



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 874**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**G01N 33/576** (2006.01)  
**G01N 33/545** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99931132 .7**  
86 Fecha de presentación : **22.06.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1090298**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2001**

54 Título: **Mejora de ensayos de fijación mediante análisis multiepitópico.**

30 Prioridad: **22.06.1998 DE 198 27 714**  
**26.08.1998 DE 198 38 802**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**  
**Sandhofer Strasse 112-132**  
**68305 Mannheim, DE**

72 Inventor/es: **Karl, Johann y**  
**Hornauer, Hans**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 268 874 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

Mejora de ensayos de fijación mediante análisis multiepitópico.

5 La presente invención se refiere a un método para detectar uno o varios analitos en una muestra, identificando el analito con diversos reactivos capaces de fijarse a los analitos. Además la presente invención comprende una fase sólida para detectar un analito, constituida por un soporte no poroso y por áreas de ensayo separadas espacialmente, de tal modo que cada área de ensayo contiene reactivos diferentes.

10 Los métodos de detección inmunológica permiten determinar un gran número de analitos. Dichos métodos de detección inmunológica se basan en la capacidad de fijación específica de analitos mediante determinados analitos, como por ejemplo en las interacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Básicamente las determinaciones inmunológicas se pueden realizar en una serie de formatos de ensayo, como por ejemplo los de ensayo tipo sandwich, indirecto, valoración por retroceso o puente.

15 La identificación fiable de las enfermedades infecciosas, p.ej. de una infección por virus, como por ejemplo HIV, HBV o HCV, es de especial interés, para poder diagnosticar cuanto antes las personas afectadas. Generalmente, las determinaciones inmunológicas de anticuerpos contra HIV, HBV o HCV se efectúan mediante el formato de ensayo indirecto o mediante el formato puente. En estos casos, para detectar los anticuerpos se emplean casi siempre mezclas de varias proteínas o péptidos que llevan epítomos procedentes de la región nuclear y la envoltura del virus. Esta mezcla se inmoviliza sobre un soporte, es decir, una fase sólida. Dado que la clasificación como HIV-positivo es de gran importancia para los individuos y que los resultados falsamente positivos pueden tener consecuencias fatales, actualmente es preciso revisar en un ensayo de confirmación todos los resultados positivos obtenidos con esta determinación inmunológica en ensayos rutinarios. Como ensayo de confirmación se suele usar un método Western blot, en el que los componentes proteicos de un lisado vírico están aplicados sobre un soporte poroso. No obstante, en el caso del HCV es muy difícil cultivar el virus. Por tanto, en tal caso, como ensayo de confirmación, no se lleva a cabo ningún Western blot con lisado vírico, sino un RIBA (ensayo inmunoblot recombinante) del tipo dotblot, que comprende proteínas o péptidos recombinantes como reactivos de ensayo.

30 Un gran inconveniente de los ensayos rutinarios realizados actualmente es que, según el analito, se usan mezclas de 5 hasta 10 o más antígenos para la detección. Aunque los ensayos rutinarios se mejoran continuamente, todavía no se ha podido renunciar del todo a los ensayos de confirmación. Por ejemplo, en el ensayo Enzygum<sup>®</sup> HIV (de Boehringer Mannheim) se emplea una mezcla de unos 5 antígenos diferentes, que para la detección están biotinilados o marcados con digoxigenina. Aunque el ensayo funciona bien, implica el uso de mezclas con un número tan grande de antígenos diferentes, que la inmovilización o fijación de cada uno de ellos sobre la fase sólida impide alcanzar una concentración óptima para la detección. Con una mezcla de tantos componentes, la fase sólida no tiene bastante capacidad para fijar todos los antígenos en una concentración óptima. Además, el uso de una mezcla de antígenos para recubrir una superficie de ensayo tiene como consecuencia que los diferentes antígenos compiten por los sitios de fijación sobre la fase sólida y los distintos tamaños pueden producir distintas velocidades de difusión y diversos efectos estéricos. En caso de una aplicación directa, se fijan p.ej. antígenos hidrófobos de manera preferente a la superficie de plástico, mientras que simultáneamente se expulsan antígenos más hidrófilos. En consecuencia, por un lado solo se obtienen resultados difícilmente reproducibles, y por otro, la concentración de ciertos epítomos de antígenos resulta tan pequeña, que no permite ninguna detección significativa.

45 Otra desventaja del uso de mezclas de antígenos en los ensayos rutinarios es que, con la mezcla de diferentes antígenos, aumenta claramente el riesgo de una mayor fijación inespecífica, lo cual incrementa a su vez los resultados falsamente positivos. Como consecuencia, el límite de exclusión en los ensayos rutinarios efectuados hasta ahora debe establecerse bastante alto y por tanto se pierde sensibilidad. Sobre todo en el método Western blot, el número de resultados falsamente positivos por fijación inespecífica aumenta debido a las proteínas extrañas presentes en el lisado vírico, de tal manera que para un resultado positivo se requieren al menos 2 bandas reactivas.

50 Se ha intentado mejorar aún más la sensibilidad de este método de detección. La patente EP 0 461 462 A1 describe un inmunoensayo para detectar anticuerpos víricos, con la ayuda de un ensayo de tipo indirecto. En el inmunoensayo del tipo dotblot descrito en la patente EP 0 461 462 A1, en lugar de un lisado vírico usual se aplican, individualmente, proteínas recombinantes purificadas en áreas de ensayo discretas sobre un substrato poroso, obteniéndose un formato de ensayo que, gracias al uso de proteínas purificadas, es más sensible que un Western blot.

60 La patente EP 0 627 625 A1 se refiere a un método para detectar anticuerpos víricos en una muestra mediante el formato puente. En este caso también se trata de un RIBA (ensayo inmunoblot recombinante), en que se aplican varios antígenos de manera espacialmente separada sobre una fase sólida de un material poroso, haciendo hincapié en la necesidad de emplear una fase sólida de material poroso.

65 La patente EP 0 445 423 A2 se refiere a un método para detectar anticuerpos de HCV con la ayuda de varios epítomos de un antígeno HCV. En la patente EP 0 445 423 A2 también se describe un inmunoensayo para la determinación de anticuerpos, en el cual se alcanza una mayor sensibilidad mediante el uso de ciertos antígenos mejorados.

## ES 2 268 874 T3

Ekins R. y otros (Ann. Biol. Clin., 1992, vol. 50, p. 337-353) describen un inmunoensayo microspot multianalito, en el que hay una preparación teórica para incrementar la sensibilidad del ensayo microspot destinado al análisis de varios analitos.

5 Ekins R. y otros (Analytica Chimica Acta, 1989, vol. 227, p. 73-96) describen planteamientos teóricos para inmuno-ensayos microspot multianalito, con los cuales, en principio, debería ser posible la detección de  $10^6$  sustancias diferentes en un volumen de muestra de  $100 \mu\text{l}$ .

10 Kakabakos y otros (Clin. Chem., 1992, vol. 38/3, p. 338-342) se refieren a un inmunoensayo multianalito, en el cual se pueden detectar cuantitativamente los cuatro analitos LH, FSH, TSH y PRL simultáneamente.

La patente WO 97/32212 revela un sistema óptico para la detección de varios analitos con el uso de un “guíaondas”.

15 La patente WO 93/08472 revela el esbozo de un “inmuno-ensayo ambiental de analitos”, es decir, un ensayo independiente del volumen de muestra empleado.

20 Sin embargo, mediante este método descrito en el estado técnico, resulta difícil depositar una cantidad prefijada de reactivo sobre un soporte poroso de modo definido. Sobre todo cabe el riesgo de que los puntos individuales de ensayo depositados se entremezclen. Estos inconvenientes son más graves cuanto menores son los puntos aplicados, y por lo tanto este método no sirve para los sistemas de ensayo miniaturizados. Además, el manejo de tiras de papel es difícil de automatizar y por tanto es insustentable como ensayo rutinario.

25 Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consistía en proporcionar un método que permitiera eliminar, al menos en parte, las desventajas del estado técnico.

Según la presente invención, dicho objetivo se resuelve mediante un método para detectar un analito en una muestra, el cual comprende las siguientes etapas:

30 (a) preparación de una fase sólida que comprende un soporte no poroso y, como mínimo, dos áreas de ensayo separadas espacialmente, cada una de las cuales contiene distintos receptores inmovilizados, específicos del analito,

35 (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o capaz de unirse con un grupo generador de señal, y

(c) detección de la presencia o/y de la cantidad de analito mediante la determinación del grupo generador de señal sobre las áreas de ensayo.

40 El receptor inmovilizado, específico del analito, puede estar fijado tanto directa como indirectamente a la fase sólida mediante uno o más receptores. La fijación puede tener lugar, por ejemplo, mediante interacciones de tipo adsorbente o covalente, pero, preferiblemente, por interacciones de gran afinidad específica, p.ej. del tipo estreptavidina o avidina/biotina o anticuerpo/antígeno.

45 El propio receptor libre, específico del analito, puede llevar un grupo generador de señal o ser capaz de unirse a un grupo generador de señal. En este caso, el reactivo detector consta de varios componentes.

50 En el caso de los analitos puede tratarse de una población homogénea o heterogénea, p.ej. una población heterogénea de anticuerpos, una mezcla de antígenos o una mezcla de antígenos y anticuerpos eventualmente diferentes, en la cual los antígenos y anticuerpos proceden de unos o varios virus o son inducidos por ellos. En caso de poblaciones heterogéneas de analitos, cada una de las áreas de ensayo fija una población parcial del analito investigado. Los receptores específicos del analito, respectivamente inmovilizados sobre una área de ensayo, son diferentes, es decir, se fijan preferentemente, conforme a la presente invención, a distintos epítomos de un analito homogéneo, como por ejemplo un antígeno, a distintos subtipos de analito, como por ejemplo subtipos de antígenos, o/y a distintos tipos de analitos, como por ejemplo diferentes antígenos o/y anticuerpos.

55 Sorprendentemente, se comprobó que la sensibilidad del ensayo de detección, por ejemplo del ensayo de anticuerpos, podía mejorarse claramente con el empleo de ensayos de panel, en los cuales los distintos reactivos, p.ej. diferentes antígenos, se aplican como puntos individuales, es decir, sobre áreas de ensayo separadas. Con el análisis multipépitomo de la presente invención, es decir, la detección simultánea y separada de varias poblaciones parciales de un analito o de un virus como el HIV, se puede incrementar considerablemente la sensibilidad y fiabilidad de los ensayos de detección.

60 Si se obtiene un resultado de ensayo positivo sobre una o más áreas de ensayo, en algunos casos sobre al menos dos, ello se valora como presencia del analito en la muestra.

65 El empleo según la presente invención de un soporte no poroso permite aplicar los reactivos en áreas definidas. Esto es de especial importancia en los formatos de ensayo miniaturizados. Conforme a ello, las áreas de ensayo tienen

## ES 2 268 874 T3

preferentemente un diámetro de 0,01 hasta 1 mm, con mayor preferencia de 0,1 hasta 0,5 mm, sobre todo de 0,1 hasta 0,2 mm.

5 Se prefieren las fases sólidas con varias áreas de ensayo, conocidas también como sistemas matriciales. Este tipo de sistemas está descrito p.ej. por Ekins y Chu (Clin. Chem. 37 (1995) 1955-1967) y en la patentes US 5,432,099, 5,516,635 y 5,126,276.

10 La fase sólida usada según la presente invención consta de un soporte no poroso utilizable para métodos de detección. Este soporte no poroso puede ser de cualquier material que no sea poroso. Lleva preferentemente una superficie de plástico, de vidrio, de metal o de óxido metálico. Con especial preferencia, el soporte presenta una superficie de poliestireno. Sobre este soporte están dispuestas unas zonas espacialmente discretas (áreas de ensayo). Sobre estas áreas de ensayo hay reactivos depositados, por ejemplo receptores de fase sólida inmovilizados. Los reactivos se inmovilizan sobre las áreas de ensayo mediante métodos conocidos, p.ej. fijación directa por adsorción, unión covalente o mediante pares afines, p.ej. estreptavidina/biotina, antígeno/anticuerpo o azúcar/lectina.

15 Sobre todo, es ventajoso que las áreas de ensayo espacialmente separadas estén cargadas con reactivos diferentes. Con la aplicación individual de las distintas áreas de ensayo pueden elegirse para cada reactivo, por ejemplo para cada uno de los antígenos, la concentración óptima en la fase sólida y las condiciones óptimas de recubrimiento, p.ej. en forma de recetas tampón especiales. Ello permite aplicar cada receptor específico de analito, p.ej. cada antígeno, hasta 20 la capacidad máxima de fijación de la superficie, mientras que, en los ensayos conocidos hasta la fecha, cada receptor, p.ej. cada antígeno, solo se podía unir con una parte de la capacidad de fijación disponible. Además, gracias a la aplicación separada de los distintos reactivos no hay ninguna competencia entre ellos, por ejemplo entre los antígenos, por los sitios de fijación sobre la fase sólida. Así pues, se prefiere fijar por cada área de ensayo solo un reactivo, capaz de unirse específicamente al analito investigado, de manera que cada área de ensayo solo contenga un único 25 tipo de receptor específico de analito inmovilizado. Si es necesario, este reactivo se puede diluir con moléculas inertes diluyentes, para formar una fase de fijación óptimamente homogénea. Las moléculas inertes diluyentes se fijan a la fase sólida, pero no interactúan con el analito, ni con otros componentes de la muestra. Moléculas diluyentes adecuadas se describen por ejemplo en las patentes WO 92/10757 y EP 0 664 452 A2.

30 En el caso de áreas de ensayo sobre las que solo se ha fijado un reactivo, por ejemplo un antígeno, capaz de unirse con el analito, se comprobó que disminuía claramente la fijación inespecífica. Así, p.ej., al aplicar varios antígenos en forma de puntos individuales, no se observa ninguna fijación inespecífica medible, mientras que un punto de ensayo sobre el cual se ha aplicado una mezcla de varios antígenos muestra una fijación inespecífica claramente medible.

35 En el método según la presente invención, el analito se detecta mediante procedimientos conocidos, utilizando grupos marcadores adecuados, p.ej. grupos fluorescentes o quimioluminiscentes, marcadores radiactivos, enzimáticos o cromáticos y partículas de solución coloidal. Como alternativa, en fases sólidas adecuadas también puede comprobarse la interacción de componentes del medio detector con las áreas de ensayo, determinando el espesor de capa de 40 las respectivas superficies, p.ej. mediante espectroscopia por resonancia de plasmones.

Para diferenciarse de zonas inertes de la fase sólida, las áreas de ensayo limitadas también pueden llevar un grupo marcador detectable e inespecífico del analito, que se puede detectar junto con el grupo del recubrimiento específico del analito, pero sin interferir con él. Un ejemplo de tal tipo de marcador inespecífico del analito es un grupo fluorescente 45 que emite a una longitud de onda de fluorescencia distinta de la de un grupo marcador específico del analito. Al igual que el receptor en la fase sólida, el grupo marcador inespecífico del analito se inmoviliza preferentemente mediante un par de fijación de gran afinidad, p.ej. estreptavidina/biotina.

La sensibilidad también se puede incrementar utilizando un reactivo de detección universal. Previamente se puede 50 usar para cada molécula de analito un reactivo de detección independiente, el cual se une a la molécula de analito y lleva un marcador, por ejemplo un enzima, un grupo fluorescente o partículas de látex fluorescentes. Sin embargo la combinación de varios reactivos de detección marcados suele aumentar mucho la concentración de marcadores, y por lo tanto es natural que crezca fuertemente la fijación inespecífica. Este problema se puede resolver utilizando un reactivo de detección universal. En la presente invención se prefieren como tal las partículas de látex 55 con marcaje fluorescente. Entonces, para fijar específicamente la molécula de analito, se usa un primer receptor específico del analito que no lleva ningún grupo generador de señal. A este primer receptor específico del analito se fija un segundo receptor, universal y marcado, o sea, un receptor que se puede unir a varios, preferentemente a todos los primeros receptores empleados, con independencia del analito. El segundo receptor se puede unir al grupo marcador por adsorción, por enlace covalente con grupos funcionales o mediante pares de fijación muy afines, p.ej. estreptavidina/biotina, antígeno/anticuerpo o azúcar/lectina. Se usa preferentemente el conocido sistema 60 dig/anti-dig.

Otra desventaja del ensayo puente, que se realiza p.ej. como reacción de una etapa, es que el receptor de fase sólida (p.ej. HIV-gp41 biotinilado) y el receptor de detección libre (p.ej. HIV-gp41 digoxigenilado) deben estar en relación 65 1:1 para lograr una señal óptima. Esto es una desventaja, porque, debido a la limitada capacidad de fijación de la fase sólida, la concentración de cada receptor en la fase sólida suele ser inferior a la óptima y por tanto tampoco puede ser favorable para el receptor de detección.

## ES 2 268 874 T3

Con el método de la presente invención, los receptores de fase sólida pueden fijarse a ella en concentración óptima. Asimismo, el receptor de detección también puede ofrecerse en concentración óptima, porque, al contrario que los receptores marcados con enzimas, los receptores conjugados con digoxigenina o biotina tienen una tendencia insignificante a la fijación inespecífica. Estos reactivos se pueden usar en exceso, de manera que las imprecisiones en la adición del receptor no repercuten en la precisión del ensayo.

La presencia o/y la cantidad del analito en una muestra se puede determinar mediante la fijación específica del analito investigado al reactivo inmovilizado sobre el área de ensayo, p.ej. un receptor en fase sólida. La sensibilidad del método de detección puede mejorarse notablemente con la valoración combinada de las distintas áreas de ensayo, que contienen respectivamente diferentes reactivos capaces de fijar específicamente el analito, sobre todo, reduciendo los falsos resultados positivos y reconociendo los correctos sin ninguna duda. El método de la presente invención es de especial interés para registrar y eliminar fijaciones inespecíficas en los ensayos cualitativos con grandes exigencias de especificidad, como es el caso de los análisis de infecciones (p.ej. HIV).

Con el empleo de matrices según la presente invención, es decir, fases sólidas que comprenden al menos dos, con preferencia al menos tres, con mayor preferencia al menos cinco, y hasta mil, sobre todo hasta cien áreas de ensayo espacialmente separadas, es posible establecer que, como mínimo, una de ellas constituya una área de control. Por tanto, el método de la presente invención comprende preferentemente el empleo de una fase sólida que además contenga al menos una, con preferencia dos y con mayor preferencia al menos cinco áreas de control. La integración de puntos de control en la fase sólida permite distinguir fácil y rápidamente los falsos resultados causados por fallos. Además de las áreas de ensayo específicas también se puede medir un sustrato específico de la muestra y definir por tanto un umbral específico de la misma. El uso de matrices de ensayo y de puntos de control permite rebajar dicho umbral. El valor umbral es un valor límite que se emplea en el método de ensayo, para poder distinguir entre valores positivos y negativos. Este valor umbral es de especial importancia para los métodos de ensayo relativos a las enfermedades infecciosas. El método de la presente invención permite detectar una diferencia positivo/negativo con una probabilidad de error considerablemente baja.

Cuando se usan varias áreas de ensayo - respectivamente previstas para determinar distintas moléculas de analito - ha dado a menudo buen resultado una definición del valor umbral, que sea específico del área de ensayo, para obtener una mayor especificidad (es decir una distinción correcta entre valores positivos y negativos) del ensayo a igual sensibilidad.

El método de la presente invención se puede emplear en cualquier proceso de detección, p.ej. inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de azúcar/lectina y procedimientos análogos. El método de la presente invención también es esencialmente apropiado para determinar cualquier analito en una muestra. La detección del analito tiene lugar de modo especialmente preferente mediante interacciones específicas con uno o varios de los reactivos capaces de fijar el analito, es decir, receptores escogidos preferentemente entre proteínas, péptidos, anticuerpos, antígenos, haptenos y ácidos nucleicos.

Así como una ventaja esencial del método de la presente invención consiste en mejorar ante todo la sensibilidad de la detección de un analito individual, con la elección apropiada de las áreas de ensayo también se pueden determinar al mismo tiempo varios analitos con gran sensibilidad.

Otro objeto de la presente invención es una fase sólida para detectar un analito en una muestra. Dicha fase sólida se caracteriza por constar de un soporte no poroso y de al menos dos áreas de ensayo separadas espacialmente, las cuales contienen a su vez reactivos diferentes con capacidad de fijación específica al analito investigado.

Con preferencia, las áreas de ensayo contienen respectivamente reactivos diferentes, que se fijan a distintos epítomos o/y sustratos de un analito o/y a distintos tipos de analito.

Para disponer el mayor número posible de áreas de ensayo sobre una fase sólida se emplean preferentemente formatos de ensayo miniaturizados. La distancia entre cada una de las áreas de ensayo se elige de modo que los reactivos aplicados no puedan entremezclarse. Normalmente basta que los bordes de las áreas de ensayo estén distanciados 0,05 hasta 5 mm. Entre las áreas de ensayo hay preferentemente una superficie inerte incapaz de unirse con el analito o con otros componentes de la muestra.

La fase sólida de la presente invención puede usarse en cualquier método de detección, p.ej. inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de azúcar-lectina y análogos. Preferentemente se emplea en un inmunoensayo para detectar anticuerpos o/y antígenos.

La presente invención incluye también un kit de ensayo para determinar un analito en una muestra. Este kit consta de una fase sólida según la presente invención y de reactivos de detección marcados. Los reactivos de detección marcados son conocidos del especialista y contienen generalmente un grupo marcador y un grupo de fijación específica, que permite la detección del analito. Como marcadores son apropiados, p.ej., los grupos fluorescentes o quimioluminiscentes, los enzimas y partículas radiactivas o de soluciones coloidales. El grupo de fijación específica puede ser capaz de unirse p.ej. con el complejo del analito formado o, en caso de formatos competitivos, con otros componentes del sistema de detección. El kit de ensayo incluye preferentemente un conjugado universal como reactivo de detec-

## ES 2 268 874 T3

ción, sobre todo, partículas de látex con un marcador fluorescente que pueden unirse con los receptores de detección específica del analito.

Otro problema de los ensayos rutinarios de los cuales se dispone hasta la fecha es que todos los antígenos y anticuerpos necesarios para un ensayo - por ejemplo un ensayo de HIV - se mezclan y en el método de detección se establece un valor umbral óptimo para esta mezcla. Sin embargo, el uso de un valor umbral común para todos los parámetros hace que este límite quede determinado y acotado por la fijación inespecífica de la peor sustancia empleada. Por tanto, otro objeto de la presente invención es un método para determinar un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- (a) preparación de una fase sólida que consta de un soporte y de, al menos, dos áreas de ensayo separadas espacialmente, las cuales llevan respectivamente unos receptores inmovilizados, distintos y específicos del analito,
- (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o que puede unirse a un grupo generador de señal, y
- (c) detección de la presencia o/y cantidad del analito por determinación del grupo generador de señal en las áreas de ensayo, de tal manera que, si la señal es superior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como positiva y, si es inferior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como negativo.

Con el uso de valores límite prefijados y específicos de cada una de las áreas de ensayo puede mejorarse claramente la especificidad del método de detección, manteniendo la sensibilidad elevada. El valor límite o valor umbral se calcula con las magnitudes señal de la muestra, fondo de la muestra y fondo de un control negativo. Un cálculo habitual del valor umbral (COI) se realiza por ejemplo según la fórmula:

$$\text{COI} = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{fondo}_{\text{muestra}}/n \times \text{fondo}_{\text{control negativo}}$$

Un valor usual para n es por ejemplo 2. El factor n, y por tanto el valor umbral, puede rebajarse para ciertas áreas de ensayo en las que se observan falsas muestras positivas y n puede ser un número comprendido entre 2 y 100, preferentemente entre 1 y 10.

Se prefieren valores límite individuales para cada área de ensayo, lo cual significa que para las distintas áreas de ensayo se fijan diferentes valores límite o umbral, especialmente para al menos dos áreas de ensayo. Las formas de ejecución preferidas de este método aprovechan las características anteriormente descritas.

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos siguientes.

### Ejemplos

#### 1. Ensayo de anticuerpos anti-HIV por tecnología microspot con varias áreas de ensayo antígeno-específicas

El microspot es una tecnología miniaturizada ultrasensible ideal para la determinación simultánea de varios parámetros en un solo proceso de medición. Para la determinación de anticuerpos anti-HIV se aplican individualmente distintos antígenos HIV detectores, formando las denominadas "matrices" sobre un área de ensayo (spot) de un soporte de poliestireno, mediante un método de inyección de tinta. Para llevar a cabo el ensayo se pipetea 30  $\mu$ l de muestra diluida con tampón de muestras en relación 1:1 sobre el soporte provisto de áreas de ensayo y se incuba durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente. Tras aspirar la muestra y lavar con tampón de lavado se agregan 30  $\mu$ l de solución reactiva 1 que lleva una mezcla de todos los antígenos HIV marcados con digoxigenina y se incuba otra vez durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente. Tras aspirar la solución reactiva 1 y lavar con el tampón de lavado se agregan 30  $\mu$ l de solución reactiva 2 con el reactivo detector. Como reactivo universal de detección se utilizan unas partículas de látex fluorescentes, de 100 nm de tamaño, que están recubiertas mediante unión covalente con un anticuerpo anti-digoxigenina.

Este reactivo de detección también se incuba durante 20 minutos agitando a temperatura ambiente y, a continuación, se aspira, se lava y se seca por aspiración. Las áreas de ensayo se irradian luego con un láser de He-Ne de 633 nm de longitud de onda y la fluorescencia se mide a 670 nm de longitud de onda con una cámara CCD.

La fase sólida contiene áreas de ensayo específicas con los siguientes antígenos inmovilizados:

- Polipéptido p24 recombinante
- Transcriptasa inversa recombinante (RT)

## ES 2 268 874 T3

- Péptido gp41, 1

- Péptido gp41, 2

5 Como tampón de la muestra se usó un tampón Tris 50 mM de pH 7,6 con los siguientes aditivos: 0,05% de Tween 20, 0,5% de albúmina de suero bovino (RSA), 0,1% de IgG bovino, 0,01% de metilisotiazolona, 3% de peptona.

10 Como solución reactiva 1 se empleó el tampón de muestra arriba descrito, que contiene los siguientes antígenos específicos del ensayo:

- p24 recombinante, marcado con digoxigenina

15 - Transcriptasa inversa recombinante marcada con digoxigenina

- Péptido gp41, 1, marcado con digoxigenina

- Péptido gp41, 2, marcado con digoxigenina

20 Como solución reactiva 2 se empleó un tampón Tris 50 mM de pH 8,0 con los siguientes aditivos: 0,05% de Tween 20, 0,9% de NaCl, 0,5% de RSA, 0,1% de azida sódica y 0,01% de partículas de látex fluorescentes recubiertas de un anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina.

### 25 *2. Comparación de un ensayo de anticuerpos anti-HIV en el formato microspot con los métodos convencionales*

En este ensayo se midieron muestras llamadas de seroconversión. Estas muestras son tomas sucesivas de diversas personas, cuyo resultado HIV-negativo en suero se convierte en HIV-positivo. Cuanto más sensible es un método, más pronto se puede detectar una señal de anticuerpo específico de HIV. Las muestras se midieron con el método de la presente invención (microspot) y, comparativamente, con un método conocido (Enzymun<sup>®</sup> de Boehringer Mannheim).  
30 Las sustancias específicas de HIV utilizadas para ello eran idénticas en ambos sistemas de ensayo, los cuales, por tanto, solo se diferencian, sobre todo, en el análisis por puntos individuales separados. En la tabla siguiente se representan los índices del valor umbral ( $\text{índice de valor umbral} = \frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{2 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$ ) para ambos métodos, comparados además con datos de Western blot:

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

## ES 2 268 874 T3

	Panel de seroconversión de la firma BBI*	Día de la toma	p24	RT	Péptido gp41, 1	Péptido gp41, 2	Western blot	Enzymun®	
5	<b>R</b>	2ª toma	2	0,0	0,0	0,0	1,3	negativo	0,5
		3ª toma	7	22,2	0,0	0,0	2,4	indiferente	15,4
10		4ª toma	13	17,4	2,6	4,4	36,4	positivo	36,0
	<b>AB</b>	1ª toma	0	0,0	0,0	0,6	0,0	negativo	0,3
15		2ª toma	28	0,0	0,0	0,4	1,1	negativo	0,7
		3ª toma	33	0,0	0,0	5,5	54,4	negativo	24,2
		4ª toma	35	0,8	0,2	6,0	33,2	positivo	26,7
20		5ª toma	37	15,2	5,1	4,6	33,0	positivo	28,9
	<b>AD</b>	5ª toma	21	0,0	0,0	0,0	0,0	negativo	0,3
		6ª toma	25	0,2	0,0	1,6	3,7	positivo	0,9
25		7ª toma	28	14,1	0,3	11,1	65,5	positivo	24,5
	<b>AG</b>	3ª toma	13	0,0	0,0	0,0	0,0	negativo	0,4
		4ª toma	27	0,0	0,0	0,0	1,1	negativo	0,6
30		5ª toma	34	6,0	5,3	0,0	106,9	positivo	8,1
		6ª toma	50	6,1	5,4	0,0	65,4	positivo	3,1
		7ª toma	78	1,0	6,8	0,0	23,9	positivo	1,6
35		8ª toma	163	1,5	5,3	0,0	4,9	positivo	0,6
		9ª toma	194	2,3	2,5	0,0	2,8	positivo	0,7
40	<b>AI</b>	1ª toma	0	0,0	0,0	1,2	0,1	indiferente	0,8
		2ª toma	7	0,6	0,5	54,7	44,9	positivo	30,2
		3ª toma	11	1,1	0,7	18,8	22,5	positivo	30,2

45 \* Boston Biomedica Inc.

50 Esta comparación demuestra que la repartición en puntos individuales, con sus respectivas concentraciones óptimas de antígenos, mejoraba claramente la sensibilidad en comparación con los ensayos conocidos. De los 5 paneles de seroconversión se diagnosticaron tempranamente 7 tomas como positivas. Esto corresponde, según el panel, a una detección más temprana de la infección por HIV de 3 hasta 7 días. En comparación con el Western blot también se alcanzó un claro aumento de la sensibilidad, con 6 tomas diagnosticadas más pronto.

### 55 3. Mejora de la especificidad del ensayo mediante cálculo de valores umbral específicos de las áreas de ensayo

60 En los ensayos rutinarios disponibles hasta la fecha se mezclan todos los antígenos y anticuerpos necesarios para la determinación y se establece un valor umbral óptimo para esta mezcla. Este límite está marcado por la fijación inespecífica de la "peor" sustancia empleada. En cambio, con la tecnología microspot de la presente invención se puede calcular un valor umbral específico del área de ensayo y para cada sustancia empleada.

65 Con idéntico cálculo del valor umbral para cada área de ensayo ( $COI = \frac{\text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}}}{2 \times \text{señal}_{\text{control negativo}}}$ ) y con el ensayo de HIV combinado (ejemplo 3) se pudo alcanzar la siguiente especificidad en 1264 muestras:

- Antígeno p24: 100%
- Ensayo de anticuerpos anti-HIV: 99,52% (seis determinaciones falsamente positivas)



## ES 2 268 874 T3

Como que los falsos resultados positivos solo se dieron en las áreas de ensayo para el péptido gp41, 2 y la transcriptasa inversa, los valores umbral para dichas áreas se rebajaron hasta los siguientes límites:

*Péptido gp41, 2*

5

$$(COI = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}} / 5 \times \text{señal}_{\text{control negativo}})$$

*Transcriptasa inversa*

10

$$(COI = \text{señal}_{\text{muestra}} - \text{señal}_{\text{fondo}} / 3 \times \text{señal}_{\text{control negativo}})$$

15 De este modo la especificidad del ensayo de HIV se pudo mejorar de 99,52% a 99,92% (solo unas pocas determinaciones falsamente positivas). La sensibilidad del ensayo no resultó afectada, porque no se alteró el índice del valor umbral para el ensayo tan sensible del antígeno p24. Por tanto, se puede mejorar claramente la especificidad, manteniendo una sensibilidad elevada.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un analito en una muestra, el cual comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) preparación de una fase sólida que comprende un soporte no poroso y, como mínimo, dos áreas de ensayo separadas espacialmente, cada una de la cuales contiene distintos receptores inmovilizados, específicos del analito,
- 10 (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o capaz de unirse con un grupo generador de señal, y
- (c) detección de la presencia o/y de la cantidad de analito mediante la determinación del grupo generador de señal sobre las áreas de ensayo.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el analito es una población homogénea.
3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el analito es una mezcla de antígenos.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el analito puede ser una mezcla de diferentes antígenos y anticuerpos.
5. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el analito es una población heterogénea de anticuerpos.
- 25 6. Método según alguna de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque las áreas de ensayo tienen un diámetro de 0,01 hasta 1 mm.
7. Método según alguna de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la fase sólida se prepara aplicando por separado, de modo directo y específico, los distintos receptores específicos del analito sobre las áreas de ensayo espacialmente separadas.
- 30 8. Método según alguna de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el recubrimiento sobre las respectivas áreas de ensayo está formado por un solo tipo de molécula con capacidad de fijación.
- 35 9. Método según alguna de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la fase sólida empleada comprende además una área de control que no lleva ningún receptor específico.
- 40 10. Método según alguna de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque, para la detección de los complejos formados por el analito y los reactivos capaces de fijarlo, se usa un reactivo detector universal, concretamente partículas de látex marcadas.
- 45 11. Fase sólida para detección de un analito en una muestra, **caracterizada** porque consta de un soporte no poroso y de al menos dos áreas de ensayo separadas espacialmente, cada una de las cuales contiene diferentes reactivos para la fijación específica del analito investigado.
- 50 12. Empleo de una fase sólida según la reivindicación 8 en un inmunoensayo.
13. Kit de ensayo para detectar un analito en una muestra, el cual comprende una fase sólida según la reivindicación 8 y reactivos de detección marcados.
- 55 14. Método para la detección de un analito en una muestra, que consta de las siguientes etapas:
- (a) preparación de una fase sólida que consta de un soporte y de, al menos, dos áreas de ensayo separadas espacialmente, las cuales llevan respectivamente unos receptores inmovilizados, distintos y específicos del analito,
- 60 (b) puesta en contacto de la muestra con la fase sólida y al menos un receptor libre, específico del analito, que lleva un grupo generador de señal o que puede unirse a un grupo generador de señal, y
- (c) detección de la presencia o/y cantidad del analito por determinación del grupo generador de señal en las áreas de ensayo, de tal manera que, si la señal es superior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como positiva y, si es inferior a un valor límite prefijado y específico del área de ensayo, se clasifica como negativo.
- 65 15. Método según la reivindicación 11, **caracterizado** porque los valores umbral se determinan de modo individual para cada área de ensayo.