

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 718**

51 Int. Cl.:

B01J 13/10	(2006.01)	C07K 16/26	(2006.01)
B01J 13/14	(2006.01)	B01D 15/34	(2006.01)
B01J 13/20	(2006.01)	B01D 15/38	(2006.01)
B01J 13/22	(2006.01)		
B01J 20/32	(2006.01)		
B01J 20/28	(2006.01)		
G01N 33/74	(2006.01)		
G01N 33/78	(2006.01)		
G01N 33/543	(2006.01)		
C07K 1/22	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.08.2019** **PCT/EP2019/072289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2020** **WO20038954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2019** **E 19758936 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** **EP 3840874**

54 Título: **Composición de sorbente para el tratamiento preanalítico de muestras**

30 Prioridad:

20.08.2018 DE 102018120153

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

30.10.2024

73 Titular/es:

IMMUNDIAGNOSTIK AG (100.0%)
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE

72 Inventor/es:

ARMBRUSTER, FRANZ-PAUL y
HELMSCHRODT, ANJA

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 984 718 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

Composición de sorbente para el tratamiento preanalítico de muestras

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de sorbente que contiene microcápsulas donde un material de núcleo sorbente está encapsulado en una membrana semipermeable que es permeable a péptidos más pequeños e impermeable a proteínas más grandes, y en particular a una composición de sorbente para el tratamiento *in vitro* de plasma o suero previo a análisis clínico.

Antecedentes de la invención

La hormona paratiroidea (PTH) desempeña un papel esencial en la homeostasis de los contenidos de calcio y fosfato en la sangre circulante, así como en la mineralización y formación de los huesos. Los trastornos paratiroideos ocurren cuando las glándulas paratiroides producen en exceso o en defecto la hormona paratiroidea (PTH) y un trastorno endocrino común es el hiperparatiroidismo, con una prevalencia estimada de uno a siete casos por cada 1000 adultos, y una incidencia y prevalencia aún mayores en mujeres posmenstruales y en pacientes bajo diálisis. Los niveles elevados de PTH provocan niveles elevados de calcio en la sangre debido a la eliminación del calcio de los huesos, una mayor absorción de calcio en los intestinos y una menor liberación de calcio en la orina. Esto puede provocar aterosclerosis y debilitamiento de los huesos (osteoporosis), además de náuseas, fatiga y otros síntomas.

Por lo tanto, el nivel de PTH en suero o plasma es un parámetro importante en el diagnóstico clínico, a pesar de la inconsistencia clínica observada y la variabilidad de los niveles de PTH en suero de acuerdo con diversos métodos de medición (documentos WO2014/135701, EP2775306, EP2817337, EP2631247, EP1240527). También ha habido intentos de establecer un procedimiento de referencia mediante un muestreo y almacenamiento preanalítico estándar con el objetivo de producir una guía de buenas prácticas para las mediciones de PTH (Hanon et al, Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review, Clin Chem Lab Med 2013; 51(10):1925-1941). Los factores que afectan la estabilidad de la PTH pueden incluir variaciones circadianas y estacionales, el metabolismo, degradación proteolítica y estado de vitamina D, pero los péptidos de PTH humana también pueden desactivarse *in vivo* por oxidación y estrés oxidativo. Químicamente, la oxidación de proteínas es causada *in vivo* por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), moléculas nitrosactivas y nitrativas (NOS), nitrotirosina, isoprostanos, ácido hipocloroso (HOCl), radicales libres como el radical hidroxilo (OH), productos de oxidación secundarios formados durante la peroxidación lipídica (p. ej., malondialdehído o 4-hidroxinonanal) o azúcares reactivos en reacciones de glicación o glicoxidación. Las etiologías y fisiopatologías típicas del estrés oxidativo son el tabaquismo, el tratamiento de diálisis, la diabetes (hiperglucemia), la respuesta inflamatoria, traumatismo, aumento de la muerte celular y la apoptosis, hemoglobina libre, aterogénesis, cambios microcirculatorios, estrés adrenérgico, etc. En patologías ocultas puede producirse un desequilibrio entre los mecanismos oxidativos y antioxidativos, demasiado numerosos para ser recitados aquí. En general, los pacientes que padecen uremia y/o están sometidos a hemodiálisis sufren un grado variable pero mayormente elevado de estrés oxidativo, de modo que los péptidos de la PTH circulantes pueden oxidarse.

Estudios recientes han demostrado que las decisiones médicas y la medicación pueden ser erróneas si se ignora el nivel de oxidación de PTH. La oxidación de PTH varía mucho entre los pacientes (Hoher et al. (2012) Measuring Parathyroid Hormone (PTH) in Patients with Oxidative Stress - Do We Need a Fourth Generation Parathyroid Hormone Assay?, PLoS ONE 7(7): e40242. doi:10.1371/journal.pone.0040242). Los métodos hasta ahora para determinar los niveles de PTH no oxidada en muestras de suero o sangre no pueden realizarse mediante análisis automáticos o adolecen de otras desventajas.

Los radioinmunoensayos de dos sitios y los ELISA son las técnicas comunes para medir el nivel de PTH en sangre. El enmascaramiento selectivo de los péptidos de PTH oxidados requiere, sin embargo, un par específico de anticuerpos monoclonales (documentos WO2013/124462, WO2014/135701 y EP1240527). Este método debe competir con otros métodos de medición establecidos. El estado de la técnica, por lo tanto, representa un problema. Existe la necesidad de una preparación preanalítica automática de muestras de suero o plasma que comprenda una eliminación de PTH oxidada para que dichas muestras tratadas puedan someterse a un análisis de PTH convencional, digamos para una determinación de la fracción efectiva de PTH no oxidada en la muestra.

El documento US 4257884 divulga microcápsulas semipermeables para un material de columna cromatográfica sorbente. Las cápsulas se preparan disolviendo anticuerpos en una solución salina fisiológica y goteando la solución en un tampón acuoso que contiene iones divalentes y un macropolímero policatiónico. El documento WO 2008/045806 A2 divulga microcápsulas con una membrana multicapa que contiene capas alternas de polímeros policatiónicos y aniónicos sobre un núcleo interno de alginato. El objetivo es encapsular células de injerto para el tratamiento de diversas enfermedades. Por lo tanto, las microcápsulas que permiten la exclusión de sustancias de alto peso molecular en suero o plasma y la inmunorreacción dentro de la microcápsula para analitos de bajo peso molecular siguen siendo un objetivo deseable.

Sumario de la invención

Aspectos particulares y preferidos de la presente invención se establecen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con características de las reivindicaciones independientes y con características de otras reivindicaciones dependientes según corresponda y no simplemente como se establece explícitamente en las reivindicaciones.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para obtener un material sorbente para la preparación preanalítica de muestras de suero o plasma como se indica en la reivindicación 1, así como microcápsulas como se indica en la reivindicación 8. Otro aspecto se refiere al uso de esas microcápsulas en un método de análisis como se indica en la reivindicación 12, que proporciona la ventaja de que puede implementarse fácilmente en analizadores automáticos y dispositivos automáticos de preparación de muestras actuales.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para obtener un material sorbente para el pretratamiento inmunológico de un líquido biológico, en donde el material sorbente está caracterizado por microcápsulas que se pueden obtener mediante las etapas de

- (i) solubilizar anticuerpos en un tampón fisiológico que contiene del 0,3 al 2,5 por ciento en peso de ácido algínico y añadir dicha solución de alginato de anticuerpo a una solución que contiene iones de una sal bivalente para obtener núcleos sorbentes que tienen diámetros de 0,5 a 5,0 milímetros y volúmenes en el intervalo de 0,1 a 50 microlitros;
- (ii) sumergir dichos núcleos sorbentes en soluciones líquidas que contienen de manera alterna o bien un polímero policatiónico o un polímero polianiónico para una deposición electrostática capa por capa de una o más capas con cargas opuestas para obtener fases líquido-líquido ricas en macroiones que rodean dichos núcleos sorbentes;
- (iii) madurar las fases líquido-líquido ricas en macroiones mediante acervación compleja a temperatura ambiente durante un período de tiempo en un entorno acuoso para obtener microcápsulas que consisten en núcleos sorbentes rodeados por una multicapa endurecida rica en macroiones;
- (iv) liofilizar dichas microcápsulas para obtener microcápsulas con una multicapa endurecida rica en macroiones que es permeable a proteínas de un peso molecular no superior a aproximadamente 100.000 Daltons;
- (v) acondicionar dichas microcápsulas semipermeables y, si es necesario, clasificar, para obtener microcápsulas que puedan agregarse a fluidos biológicos para el tratamiento inmunológico y la eliminación de componentes peptídicos menores de 100.000 Daltons.

En realizaciones preferidas, dicha una o más capas policatiónicas comprenden un polication seleccionado del grupo polietilenimina ramificada, polialilamina o polivinilamina que tienen pesos moleculares promedio M_n de aproximadamente 100.000 a 2.000.000 Daltons.

En una realización, dichas capas polianiónicas comprenden un polianión seleccionado del grupo pectina (éster metílico del ácido poli-D-galacturónico) que tiene un peso molecular M_n de aproximadamente 20.000 a 200.000 Daltons, ácido poliacrílico que tiene un peso molecular M_n de aproximadamente 10.000 a 350.000 Daltons; carboximetilcelulosa que tiene un peso molecular M_n de aproximadamente 80.000 a 1.000.000 Daltons.

En otras realizaciones, la membrana multicapa puede tener una o más capas intermedias y/o una capa externa que comprende un políglicano seleccionado del grupo que comprende poliaminosacárido, quitosano, ácido algínico, glicosaminoglicano, ácido hialurónico.

En realizaciones preferidas, dichos anticuerpos se unen específicamente a péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada que tienen un peso molecular de 9500 Daltons o menos. En la mayoría de las realizaciones preferidas, dichos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo ubicado en la PTH humana oxidada entre los aminoácidos 3 a 34.

De acuerdo con realizaciones preferidas, dichos núcleos sorbentes comprenden aproximadamente el 1 por ciento en peso (p/v) de ácido algínico en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada.

Otro aspecto de la divulgación proporciona microcápsulas obtenidas anteriormente para el pretratamiento inmunológico de un líquido biológico, microcápsulas que comprenden: -

- un núcleo sorbente compuesto de anticuerpos y del 0,3 al 2,5 % (p/v) de ácido algínico en un tampón acuoso de unión anticuerpos, núcleo que tiene un volumen de 0,1 a 50 microlitros y un diámetro de 0,5 a 5,0 mm y está rodeado por
- una multicapa permeable a proteínas no más grandes de 100 kDa hecha de capas dispuestas de manera alterna de polímeros líquidos con cargas opuestas en un entorno acuoso, en donde los polímeros policatiónicos elegidos se seleccionan del grupo que comprende polietilenimina lineal o ramificada, polialilamina o polivinilamina que tienen un peso molecular promedio M_n de aproximadamente 100.000 a 2.000.000 Daltons, y
- los polímeros polianiónicos se seleccionan del grupo que comprende pectina (éster metílico del ácido poli-D-

galacturónico) que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 20.000 a 200.000 Daltons, ácido poliacrílico que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 10.000 a 350.000 Daltons, carboximetilcelulosa que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 80.000 a 1.000.000 Daltons.

5 De acuerdo con realizaciones preferidas, las capas dobles dispuestas de manera alterna de polímeros policatiónicos y polianiónicos están facultativamente separadas por capas intermedias y/o recubiertas por una capa más externa que comprende un políglicano seleccionado del grupo que comprende poliaminosacáridos, quitosano, alginato, glicosaminoglicano, ácido hialurónico.

10 De acuerdo con realizaciones preferidas, dichas una o más capas policatiónicas comprenden polietilenimina altamente ramificada y tienen un peso molecular promedio Mn de aproximadamente 500.000 a 2.000.000 Daltons.

De acuerdo con realizaciones particulares preferidas, los núcleos sorbentes contienen anticuerpos que se unen específicamente a los péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada.

15 Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de un material sorbente o microcápsulas como se describe y reivindica para el tratamiento preanalítico de plasma o suero en un sistema de prueba automatizado para la eliminación de componentes que interfieren con una medición cuantitativa de un analito. En una realización preferida, el analito es hormona paratiroidea (PTH) humana no oxidada.

20 La presente divulgación proporciona métodos y materiales sorbentes desarrollados para una preparación y tratamiento preanalíticos de muestras de suero o plasma que deben evaluarse por su contenido de PTH no oxidadas, ya que las preparaciones basadas en cromatografía en columna no pueden integrarse fácilmente en procedimientos automatizados estándar para un inmunoensayo de dos sitios. Las perlas recubiertas de anticuerpos no son una opción para una preparación preanalítica automatizada de muestras de plasma o suero, ya que requieren etapas de lavado para superar una unión inespecífica de proteínas. Si bien la captura de analitos basada en perlas magnéticas se ha convertido en un método omnipresente en la química clínica, permitiendo una captura altamente específica del analito objetivo mediante una simple manipulación magnética, tampoco sirven para eliminar componentes perturbadores. En última instancia, el material sorbente ideal es aquel que no solo facilita la eliminación de componentes, sino que también demuestra ser selectivo y compatible con una amplia gama de aplicaciones posteriores y criterios de valoración analíticos. La presente divulgación proporciona un material sorbente distinto y microcápsulas, así como un método para obtener las mismas, cuyas ventajas específicas facilitan los objetivos analíticos. Las microcápsulas se pueden integrar fácilmente en aplicaciones analíticas que no están disponibles para perlas recubiertas de anticuerpos. Se descubrió que las microcápsulas liofilizadas que consisten en una matriz de alginato seca, las sales secas de un tampón de unión a anticuerpos y un anticuerpo si están rodeadas por capas dobles de polímeros ricos en macroiones, proporcionan condiciones para una reacción anticuerpo-antígeno específica que no requiere pasos de lavado adicionales por ser altamente específica y selectiva. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, creemos que la especificidad y selectividad de la reacción anticuerpo-antígeno proviene del grado reducido de movilidad y motilidad de las proteínas dentro de la matriz de alginato, así como de la exclusión total o parcial de otros componentes de alto peso molecular presentes en el suero o plasma. La proporción de proteínas de alto peso molecular comprende las globulinas, fibrinógeno, lipoproteínas, transferrina, plasminógeno, macroglobulina, haptoglobina, trombina, albúmina. Si bien se sabía que realizaba reacciones enzimáticas en la superficie y dentro de las microcápsulas, la presente divulgación divulga una reacción inmunológica específica y selectiva dentro de núcleos de alginato junto con una prepurificación parcial de la muestra mediante una filtración selectiva a través de una doble membrana semipermeable que elimina la necesidad de pasos de lavado para una reacción inmunitaria específica. Por tanto, la reacción inmunitaria purificante puede integrarse fácilmente en un procedimiento automatizado.

La divulgación permite además una fácil adaptación del método en sistemas automatizados, ya que existen múltiples métodos disponibles para una separación automatizada de partículas grandes de un líquido biológico, p. ej. por filtración a través de un tamiz. Como el número de microcápsulas añadidas se puede contar fácilmente, quitando una etapa de pipeteado, las cantidades añadidas de anticuerpos se pueden controlar "más estrictamente", lo que reduce las variaciones intraensayo.

Las características anteriores y otras características, rasgos y ventajas proporcionados por la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y los dibujos adjuntos, que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención. La presente descripción se proporciona solamente como ejemplo.

Breve descripción de los dibujos

60 En los dibujos: -

Figura 1A, B una representación esquemática del dispositivo y la boquilla para preparar gotas de alginato de tamaño homogéneo;

Figura 2 es una representación esquemática de las etapas del proceso para una deposición capa por capa de una multicapa semipermeable mediante coacervación de fases ricas en macroiones con cargas opuestas;

- Figura 3** es un diagrama que muestra las concentraciones de PTH no oxidada en una muestra de un individuo sano (NOX) después de diversos tratamientos previos para eliminar los péptidos de PTH oxidada;
- Figura 4** es un diagrama que muestra las concentraciones de PTH no oxidada en una muestra de un paciente sujeto a estrés oxidativo (OX) después de diversos tratamientos previos para eliminar los péptidos de PTH oxidada;
- Figura 5** Es un diagrama que muestra la concentración de PTH no oxidada en PTH sintética disponible comercialmente (Bachem) después de diferentes tratamientos previos.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un método para un tratamiento preanalítico de muestras de suero o plasma, porque la presencia de péptidos de la PTH oxidada (oxPTH) en plasma y suero interfiere con la evaluación del nivel eficaz de la PTH biológicamente activa. Sin embargo, la divulgación no se limita a esta aplicación específica, digamos un agotamiento de las muestras de suero a partir de péptidos de la PTH oxidada. Aunque no se puede atribuir actividad a los péptidos de la PTH oxidada, investigaciones recientes sugieren que es necesario diferenciar entre los niveles de la PTH oxidada y no oxidada en suero. En la actualidad, las mediciones clínicas de los péptidos de la PTH "bioactiva" en suero o plasma conducen a una medicación equivocada, independientemente del tipo o "generación" de medición de PTH utilizada. Por lo tanto, es necesario eliminar de la determinación los péptidos de PTH inactiva que se han oxidado parcialmente *in vivo*. En la actualidad, a muchos pacientes se les diagnostica erróneamente hiperparatiroidismo secundario y se les medica en consecuencia (para reducir aún más el nivel de la PTH circulante), mientras que ya padecen niveles (demasiado) bajos de *PTH fisiológicamente activa*.

Esto puede contribuir a la mortalidad anual de alrededor del 10 al 20 % en pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 5 (Melamed ML. et al, Third-generation parathyroid hormone assays and all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study, *Nephrol Dial Transplant*, 2008; 23(5): 1650-8). Se ha especulado que la PTH oxidada posiblemente sea una toxina urémica con efectos sistémicos que conducen a trastornos óseos (osteodistrofia renal), miopatía, anomalías neurológicas, anemia, prurito y miocardiopatía. El hiperparatiroidismo se diagnostica muy a menudo en pacientes con ERC y no cabe duda de que niveles demasiado bajos o demasiado altos de PTH en pacientes en hemodiálisis están asociados con enfermedades cardiovasculares, morbilidad y aumento de la mortalidad por todas las causas (Floege J. et al, ARC investigators. Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26:1948-1955; Torres PA et al, Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012; 82:19-25; Souberbielle JC *et al.* en Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney Int*. 2010;77:93-100).

Las directrices de Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) recomiendan medir las concentraciones de PTH en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y ajustar la medicación de los pacientes (p. ej., vitamina D, ligantes de fosfato, calcimiméticos) de manera que los niveles plasmáticos de PTH se mantengan dentro de un intervalo objetivo de acuerdo con el estadio de la ERC (p. ej., de 150 a 300 ng/l en pacientes con ERC en estadio 5). Sin embargo, las mediciones de PTH son inútiles, si se mide un nivel combinado de PTH oxidada y no oxidada y no el nivel de PTH no oxidada circulante (n-oxPTH). Si un paciente padece enfermedad renal crónica (ERC), el equilibrio redox a menudo puede inclinarse a favor de una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres (estrés oxidativo). La oxidación de moléculas entonces cobra relevancia, en particular, cuando el paciente está en diálisis. La muestra de suero o plasma de ese paciente puede contener una cantidad sustancial de PTH oxidada y biológicamente falsa que se medirá como "PTH activa".

En la práctica, se necesita un procedimiento automatizado en vista del elevado número de muestras y sondas. Actualmente no está disponible la eliminación automatizada de PTH inactiva de la muestra. En una realización preferida, las muestras de plasma o suero se tratan preanalíticamente poniéndolas en contacto con microcápsulas de sorbente que comprenden anticuerpos contra la oxPTH y posteriormente se eliminan con dichas microcápsulas de modo que la muestra se agota de PTH inactiva. La presente divulgación no se refiere a la medición del nivel de PTH en plasma o suero en sí, sino a una preparación de muestra preanalítica. La preparación de muestra preanalítica también permite indirectamente determinar el contenido de PTH oxidada en dicha muestra, si se añade una etapa de licuar dichas microesferas. La PTH oxidada liberada puede determinarse entonces mediante métodos convencionales. Se puede obtener una relicuación del alginato de calcio mediante la eliminación de los cationes multivalentes, p. ej. mediante una adición de EDTA o EGTA o citrato. Sin embargo, el método principal es la preparación de muestras de suero o plasma sin PTH oxidada. La muestra libre de péptidos de PTH oxidada se puede entonces someter a un ensayo de PTH convencional que puede ser un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, RIA y/o un ensayo que utiliza espectrometría de masas en tándem como se describe en la técnica anterior.

El presente método para la preparación de muestra preanalítica comprende poner en contacto plasma o suero con una o más microcápsulas que consisten en una microesfera hidrocoloide gelificada rodeada por multicapas o recubrimientos semipermeables. Las microesferas de alginato gelificado contienen además receptores (anticuerpos) dispersos o disueltos, que en una realización preferida son específicos para PTH oxidada. Las multicapas o membranas semipermeables no contienen receptores (anticuerpos), ni incrustados ni en el exterior, de modo que la reacción inmunitaria es específica para las moléculas que han atravesado la membrana y han penetrado en la

microesfera de núcleo, digamos moléculas y proteínas que tienen menos de 100 kDa. Por lo tanto, una porción sustancial de las proteínas del plasma y del suero puede excluirse de la reacción inmunitaria, lo que elimina la necesidad de etapas de lavado para hacer que la reacción inmunitaria sea específica. Las esferas o perlas recubiertas de anticuerpos convencionales, como las que se utilizan en las inmunocolumnas, requieren etapas de lavado. Esto también se aplica a las perlas magnéticas. Además, las perlas o esferas recubiertas de anticuerpos no pueden integrarse fácilmente en máquinas convencionales para inmunoensayo.

La presente divulgación también contempla la licuación de dichos núcleos de alginato dentro de membranas endurecidas semipermeables de modo que dichos receptores estén finalmente en solución para una unión acelerada. Una realización de este tipo puede proporcionar una unión anticuerpo-antígeno optimizada en un procedimiento automatizado. Los receptores pueden ser anticuerpos recombinantes o anticuerpos de cadena sencilla acoplados a una proteína portadora de gran tamaño.

Dicho recubrimiento multicapa o membrana semipermeable puede ajustarse para permitir un tránsito de moléculas que tengan pesos moleculares inferiores a 50 kDa, preferentemente menos de 30 kDa. El límite superior para el paso de proteínas a través de la membrana se puede ajustar según sea necesario con un límite superior de 100 kDa para que las inmunoglobulinas no puedan atravesar la doble membrana. Una permeabilidad del 50 % a 50 kDa normalmente da como resultado una impermeabilidad total para proteínas más grandes de 100 kDa. Una permeabilidad del 50 % a 50 kDa normalmente reduce la unión inespecífica dentro del compartimento del anticuerpo en más del 95 % (p/p) con respecto a la proteína total en plasma o suero. Dicho de otro modo, las proteínas predominantes en suero y plasma como albúmina, fibrinógenos, globulinas grandes, haptoglobina, ceruloplasmina, macroglobulina quedan excluidas de la reacción inmunitaria.

Por lo tanto, un aspecto de la invención son las microcápsulas que comprenden una microesfera gelificada de un hidrocoloide o alginato, microesfera que está recubierta por una membrana semipermeable o capas de polímeros con cargas opuestas. Dicha membrana o recubrimiento de doble capa puede diseñarse para permitir el paso de proteínas que tienen pesos moleculares inferiores a 50 kDa, preferentemente de 30 kDa a 1 kDa. En una realización, el recubrimiento puede permitir el paso de moléculas que tienen pesos moleculares de 40 kDa a 1 kDa, preferentemente de 30 kDa a 2 kDa, lo más preferentemente de 20 kDa a 5 kDa. En otra realización, el recubrimiento puede comprender una capa policatiónica en contacto con dicha microesfera de núcleo; una o más capas de soporte con cargas opuestas; y una capa externa polianiónica. En una realización más, la capa más interna puede comprender policationes seleccionados de poliaminoácidos básicos, poli-lisina, poli-L-lisina, polietilenimina, quitosano, quitina desacetilada y combinaciones de los mismos. Las realizaciones preferidas son microcápsulas que tienen una primera capa policatiónica alrededor de dicha microesfera de Acm-alginato gelificada, seguida de una o más capas dispuestas de manera alterna de macroiones con cargas opuestas; y una capa polianiónica externa para un potencial superficial negativo de modo que las microcápsulas no se adhieran entre sí.

Dicha microesfera hidrocoloide puede comprender alginato, alginato de sodio, polisacáridos, goma de polisacárido, carboximetilcelulosa, xantano, guar y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, dicha microesfera de núcleo o compartimento de núcleo puede contener sales tampón, preferentemente un tampón de unión isotónico, así como moléculas receptoras o anticuerpos dispersos o disueltos, p. ej. uniendo específicamente moléculas de PTH oxidada, así como sales multivalentes. El tampón isotónico puede ser necesario para evitar efectos osmóticos no deseados cuando las esferas recubiertas de membrana (microcápsulas) se añaden a muestras de plasma o suero isotónico. Como se ha mencionado, dichas moléculas receptoras pueden ser anticuerpos que reconocen un epítipo de PTH oxidada. Se contempla utilizar anticuerpos convencionales o de tamaño completo, o cuando se utilizan receptores de anticuerpos no convencionales, tener éstos acoplados o acoplados a un portador de manera que queden atrapados en el compartimento de núcleo. Los fragmentos de anticuerpos no convencionales se pueden obtener químicamente (fragmentos Fab, Fab', (Fab')₂ y Fv) o mediante ingeniería genética o como fragmentos variables de cadena única (scFv, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, Bis-scFv, minicuerpo, Fab2, Fab3).

Otro aspecto proporciona un método para preparar microcápsulas que comprende las etapas: - a) preparar una solución de alginato en tampón con moléculas receptoras, preferentemente anticuerpos monoclonales específicos para PTH oxidada; b) producir gotas de tamaño homogéneo de dicha mezcla de solución de alginato de sodio y moléculas receptoras; c) poner en contacto dichas gotas con una solución de cationes multivalentes, por ejemplo, Ca²⁺ o Ba²⁺ divalentes para obtener gelificación de dichas gotas de alginato; y d) recubrir dichas gotas de alginato gelificadas de manera alterna con capas de macroiones con cargas opuestas, p. ej. polietilenimina y poliácido. Las membranas capa por capa pueden consistir en una secuencia de fases alternas ricas en macroiones catiónicas y aniónicas, habiéndose aplicado las fases alternas mediante adsorción electrostática capa por capa. La permeabilidad de estas dobles capas depende de los macroiones utilizados, la coacervación y la liofilización final preferida mediante la cual los poros pueden reintroducirse en dicha doble membrana. La estructura multibipolar de las membranas de doble capa ricas en macroiones favorece la exclusión de moléculas proteicas más grandes. Se investigaron diversos efectos sobre la tasa de permeación y la selectividad, pero numerosos factores influyen en el tamaño de poro y la permeabilidad. La adición de macroiones hinchables durante la deposición de la membrana generalmente conduce a un aumento de la permeabilidad y del tamaño de poro, mientras que el uso de cationes ramificados con una alta densidad de carga tuvo el efecto contrario. El uso de macroiones con alta densidad de carga generalmente mejora la separación. Se obtuvieron muy buenos resultados con membranas dobles que comprenden polialilamina (PAH) o polietilenimina como macroión

catiónico.

En una realización preferida del método, se inyecta una solución de alginato y receptor en tampón de unión en una boquilla a través de un pequeño orificio, estando el orificio rodeado por un flujo concéntrico de aire o gas, preferentemente nitrógeno o argón, para que gotas homogéneas se abstraigan del orificio, se arranquen y soplen en un baño con un ion multivalente. El tamaño de la gota puede volverse muy homogéneo mediante la cantidad y la intensidad (velocidad) del flujo de gas concéntrico. Para un tamaño de gota homogéneo es suficiente controlar la corriente de gas inyectada y el flujo de la mezcla de alginato a través del orificio, lo cual es fácil de hacer. Dicho de otro modo, el volumen de las microesferas de núcleo se puede controlar con mayor precisión que cualquier etapa de pipeteo, que sufre efectos superficiales y, por tanto, las cantidades añadidas a la muestra se pueden controlar simplemente contando el número de microcápsulas añadidas. Los principios del dispositivo para preparar gotas homogéneas se muestran en las figuras 1A y B.

A continuación, las microesferas con los anticuerpos se lavan, se dotan de una primera capa catiónica y después de manera alterna de capas de macroiones con cargas opuestas, preferentemente polímeros ramificados macroiónicos con alta densidad de carga superficial. La capa externa más exterior será un polímero aniónico que tendrá un potencial superficial negativo. Las microesferas recubiertas se liofilizan preferentemente para ajustar y madurar la doble membrana así como para un tamaño de poro y una permeabilidad determinados.

La presente divulgación proporciona además una eliminación ventajosa de los componentes que interfieren de una muestra. A diferencia de los métodos que utilizan anticuerpos inmovilizados covalentemente, el hidrocoloide acuoso contiene dichos receptores o anticuerpos en algún tipo de estado accesible o en dispersión y la reacción inmunitaria puede tener lugar en condiciones definidas. Por lo tanto, la microcápsula ofrece una unión inespecífica reducida en comparación con otros materiales de soporte tales como perlas de sefarsa. Con la microcápsula divulgada sólo las moléculas de una fracción de tamaño definido pueden penetrar en la microcápsula e interactuar con los anticuerpos. Por lo tanto, la unión inespecífica se reduce considerablemente. La producción de microcápsulas de alginato que contienen anticuerpos es económica y puede realizarse en condiciones suaves no desnaturalizantes con poca pérdida de material.

Habitualmente, la microencapsulación se refiere a un proceso para encerrar partículas de sólidos o gotas en una cubierta. Comúnmente, las microcápsulas se utilizan para la liberación de sustancias de interés o para el aislamiento de compuestos en un entorno determinado. El documento US 4.352.883 divulga una encapsulación de células que están en suspensión en un medio acuoso. Sus gotas se gelifican poniéndolas en contacto con una solución de cationes multivalentes. Luego se forma una capa superficial insoluble en agua mediante reticulación para producir una membrana alrededor del núcleo. También se describe una licuación mediante eliminación de dichos cationes multivalentes. Sin embargo, las microcápsulas convencionales están diseñadas para una encapsulación de células vivas, implante *in vivo* y/o liberación de moléculas clínicamente relevantes.

La microencapsulación de anticuerpos en una membrana de nailon semipermeable para un radioinmunoensayo de digoxina en suero ha sido descrita por Halpern y Bordens "Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay—I. Determination of digoxin", Clin. Chem. 25/6, 860-862 (1979). La inmovilización de enzimas en microcápsulas de alginato-quitosano se divulga en Taqieddin y Amiji "Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules", Biomaterials, mayo de 2004;25(10):1937-45. Por otra parte, Chen et al., "Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies" J R Soc Interface 2013 Aug 21;10(88):20130566 describen microperlas de alginato recubiertas con anticuerpos contra proteínas bacterianas. Ninguno de estos enfoques convencionales es adecuado para un tratamiento preanalítico de muestras de suero o plasma y ninguno de los documentos de la técnica anterior sugiere la combinación de un tamiz molecular con una reacción inmunitaria específica.

Hay más informes que sugieren que el alginato puede estar asociado con una inhibición de la peroxidación lipídica y estimulación *in vivo* de los mecanismos de actividad antioxidante (Khotimchenko et al, "Healing and Preventive Effects of Calcium Alginate on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats" Mar. Drugs 2004, 2, 108-122). Sin embargo, no se ha informado sobre la actividad antioxidante del alginato en muestras de suero o plasma ni se ha observado ninguna actividad antioxidante en relación con los péptidos de PTH oxidada *in vitro*. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, el polímero de alginato en las microcápsulas puede inhibir los mecanismos oxidativos después de la recogida de la muestra. Mecanismos oxidativos en curso *in vitro* reducirían falsamente la cantidad de PTH biológicamente activa en la muestra. El resultado sería una distorsión de la correlación entre el contenido de oxPTH en la muestra y la concentración real de oxPTH en el paciente. Por lo tanto, el alginato puede tener efectos particularmente beneficiosos cuando se trata de medir la PTH no oxidada en una muestra clínica. Esto puede ser necesario porque los metales de transición como Fe, que es abundante en la muestra de plasma o suero, puede catalizar la oxidación de lípidos y proteínas. La actividad antioxidante del alginato puede atribuirse a sus capacidades de quelación de metales, de eliminación de radicales libres y de reducción de iones férricos. Por lo tanto, el uso de alginato en el tratamiento preanalítico de muestras de plasma o suero puede ser ventajoso para prevenir la oxidación *in vitro* de PTH. Por lo tanto, se contempla tener microcápsulas de Acm-alginato liofilizadas ya presentes en el tubo de extracción de sangre. El uso de microcápsulas de Acm-alginato combinaría el pretratamiento de la muestra con la prevención de una oxidación *in vitro* de péptidos de PTH, aumentando así la confiabilidad y precisión de las mediciones de PTH.

De acuerdo con la invención, el tamiz molecular se obtiene adsorbiendo macroiones de manera alterna policationicos y polianiónicos sobre una esfera hidrocoloide, p. ej. una esfera de alginato gelificada. Operativamente, este método implica exposiciones consecutivas de esferas iniciales a policationes y polianiones líquidos, con etapas de enjuague intermedias para eliminar el polímero no adsorbido después de cada deposición; véase la **Figura 2**. Los polianiones típicos empleados para la deposición de estas capas incluyen formas ionizadas del ácido poliacrílico (PAA), poli(ácido estireno sulfónico) (PSS) y poli(ácido vinil sulfónico), mientras que como policación una polietilenimina ramificada de alto peso molecular dio buenos resultados. La adsorción capa por capa tiene una serie de ventajas. En primer lugar, esta técnica ofrece control sobre el espesor a escala nanométrica porque una sola etapa de adsorción puede depositar tan solo unos pocos angstroms (Å) de polímero. En segundo lugar, la adsorción conformal se produce en sustratos con una amplia gama de geometrías. Finalmente, la gama de materiales iónicos adecuados para la adsorción y la capacidad de depositar especies en un orden definido permite una amplia variedad de ajustes funcionales. Sin embargo, las etapas deben cerrarse de forma controlada ya que las fases poliónicas pueden entrelazarse en varias capas. Las reacciones posteriores a la deposición, como la reticulación y la coacervación, así como la liofilización, pueden proporcionar modos adicionales de modificar las propiedades del tamiz de las multicapas circundantes.

La característica clave en la deposición de multicapas macroiónicas es la sobrecompensación de carga. La capa catiónica inicial adsorbida sobre el hidrocoloide mediante interacciones electrostáticas y de Van-der Waals crea una superficie cargada. La adsorción de capas posteriores sobrecompensa la carga en la superficie para invertir la carga del sustrato y permitir la adsorción de la siguiente capa. Dependiendo del macroión, puede ser necesario incluir una etapa de emulsionante o una etapa de lavado para ajustar la carga superficial. En muchos casos, el espesor de las películas macroiónicas multicapa aumenta linealmente con el número de capas adsorbidas. Esto sugiere que el grado de sobrecompensación de carga no varía mucho con el número de capas adsorbidas, por lo que la cantidad de fase macroiónica depositada en cada etapa es aproximadamente constante. Sin embargo, para algunos sistemas, el espesor de película aumenta exponencialmente con el número de capas. Este puede ser el caso cuando uno de los macroiones se difunde "hacia" las otras capas durante la deposición. Tras la adición del polielectrolito con carga opuesta, los macroiones previamente adsorbidos pueden difundirse entonces "hacia fuera" para formar un complejo polianión-policación muy espeso en la superficie. En consecuencia, es esencial controlar con precisión la deposición capa por capa para obtener las propiedades de tamiz molecular deseadas después del endurecimiento y la liofilización.

Además del policación y polianión seleccionados para la deposición, parámetros tales como concentración, pH, tiempo de adsorción y temperatura influyen en la cantidad de macroión depositado. En ausencia de sal añadida, los macroiones están muy extendidos para maximizar la distancia entre las unidades de repetición cargadas del polímero. En estas condiciones, las capas adsorbidas son delgadas y sobrecompensan la carga superficial sólo ligeramente. Puede ser favorable depositar los macroiones con alta densidad de carga a partir de soluciones que contengan hasta 2 M de sal, ya que esto aumenta el espesor de las capas.

Se encuentra disponible una amplia gama de variaciones estructurales para deposiciones capa por capa. Las películas de quitosano/ácido hialurónico pueden, por ejemplo, hincharse y se sabe que son permeables a moléculas grandes, mientras que los recubrimientos de polialilamina/ácido poliacrílico pueden ser impermeables incluso a la glucosa. En general, las películas capa por capa preparadas a partir de macroiones con una alta densidad de carga tienen un alto grado de reticulación iónica que es necesaria para una menor permeabilidad y una alta selectividad molecular. Esto último sólo funciona cuando las microcápsulas no se han endurecido por liofilización. La deposición descrita es conveniente y versátil, y la aplicación y síntesis pueden automatizarse fácilmente ya que las microesferas tratadas pueden recuperarse mediante filtración.

El método de la divulgación proporciona microcápsulas que comprenden una esfera de alginato gelificada rodeada por un tipo de membrana capa por capa con poros de tamaño uniforme definido. La membrana capa por capa se puede endurecer aún más de modo que se pueda permitir que el núcleo de alginato de las microcápsulas se licue nuevamente, p. ej. cuando se encuentra en una muestra de suero o plasma tratada con EDTA. Dicho de otro modo, los receptores o anticuerpos estarán entonces libres en solución dentro del compartimento de núcleo, pero sólo las moléculas por debajo de un tamaño y peso molecular (PM) definidos pueden atravesar la membrana semipermeable endurecida alrededor del compartimento de núcleo.

La presente divulgación se refiere a una microcápsula que tiene una esfera de núcleo que comprende un hidrocoloide gelificado polianiónico. Los polianiones adecuados pueden seleccionarse de alginato, alginato de sodio, polisacáridos, goma de polisacárido, carboximetilcelulosa, xantano, guar y combinaciones de los mismos. La esfera central puede comprender moléculas receptoras, en particular anticuerpos específicos para unirse a la hormona paratiroidea oxidada (oxPTH). Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, ajustar el pH del núcleo de alginato cerca del punto isoeléctrico de la inmunoglobulina o receptor, esto puede conducir a una adsorción reducida sobre el polímero polianiónico. Adicionalmente, aumentar la fuerza iónica de la solución, por ejemplo a 100-150 mM, puede reducir aún más la adsorción. Por lo tanto, las condiciones pueden estar dirigidas a mantener una mayor población de inmunoglobulinas en solución, facilitando así la interacción inmunológica entre los anticuerpos y el antígeno diana, p. ej. péptidos de PTH oxidada.

El punto isoeléctrico de la PTH está entre 7,3 y 8. Por lo tanto, la PTH puede tener una carga neutra o ligeramente

positiva a pH 7. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, las moléculas de oxPTH parecen penetrar en la esfera de núcleo donde ocurren interacciones electrostáticas con grupos aniónicos. Por lo tanto, los péptidos de oxPTH pueden tender a concentrarse en el núcleo de alginato, facilitando así la interacción con los anticuerpos. Sin embargo, no existe competencia de unión ya que la reacción del anticuerpo probablemente sea más fuerte que cualquier interacción electrostática.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor las realizaciones de la presente divulgación, pero no pretenden ser limitativos. Si bien son típicos de los que podrían usarse, alternativamente pueden usarse otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Ejemplos

EJEMPLO 1 Tratamiento preanalítico de muestras que contienen oxPTH (prueba de principios)

Se sometió a prueba un tratamiento preanalítico en (i) un tampón de muestra enriquecido con PTH(1-84) humana sintética que se sabe que contiene moléculas de PTH oxidada, (ii) plasma de un paciente urémico que se sospecha que sufre estrés oxidativo (OX), y (iii) plasma de un sujeto sano que probablemente no sufre estrés oxidativo (NOX), y (iv) tampón de muestra puro (Tris-caseína, pH 7) como control. Con fines comparativos, las muestras se pusieron en contacto con perlas de sefrosa con anticuerpos inmovilizados contra péptidos oxPTH (Acm-sefrosa). En el experimento comparativo se utilizó el mismo anticuerpo monoclonal de rata (ID3B). El anticuerpo era un anticuerpo monoclonal de rata patentado (Immundiagnostik AG, Bensheim: A1112) contra péptidos oxidados de hPTH (oxPTH).

Las concentraciones de PTH (pg de PTH/ml de muestra) se midieron antes (+) y después del pretratamiento (-) utilizando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia estándar (inmunoensayo de PTH Elecsys™ 2010 de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El ensayo Elecsys™ emplea un principio de prueba tipo sándwich en el que un anticuerpo monoclonal biotinilado reacciona con el fragmento N-terminal (1-37) y un anticuerpo monoclonal marcado con un complejo de rutenio reacciona con el fragmento C terminal (38-84). El valor de PTH determinado después del pretratamiento, medido mediante dicho inmunoensayo de electroquimioluminiscencia estándar, se refiere en el presente documento a n-oxPTH.

Se añadieron 5, 10 o 50 microcápsulas (2 µl de volumen) con anticuerpo anti-oxPTH a cada muestra (x 5, x 10, x 50 microcápsulas). Las microcápsulas se prepararon como se describe en el ejemplo siguiente. Como control, a cada muestra se le añadieron 50 microcápsulas únicamente con alginato. El tamaño de corte de la membrana semipermeable o tamiz molecular alrededor de dichas microcápsulas no se determinó, pero probablemente sea alrededor de 100 kDa, ya que los anticuerpos confinados en el núcleo de alginato no pudieron pasar, dígame dejar las microcápsulas.

En síntesis, 500 µl de muestra i) 1,5 µg de hPTH(1-84) sintética de Bachem AG, Suiza (sal de trifluoroacetato de pTH(1-84), n.º de catálogo 1065881) en tampón Tris/NaCl 10 mM, pH 7,4, ii) plasma de un individuo sano y iii) plasma de un paciente urémico se incubaron con 5, 10 microcápsulas de alginato con anticuerpos anti-oxPTH como se describe o sin anticuerpo como control con agitación suave a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, las muestras líquidas se separaron de las microesferas de alginato mediante filtración. Se recogió el filtrado y se determinó su contenido de PTH.

A modo de comparación, los anticuerpos anti-oxPTH se inmovilizaron en Sefarosa 4B activada con CNBr (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) de acuerdo con el fabricante (2 mg de anticuerpo anti-oxPTH/ml de suspensión de sefrosa). Se colocaron 50 µl de suspensión de Acm-sefrosa en un tubo de ensayo (MobiSpinColumn, MoBiTec, Göttingen, Alemania) y se equilibraron en tampón PBS, pH 7,4. Se aplicaron 500 µl de solución de muestra o plasma a la columna y, después de mezclar, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se centrifugó suavemente y el sobrenadante se recogió para el análisis de PTH. Los resultados se muestran en la **Tabla 1 y Figuras 3-4**.

Tabla 1

Tratamiento preanalítico	PTH [pg/ml]			
	PTH sintética	Plasma (OX)	Plasma (NOX)	Tampón
-	1439,8	144,7	96,7	3,7
Acm-sefrosa	21,2	22,9	23,1	1,5
x 5 Acm-alginato	93,2	88,7	90,3	-
x 10 Acm-alginato	44,8	78,6	88,7	-
x 50 Acm-alginato	27,6	25,5	10,4	3,4
x 50 alginato	1430,8	153,5	102,8	2,7

Los resultados confirman que el tratamiento preanalítico con microcápsulas de Acm descargó eficazmente las muestras de PTH oxidada inactiva. Por otra parte, las perlas de Acm-sefrosa dieron como resultado mediciones de

concentración de PTH similares antes y después del pretratamiento e independientemente de la muestra analizada. Esto se debió a la unión inespecífica sobre las perlas de Acm-sefarosa. Por lo tanto, las perlas de anticuerpo-sefarosa no resultaron adecuadas para un tratamiento preanalítico de una sola etapa. No se observó unión inespecífica con microcápsulas donde la reacción inmunitaria estuvo precedida por una separación selectiva a través de un tamiz molecular o una membrana semipermeable.

Los resultados también muestran que el efecto del pretratamiento con microcápsulas de Acm dependía del número de microcápsulas añadidas. En los ejemplos dados, cinco microcápsulas absorbieron aproximadamente 1,3 µg de PTH sintética, lo que confirmó que la mayoría de los péptidos de PTH en dicha preparación de PTH sintética se habían oxidado durante la síntesis. Sólo se observaron efectos inespecíficos o unión por microcápsulas de alginato con un exceso de 50 microcápsulas de Acm o más. Las microesferas de alginato sin anticuerpos se comportaron de forma neutra y no mostraron efectos nocivos.

Tabla 2 muestra las concentraciones relativas de PTH no oxidada (n-oxPTH) en las muestras analizadas después del pretratamiento con 5 y 10 microcápsulas. Las concentraciones de PTH se midieron utilizando el inmunoensayo de PTH Elecsys™ de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, en un Roche modular E 170.

Tratamiento preanalítico	n-oxPTH [%]		
	PTH sintética	Plasma (OX)	Plasma (NOX)
× 5 Acm-alginato	6,5	61,3	93,4
× 10 Acm-alginato	3,1	54,3	91,7

Los resultados muestran que las muestras de plasma de individuos sanos contenían entre un 6,6 - 8,3 % de moléculas de PTH oxidada. La proporción de PTH oxidada en el plasma de un paciente urémico fue del 38,7 - 45,7 % y seis veces mayor.

La **figura 3** muestra en un diagrama los resultados con muestras de plasma (Plasma NOX) de un individuo sano. El pretratamiento con 5 o 10 microcápsulas de Acm-alginato cambió el contenido total de PTH antes y después del pretratamiento sólo marginalmente. Los resultados son consistentes con la observación de que los individuos sanos no sufren estrés oxidativo y que la PTH circulante no se oxida *in vivo*.

La **figura 4** muestra los resultados del mismo experimento pero obtenidos con una muestra de plasma (Plasma OX) de un paciente urémico que padecía estrés oxidativo e inflamaciones. Un tratamiento previo del plasma como se describe redujo el contenido efectivo de PTH aproximadamente entre un 30 y un 50 por ciento. Mientras que el nivel de PTH (sin pretratamiento) en plasma de dicho paciente urémico estaba elevado en comparación con el de un sujeto sano, ambos plasmas contenían niveles similares de PTH biológicamente eficaz (PTH no oxidada).

La **figura 5** muestra en un diagrama los resultados obtenidos con una muestra enriquecida con 1,5 µg de hPTH(1-84) sintética de Bachem (sal trifluoroacetato de pPTH(1-84), n.º de catálogo 1065881) en tampón Tris/NaCl 10 mM. La muestra se pretrató con perlas de Acm-sefarosa y microesferas de alginato recubiertas de membrana como se describe. Los resultados muestran que la PTH sintética consistía en una gran proporción de PTH oxidada no funcional y que el pretratamiento con microcápsulas fue eficaz para eliminar los péptidos de PTH oxidada no funcional de dicha muestra.

EJEMPLO 2 Producción de anticuerpos monoclonales (Acm) contra péptidos de PTH oxidada

Se obtuvo un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 1 a 38 de PTH humana (hPTH(1-38) de Immundiagnostik AG (Bensheim, Alemania). Se disolvieron 200 mg de hPTH(1-38) en 400 ml de ácido acético 0,1 M (concentración final 0,5 mg/ml), se mezcló 1:1 con peróxido de hidrógeno al 30 % y se incubó durante 45 min a 37 °C. Después, la mezcla se enfrió sobre hielo, se dividió en alícuotas y se liofilizó para obtener péptidos PTH1-38 oxidados (oxPTH1-38).

Se generaron anticuerpos monoclonales (Acm) en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron mediante inyección intraperitoneal con 200 µg de oxPTH1-38 conjugado con tiroglobulina como se describió anteriormente. Tanto para la inmunización primaria como para la secundaria se utilizó Freund incompleto (sólo aceite mineral). Se sometió a prueba la unión de los antisueros a biotina-hPTH(1-38) no oxidada. Para detectar anticuerpos que reconozcan específicamente los péptidos PTH1-38 oxidados, se utilizó la técnica de separación de doble anticuerpo. Como rastreador, se marcó biotina-oxPTH(1-38aa) se marcó con ¹²⁵I-estreptavidina. Después de la fusión celular y la selección HAT, se seleccionaron hibridomas seleccionados para determinar su unión a péptidos de PTH(1-84) humana oxidada pero no a PTH(1-84) humana. El anticuerpo monoclonal patentado anti-oxPTH (Immundiagnostik AG, Bensheim - ID3B-180621) reconoció un epítipo conformacional generalmente común a los péptidos de hPTH oxidada.

La especificidad del anticuerpo monoclonal (ACM) generado contra oxPTH1-38 se caracterizó además como se describe por Hoher B et al., Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation parathyroid hormone assay? PLoS ONE 2012 (7), e40242. En síntesis, el anticuerpo se inmovilizó

en Sefarosa 4B activada con CNBr (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) y se introdujeron alícuotas en una columna (MobiSpinColumn, MoBiTec, Göttingen, Alemania), se equilibraron con tampón PBS, pH 7,4. Luego se disolvieron 2,5 µg de hPTH1-84 oxidada liofilizada en 300 microlitros de tampón de equilibrio y se aplicaron a la columna. La columna se incubó de un extremo a otro durante una hora a temperatura ambiente, se lavó y luego se eluyó con tampón de elución que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 %. El flujo continuo, las fracciones de lavado (tampón de equilibrio y agua), así como el eluido de la columna, se recogieron por separado, se liofilizaron y se analizaron por nanoLC-ESI-FT-MS que mostró que los péptidos de PTH oxidada se encontraron solo en el eluido pero no en el tampón de lavado.

EJEMPLO 3 Producción de microesferas de Acm-alginato

Se disolvió una solución de alginato de sodio (Inotech AG, Suiza) en agua destilada desionizada al 1 % (p/v) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas para asegurar la disolución completa. La solución de alginato se filtró y se mezclaron 800 µl de solución de alginato al 1 % (p/v) con 200 µl de Acm anti-oxPTH (2 mg/ml de tampón Tris 10 mM). Las gotas se formaron utilizando un sistema de microfluidos (véase las figuras 1 y 2) y se vertieron en un baño de agua de 500 ml que contenía CaCl₂ al 1,5 % (p/v). El tamaño de las gotas se controló mediante el calibre de la aguja y un atomizador de aire. Se dejó que las gotas de alginato-Acm gelificaran y se reticularan en dicho baño gelificante durante 5 minutos; a continuación, se lavaron las microesferas gelificadas resultantes en tampón de glicina. Las gotas y las microesferas de alginato tenían un tamaño de volumen promedio preferido de aproximadamente 2 µl (d = 1,5-1,6 mm).

EJEMPLO 4 Producción de microcápsulas de Acm-alginato/poli-L-lisina

Después de gelificar y reticular en CaCl₂, se recogieron las microesferas polianiónicas lavadas, se trataron nuevamente con agua *destilada* y se colocaron en un baño que contenía 400 ml de poli-L-lisina al 0,05 % (p/v) de 34 kDa (PLL, Sigma, St-Louis, MO, EE.UU.), CaCl₂ 110 mM durante 30 min a temperatura ambiente. El endurecimiento primario fue seguido por un lavado con tampón salino (NaCl al 0,9 % en MOPS 10 mM, Sigma, St-Louis, MO, EE.UU.) y una incubación en 500 ml de alginato de sodio al 0,05 % (p/v) durante 10 min. Las microcápsulas endurecidas se lavaron con una solución que contenía NaCl 150 mM y CaCl₂ 0,5 mM y se equilibró en tampón TBS. Las microesferas sólidas se pudieron licuar nuevamente mediante incubación en citrato de sodio 0,05 M durante 15 min.

Se produjeron microesferas recubiertas de doble membrana (microcápsulas) mediante incubación con una polietilenimina altamente ramificada de la empresa Polyscience GmbH, Heidelberg, Alemania (Mw 2.000.000, solución acuosa al 25 % p/v con alta densidad de carga catiónica, que contiene grupos amina primaria, secundaria y terciaria con pH 8) como capa catiónica durante 5 min a temperatura ambiente en NaCl 150 mM. Las microcápsulas se incubaron durante 10 minutos más en 500 ml de alginato de sodio al 0,05 % (p/v) durante 10 minutos. Posteriormente, las microcápsulas se lavaron dos veces con tampón TBS 1X y se mantuvieron en TBS 1X a 4 °C. Como fase aniónica y electrolito se usó un poliacrilato (n.º de cat Polyscience 18611-250) con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa o 60 kDa durante otros 5 minutos a temperatura ambiente. La solución de lavado intermedia contenía Brij®35 al 1 % (Sigma Aldrich, que es un éter dodecílico de polietilenglicol (Mn -1,198) o SDS al 1 %. Se aplicaron seis deposiciones capa por capa con una capa de alginato en el exterior para proporcionar un potencial superficial negativo. Se sometieron a prueba las siguientes combinaciones de capas.

Tabla 3

Capas	Detergentes	Liofilización
No	SDS	-
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	SDS	-
No	SDS	-
No	SDS	+
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	SDS	+
No	SDS	+
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	SDS	+
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	SDS	-
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	SDS	+
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	Brij35	-
PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG	Brij35	+

EJEMPLO 4 Producción de microcápsulas de Acm-alginato/quitosano

Las microesferas de alginato se prepararon como se describe en el Ejemplo 3 pero se dispersaron en quitosano al 0,75 % (p/v) en una solución de ácido acético 0,1 M durante 5 minutos. Las microcápsulas se colocaron en una solución acuosa de trifosfato de sodio (Na-TPP) al 3,0 % (p/v) y se incubaron en la solución de Na-TPP durante 90 minutos. Las microcápsulas obtenidas se almacenaron en 1 × TBS a 4 °C. Los iones fosfato de Na-TPP se difundieron hacia el núcleo y extrajeron los iones Ca²⁺, dando como resultado un sistema de núcleo líquido. Las microcápsulas de alginato reticuladas con Na-TPP tenían un límite de peso molecular de aproximadamente 17.000 Da (17 kDa).

EJEMPLO 5 Sorción de péptidos de PTH oxidada dentro de microcápsulas de Acm-alginato

Se utilizó como referencia la hormona paratiroidea humana sintética (Bachem, sal trifluoroacetato de pTH(1-84), n.º de catálogo 1065881) porque contiene péptidos de PTH oxidada. Una solución con hPTH sintética (50 µg/ml) en Tris 10 mM, pH 7,4 se preparó y se pretrató con microcápsulas liofilizadas y no tratadas (PEI/PA15/PEI/PA60/PEI/ALG, Brij35) del ejemplo 3. Después del pretratamiento estándar, las proteínas en el sobrenadante y dentro de las microcápsulas se examinaron mediante SDS-PAGE al 4-20 % (no desnaturalizante, SERVAGel® TG Prime®) 4 - 20 %, n.º de cat 43289) y transferencia Western. Los resultados mostraron que las microcápsulas disueltas contenían los péptidos de PTH esperados, así como anticuerpos después del tratamiento previo. Cuando las microcápsulas se liofilizaron, el sobrenadante de las microcápsulas casi no mostró banda de PTH detectable en el intervalo de 9,5 kDa, mientras que en el caso de la microcápsula disuelta era visible una banda clara. Esto muestra que el tratamiento previo tuvo el efecto de que casi todos los péptidos oxPTH se internalizaron en las microcápsulas. Para microcápsulas no liofilizadas, los resultados no fueron tan claros (había más PTH en el sobrenadante), lo que confirmó que la liofilización tenía un efecto sustancial sobre la estabilidad de la membrana circundante y su tamaño de poro.

EJEMPLO 6 Medición de PTH biológicamente eficaz usando un ELISA tipo sándwich que emplea anticuerpos policlonales para regiones distantes en el péptido de PTH de longitud completa

La primera generación de ensayos de PTH (RIA) utilizó solo un anticuerpo dirigido hacia la región media de la secuencia de PTH y detectó PTH1-84 maduro, así como fragmentos del mismo. La forma madura de PTH1-84 (iPTH) se produce fisiológicamente mediante una escisión secuencial de la prepro-PTH inicialmente traducida (115 aminoácidos) a través de pro-PTH (90 aminoácidos). Ni la prepro-PTH ni la pro-PTH son detectables en la circulación. Luego se descubrió que la PTH1-84 madura tiene una vida media corta en la circulación de menos de aproximadamente 5 minutos y se degrada a un fragmento N-terminal PTH1-34 y fragmentos C-terminales PTH 39-84 que normalmente son más estables en la circulación. Sin embargo, la PTH humana ejerce sus efectos mediante la interacción de sus primeros 34 aminoácidos N-terminales con el receptor de PTH. En la sangre, la relación de PTH1-34 N-terminal con respecto a PTH1-84 es establemente baja, excepto en el caso de algunos tumores que excretan PTH1-34 o PTH1-38. El descubrimiento de fragmentos de PTH truncados en el extremo C terminal, particularmente en pacientes con ERFT, y el conocimiento de que la actividad fisiológica de la PTH se localiza dentro de la región N-terminal PTH1-34 estimuló el desarrollo de una segunda generación de ensayos de PTH: los llamados ensayos de hormona paratiroidea intacta (iPTH). Estos son inmunoensayos tipo sándwich de dos sitios y normalmente tienen un anticuerpo de captura en fase sólida dirigido hacia la región C-terminal de la PTH (aminoácidos 26-32 o 39-84) y un anticuerpo de detección dirigido hacia el extremo N terminal (normalmente hacia aminoácidos 12-24). Esta forma de diseño del ensayo aumentó la especificación de los ensayos de PTH porque evitaron la reactividad cruzada con fragmentos de PTH C-terminales. Se siguió desarrollando una tercera generación de ensayos de PTH, en la que el epítipo del anticuerpo de detección se dirigió más hacia los aminoácidos 1-4 del extremo N terminal, pero los fragmentos biológicos inactivos del tipo PTH7-84 parecen muy especulativos ya que no pueden detectarse en muestras fisiológicas. El anticuerpo de captura en fase sólida dirigido hacia la región C-terminal de PTH fue el mismo que para los ensayos de PTH de segunda generación. El rendimiento clínico de los ensayos de PTH de segunda y tercera generación es comparable y actualmente se utilizan ambos. Sin embargo, tanto los ensayos de PTH de segunda como de tercera generación detectan y determinan la PTH1-84 oxidada, que está presente en cantidades fisiológicamente relevantes en la circulación.

En consecuencia, se sometió a prueba la capacidad de microesferas recubiertas de membrana para eliminar y poner en cuarentena cadenas peptídicas de PTH oxidada de una muestra mediante encapsulación. Esto se determinó mediante una medición de iPTH1-84 en el sobrenadante resultante usando un ensayo de PTH de 2ª generación basado en anticuerpos policlonales contra la PTH1-84 humana

(Biomerica, Inc., Irvine, CA - n.º de art. 7022). De manera más precisa, el iPTH-ELISA comprendió dos anticuerpos *policlonales* de cabra purificados mediante cromatografía de afinidad para que sean específicos de regiones distantes de la molécula de PTH humana intacta. El anticuerpo *policlonal* biotinilado se unió a la región media y PTH39-84 C terminal. El otro anticuerpo policlonal se marcó con peroxidasa de rábano picante para su detección y se dirigió contra PTH1-34 N-terminal. Por lo tanto, sólo los péptidos PTH1-84 de longitud completa se unieron a ambos anticuerpos formando el complejo tipo sándwich necesario para la detección. Este ensayo de ELISA de iPTH *policlonal* de 2ª generación puede considerarse, por tanto, representativo de todos los inmunoensayos de 2ª y 3ª generación comercialmente disponibles para PTH "intacta" o "completa" (iPTH o wPTH). Por otra parte, los anticuerpos policlonales se unen preferentemente a la estructura peptídica primaria y son menos sensibles a los efectos de plegamiento y enmascaramiento. Por lo tanto, el ELISA de iPTH policlonal puede determinar cadenas de PTH oxidadas de longitud completa incluso en presencia de un tercer anticuerpo contra la PTH oxidada, si las cadenas peptídicas de PTH oxidada no funcional no se eliminan de la muestra. En CKD, ambas vías de degradación de la PTH en el riñón se deterioran progresivamente. Esto no sólo conduce a una prolongación de $t_{1/2}$ de fragmentos de PTH C-terminal en la circulación y también a una mayor fracción de PTH oxidada inactiva a través del estrés oxidativo y reacciones inflamatorias que producen radicales oxidativos (Couchman L, *et al.*, LC-MS candidate reference methods for the harmonisation of parathyroid hormone (PTH) measurement: A review of recent developments and future considerations (2014) Clin Chem Lab Med. 52(9):1251-63; Cavalier E *et al.*, Considerations in parathyroid hormone testing (2015) Clin

Chem Lab Med. 53(12):1913-9.).

En este experimento, los péptidos de PTH oxidada en la muestra se eliminaron usando columnas de centrifugación con un anticuerpo monoclonal caracterizado contra oxPTH1-38 en sephadex G (Immundiagnostik AG, n.º de art. K1548, Bensheim, Alemania). Las columnas de afinidad anti-oxPTH, equilibradas en PBS a pH 7,4, se abrieron y se centrifugaron hasta sequedad a 3000 g durante 30 segundos. Se añadieron 300 µl de muestra de plasma a la columna y se incubaron mezclando de un extremo a otro durante 1 hora a temperatura ambiente. Las columnas se colocaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaron nuevamente a 3000 g durante 60 segundos para recoger la muestra tratada, normalmente alrededor de 250 µl de volumen. La concentración de iPTH se midió en alícuotas de muestras tratadas (que contenían únicamente PTH no oxidada) y muestras no tratadas (que contenían PTH oxidada y no oxidada). Las mediciones de iPTH en muestras tratadas de pacientes con ERC y controles sanos (n = 135) no mostraron diferencias significativas. El material de afinidad anti-oxPTH tenía una mayor capacidad de unión, mientras que la eliminación de oxPTH mediante microcápsulas recubiertas de membrana dependía del número de esferas añadidas a la muestra y requería más material de anticuerpo.

EJEMPLO 7 Microesferas de Acm-alginato recubiertas con membrana con diversos materiales de carga

Para mejorar la estabilidad física de las esferas de alginato y, por tanto, su manejabilidad, se investigaron diversas cargas como aditivo del 10 por ciento (aprox. 1 g/ml) a la solución de alginato. Se sometieron a prueba los siguientes aditivos: almidón de maíz, caolín, manitol, sacarosa, glicina y polietilenglicol (PEG). Las microesferas o microcápsulas recubiertas de membrana se prepararon como se describe en el ejemplo 4. Además se sometió a prueba si los aditivos en los núcleos de alginato cargados con Acm de las microcápsulas influyen en los valores de n-oxPTH medidos en el flujo continuo o en el sobrenadante de la muestra. Para este fin, se examinaron 20 esferas de cada lote de producción. Manitol, sacarosa y glicina como cargas aportaron poca o ninguna mejora en la estabilidad y las propiedades superficiales de las esferas. La adición de PEG o caolín provocó una aglomeración desventajosa de las esferas. Sin embargo, la estabilidad y la manejabilidad mejoraron cuando se agregó almidón de maíz a los núcleos de alginato en comparación con las esferas sin carga. Los resultados se han resumido en la Tabla 4.

Tabla 4

Carga	Capacidad de separación	Gestión de la manejabilidad	Estabilidad física	Impacto en los valores medidos de n-oxPTH
Almidón de maíz	+	++	+	0
Caolín	-	+	+	-
Manitol	0	0	+	0
Sacarosa	0	-	-	+
Glicina	0	-	-	+
PEG	-	+	+	-
Características: ++: muy mejorado; +: mejorado; 0: sin cambio; -- : empeorado.				

Pruebas adicionales demostraron que la adición de 0,05 g/ml de almidón de maíz al alginato era suficiente para obtener una estabilidad física y una manipulación óptimas de las esferas y no tenía ningún impacto en la adsorción de las moléculas de PTH oxidadas dentro de las microesferas ni en la cantidad medida de moléculas de n-oxPTH en el sobrenadante de la muestra o en el flujo continuo. Las microesferas estabilizadas recubiertas de membrana (microcápsulas) pueden usarse como material de adsorción en columnas de centrifugación (3000 g durante 60 segundos) o agregarse como perlas directamente al volumen de reacción. El cuadrado del coeficiente de correlación R^2 entre los valores de n-oxPTH obtenidos después de un pretratamiento analítico con una columna de afinidad convencional (150 µl de muestra de plasma con heparina con 60 µl de suspensión de material de afinidad a n-oxPTH) y los valores de n-oxPTH obtenidos después de la inmersión con esferas de alginato/0,05 g de almidón de maíz recubiertas de membrana (150 µl de muestra de plasma con heparina y 24 esferas) fueron $R^2 = 0,8433$ (n= 96).

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener un material sorbente para el pretratamiento inmunológico de un líquido biológico, en donde el material sorbente está **caracterizado por** microcápsulas, en donde el método comprende las etapas de:

- (i) solubilizar anticuerpos en un tampón fisiológico que contiene del 0,3 al 2,5 por ciento en peso de ácido algínico y añadir dicha solución en un tampón acuoso que contiene iones de una sal bivalente para precipitar núcleos de alginato que tienen diámetros de 0,5 a 5,0 milímetros y volúmenes en el intervalo de 0,1 a 50 microlitros;
- (ii) sumergir de manera alterna dichos núcleos de alginato en soluciones tampón líquidas que contienen de manera alterna un macropolímero policatiónico o un macropolímero polianiónico para obtener una deposición electrostática capa por capa y fases líquido-líquido ricas en macroiones que tienen núcleos de alginato incrustados;
- (iii) endurecer dichas fases líquido-líquido ricas en macroiones mediante coacervación compleja a temperatura ambiente durante un período de tiempo para obtener microcápsulas que consisten en núcleos de alginato precipitados, cada uno de ellos incrustado en una membrana multicapa de macroiones;
- (iv) liofilizar dichas microcápsulas para obtener membranas multicapa de macroiones que sean permeables a proteínas de un peso molecular no superior a aproximadamente 100.000 daltons;
- (v) acondicionar dichas microcápsulas semipermeables y, si es necesario, clasificar, para obtener microcápsulas que puedan agregarse a fluidos biológicos para el tratamiento inmunológico y la eliminación de componentes peptídicos menores de 100.000 daltons.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha una o más capas policatiónicas comprenden un polication seleccionado del grupo polietilenimina ramificada, polialilamina o polivinilamina que tienen pesos moleculares promedio Mn de aproximadamente 100.000 a 2.000.000 daltons.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dichas capas polianiónicas comprenden un polianión seleccionado del grupo pectina que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 20.000 a 200.000 daltons, ácido poliacrílico que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 10.000 a 350.000 daltons, carboximetilcelulosa que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 80.000 a 1.000.000 daltons.

4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la membrana multicapa comprende una o más capas intermedias y/o una capa externa que comprende un poliglicano seleccionado del grupo que comprende poliaminosacárido, quitosano, ácido algínico, glicosaminoglicano, ácido hialurónico.

5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los núcleos de alginato comprenden además del 1 al 10 % (p/v) de un material de carga seleccionado de hidratos de carbono poliméricos, polisacáridos, amilopectina, pectina, poliglucano, polixilano, almidón de trigo, maíz o almidón de maíz, almidón de patata, almidón de arroz, mandioca.

6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichos anticuerpos se unen específicamente a péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada que tienen un peso molecular de 9500 daltons o menos.

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dichos anticuerpos se unen específicamente a un epítipo ubicado en la PTH humana oxidada entre los aminoácidos 3 a 34.

8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dichos núcleos de alginato comprenden aproximadamente el 1 por ciento en peso (p/v) de ácido algínico en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 y anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada.

9. Microcápsulas para el pretratamiento inmunológico de un líquido biológico que comprenden: -

- un núcleo de alginato sorbente compuesto de anticuerpos y del 0,3 al 2,5 % (p/v) de ácido algínico en un tampón acuoso de unión a anticuerpos, núcleo que tiene un volumen de 0,1 a 50 microlitros y un diámetro de 0,5 a 5,0 mm y está rodeado por una membrana multicapa permeable a proteínas no mayores de 100 kDa hecha de capas alternas de macropolímeros líquidos con cargas opuestas en un entorno acuoso, en donde los macropolímeros policatiónicos elegidos se seleccionan del grupo que comprende polietilenimina lineal o ramificada, polialilamina o polivinilamina que tienen un peso molecular promedio Mn de aproximadamente 100.000 a 2.000.000 daltons, y
- los polímeros polianiónicos se seleccionan del grupo que comprende pectina que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 20.000 a 200.000 daltons, ácido poliacrílico que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 10.000 a 350.000 daltons, carboximetilcelulosa que tiene un peso molecular Mn de aproximadamente 80.000 a 1.000.000 daltons.

10. Microcápsulas de acuerdo con la reivindicación 9, en donde las capas dobles dispuestas de manera alterna de polímeros policatiónicos y polianiónicos están separadas o recubiertas con una capa intermedia y/o una capa externa

que comprende un poliglicano seleccionado del grupo que comprende poliaminosacárido, quitosano, alginato, glicosaminoglicano, ácido hialurónico.

5 11. Microcápsulas de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde dicha una o más capas policatiónicas comprenden polietilenimina ramificada que tiene un peso molecular promedio Mn de aproximadamente 500.000 a 2.000.000 daltons.

10 12. Microcápsulas de acuerdo con cualquier reivindicación 9 a 11, en donde el núcleo sorbente contiene anticuerpos que se unen específicamente a péptidos de la hormona paratiroidea (PTH) humana oxidada.

13. Uso de microcápsulas de acuerdo con cualquier reivindicación anterior 9 a 12 para el pretratamiento de plasma o suero en un sistema de prueba automatizado para la eliminación de componentes que interfieren con una medición cuantitativa de un analito.

15 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el analito es hormona paratiroidea (PTH) humana no oxidada.

Fig. 2

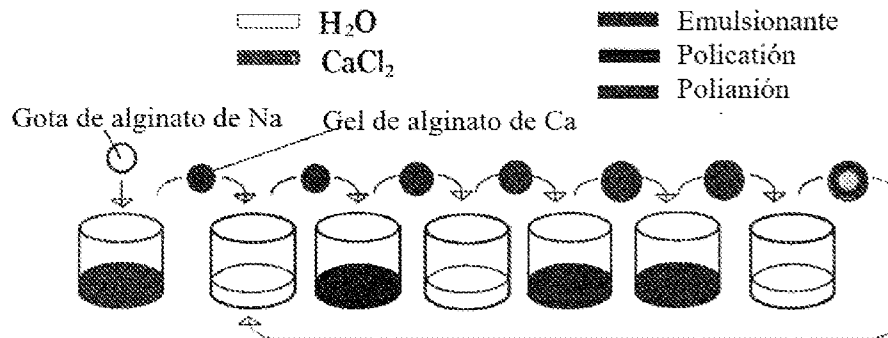


Fig. 3

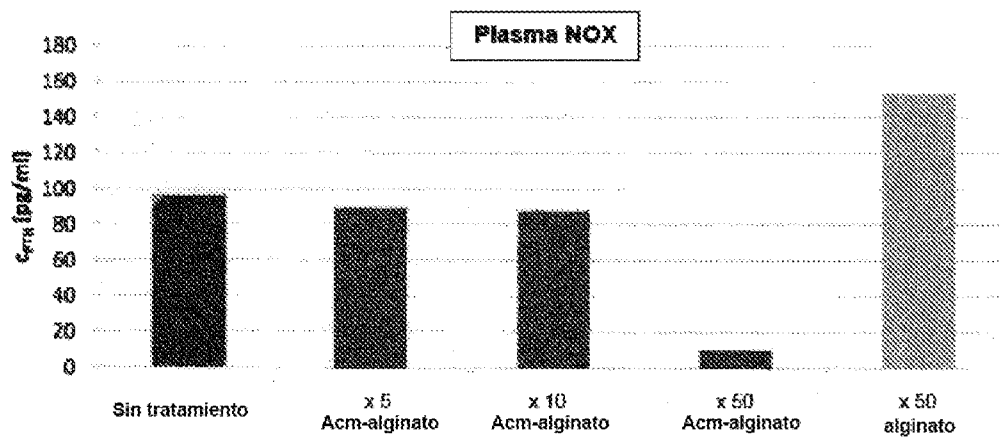


Fig. 4

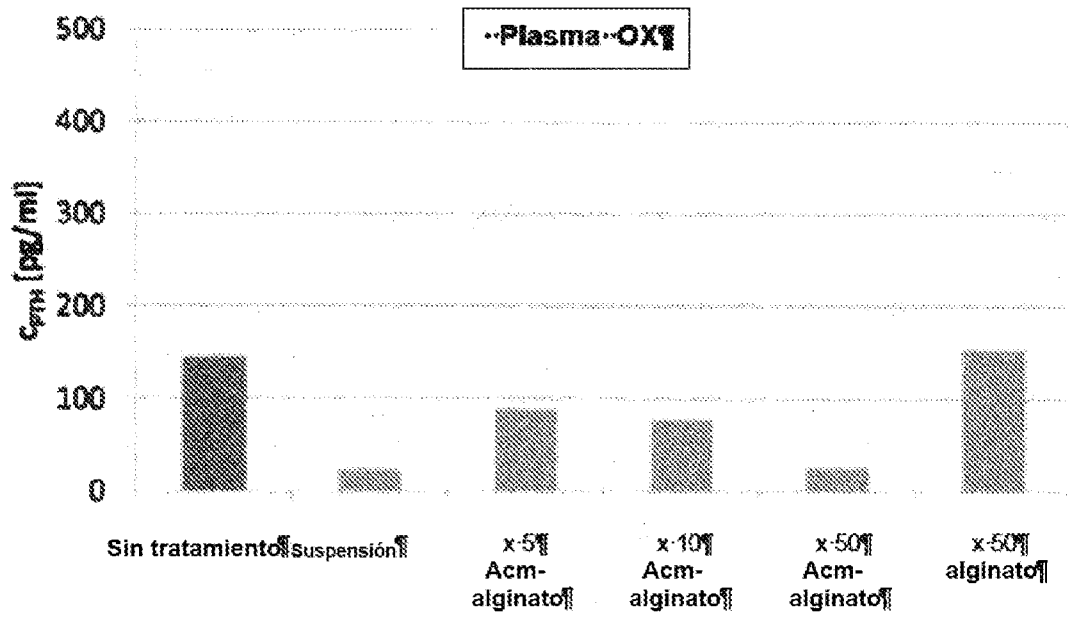
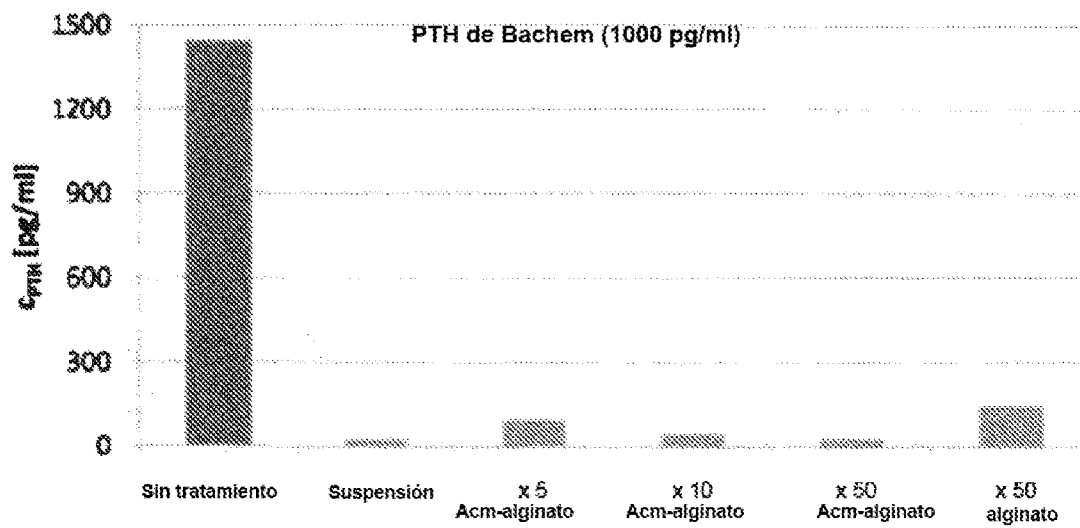


Fig. 5



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos citados en la descripción

- WO 2014135701 A [0003] [0005]
- EP 2775306 A [0003]
- EP 2817337 A [0003]
- EP 2631247 A [0003]
- EP 1240527 A [0003] [0005]
- WO 2013124462 A [0005]
- US 4257884 A [0006]
- WO 2008045806 A2 [0006]
- US 4352883 A [0037]

Literatura no patente citada en la descripción

- HANON et al. Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. *Clin Chem Lab Med*, 2013, vol. 51 (10), 1925-1941 [0003]
- HOCHER et al. Measuring Parathyroid Hormone (PTH) in Patients with Oxidative Stress - Do We Need a Fourth Generation Parathyroid Hormone Assay. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7 (7), e40242 [0004]
- MELAMED ML. et al. Third-generation parathyroid hormone assays and all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, vol. 23 (5), 1650-8 [0025]
- FLOEGE J. ARC investigators. Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, vol. 26, 1948-1955 [0025]
- TORRES PA et al. Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, 2012, vol. 82, 19-25 [0025]
- SOUBERBIELLE JC et al. in Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney Int.*, 2010, vol. 77, 93-100 [0025]
- HALPERN ; BORDENS. Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay—I. Determination of digoxin. *Clin. Chem.*, 1979, vol. 25 (6), 860-862 [0038]
- TAQIEDDIN ; AMJI. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. *Biomatena*, May 2004, vol. 25 (10), 1937-45 [0038]
- CHEN et al. Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies. *J R Soc Interface*, 21 August 2013, vol. 10 (38), 20130566 [0038]
- KHOTIMCHENKO et al. Healing and Preventive Effects of Calcium Alginate on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats. *Mar. Drugs*, 2004, vol. 2, 108-122 [0039]
- HOCHER B et al. Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation parathyroid hormone assay. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, e40242 [0062]
- COUCHMAN L et al. LC-MS candidate reference methods for the harmonisation of parathyroid hormone (PTH) measurement: A review of recent developments and future considerations. *Clin Chem Lab Med.*, 2014, vol. 52 (9), 1251-63 [0070]
- CAVALIER E et al. Considerations in parathyroid hormone testing. *Clin Chem Lab Med.*, 2015, vol. 53 (12), 1913-9 [0070]