detectar y cuantificar opcionalmente el analito en la muestra.
6. Un método de disociación de un complejo formado mediante la interacción del anticuerpo trastuzumab y al menos una sustancia interferente como diana para el anticuerpo en una muestra biológica, comprendiendo dicho método proporcionar un tampón citrato a la muestra biológica para disociar el complejo, en donde el tampón citrato comprende citrato de sodio, ácido cítrico, polisorbato-20 y HCl, tiene un pH desde 2,5 hasta 3,8 y comprende citrato-HCl a una concentración de aproximadamente 125 mM y polisorbato-20 a una concentración de aproximadamente el 0,1 % p/v, en donde la sustancia interferente es HER-2-ECD, en donde HER-2-ECD tiene capacidad para formar un complejo con el anticuerpo trastuzumab.
7. El uso de un tampón citrato que comprende citrato de sodio, ácido cítrico, polisorbato-20 y HCl, que tiene un pH desde 2,5 hasta 3,8, y comprende citrato-HCl, a una concentración de aproximadamente 125 mM y polisorbato-20 a una concentración de aproximadamente el 0,1 % p/v, para detectar y cuantificar opcionalmente la presencia del anticuerpo trastuzumab en una muestra biológica, en donde la muestra biológica comprende un dominio extracelular de HER-2 (HER-2-ECD), y en donde el HER-2-ECD tiene capacidad para formar un complejo con el anticuerpo trastuzumab.



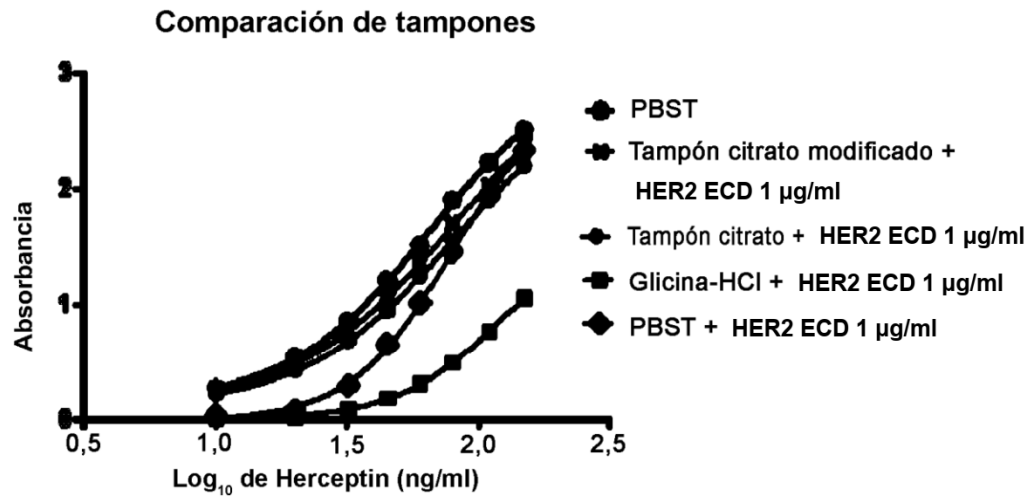


FIG. 2