(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 368 776**

(51) Int. CI.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08758390 .2**
(96) Fecha de presentación: **06.05.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2147313**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

(54) Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE LA CLASE DE INMUNOGLOBULINA G (IgG).**

(30) Prioridad:
08.05.2007 EP 07009240

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2011

(73) Titular/es:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH

(72) Inventor/es:
BRONOLD, Martina;
MARKERT-HAHN, Christine;
DONIE, Frederic;
BOLLHAGEN, Ralf y
UPMEIER, Barbara

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Método para la detección de anticuerpos específicos de la clase de inmunoglobulina G (IgG)

Esta invención se refiere a un método para la determinación de un analito en una muestra por medio de una valoración, que se puede realizar sin etapas de lavado en un formato de una sola etapa.

Cuando en el sistema inmunológico del organismo de un animal mamífero entran cuerpos extraños, éste crea anticuerpos, llamados también inmunoglobulinas, que sirven paren cinco clases distintas. Inmunoglobulinas de clase M, G, A, E y D. Estas cinco clases de inmunoglobulinas se diferencian respectivamente en la composición de las cadenas pesadas, que se conocen como cadenas μ, γ, ε, o bien δ.

Cada clase o tipo de inmunoglobulina tiene un cometido en el organismo. Las inmunoglobulinas de clase M actúan en un primer contacto con el antígeno produciéndose la llamada inmunización inicial. Sin embargo, la concentración de estas inmunoglobulinas disminuye rápidamente en el caso de una infección avanzada. Las inmunoglobulinas de clase G se forman al principio lentamente en una primera inmunización y actúan en grandes cantidades en el caso de una segunda infección con el mismo antígeno. Las inmunoglobulinas de clase A se pueden encontrar en las superficies de las mucosas del organismo y actúan en los procesos de defensa que allí tienen lugar. Las inmunoglobulinas de la clase E son responsables principalmente de las reacciones alérgicas. La función exacta de las inmunoglobulinas de la clase D es desconocida por el momento.

Las distintas clases de inmunoglobulinas se pueden presentan en la sangre en concentraciones muy distintas. Así las inmunoglobulinas de clase G (IgG) en suero humano normal con un porcentaje de aproximadamente el 75%, lo que corresponde a un contenido en suero de 8 hasta 18 mg/ml, son la clase más frecuente. La inmunoglobulina en segundo lugar de frecuencia es la IgA, cuya concentración media en suero es de 0,9 hasta 4,5 mg/ml. Las inmunoglobulinas de clase M existen en una concentración de 0,6 hasta 2,9 mg/ml, las inmunoglobulina de clase D en una concentración de 0,03 hasta 0,4 mg/ml. El porcentaje inferior corresponde a los anticuerpos de IgE, que solamente aparecen en suero en una concentración de 0,02 hasta 0,05 μg/ml.

En la tecnología actual se han descrito diferentes métodos para la detección de anticuerpos de una clase determinada específicos para un antígeno. Asi con frecuencia se realiza la detección en una muestra de anticuerpos de una clase determinada específicos para un antígeno de manera que los anticuerpos específicos están enlazados a una fase sólida revestida de un antígeno específico. La detección de las inmunoglobulinas (Ig) enlazadas ahora a la fase sólida, específicas para el antígeno, se realiza mediante el enlace de los anticuerpos, que se dirigen específicamente contra la Ig humana de una clase determinada, a la molécula Ig que se va a detectar. Los anticuerpos dirigidos contra la Ig humana se han previsto con un etiquetado o marca a través del cual se realiza la detección. Dicha guía de prueba (formato de prueba indirecto) solamente es posible cuando antes de la reacción se elimina la Ig no enlazada con los anticuerpos marcados dirigidos contra la Ig humana. Por lo tanto en este formato no es posible una guía de prueba de un solo paso como la necesaria para los sistemas automatizados.

El llamado test o prueba del puente plantea una posibilidad a la hora de realizar una prueba en una sola etapa para la detección de anticuerpos. El concepto del test del puente se ha descrito en EP-A-0 280 211. Un primer compañero de enlace, que es capaz de estar enlazado específicamente con un anticuerpo determinado, como por ejemplo un antígeno, está unido o enlazado a una fase sólida. El anticuerpo que se va a determinar se une al antígeno enlazado a la fase sólida. En el lote de prueba existe además otro antígeno específico que está dotado de una marca o etiqueta. La detección del anticuerpo se realiza a través de la marca. SIempre que existen en la muestra inmunoglobulinas de clases distintas pero de la misma especificidad, la prueba no plantea diferencias entre las distintas clases.

La EP 0 944 838 B1 publica un método de detección con la prueba del puente que facilita o permite la determinación selectiva de anticuerpos IgG específicos del antígeno en una muestra que también presenta anticuerpos IgM con la misma especificidad. Para ello se emplea el antígeno en forma monomérica. El antígeno monomérico actúa de manera que los anticuerpos IgM no pueden reaccionar o bien solo débilmente, con la misma especificidad.

Las detecciones específicas de anticuerpos tienen una gran importancia en la serología de la infección, en la que se detecta la respuesta inmunológica contra estructuras antígenas de los agentes patógenos. Aunque existen diferentes fuentes de obtención de antígenos del virus (expresión recombinante en sistemas procarióticos y eucarióticos; cultivo controlado de virus, obtención de antígenos de fuentes naturales) no siempre es posible obtener antígenos en forma monomérica para poder realizar un inmunoanálisis selectivo de IgG en formato de una sola etapa.

La EP 0 957 360 B1 describe la utilización de factores reumáticos para reducir el efecto Hook o gancho en el método para determinar un analito.

La EP 1 098 198 A1 describe un inmunoanálisis para la determinación de anticuerpos IgG humanos. Para ello se emplea un anticuerpo monoclonal determinado el cual se dirige contra un epítopo de conformación del fragmento Fc del IgG humano enlazado a un antígeno. Este anticuerpo se emplea para la detección selectiva de IgG y se puede diferenciar entre los IgG que se enlazan a un antígeno y los IgG que no se unen a ningún antígeno. La presencia de

IgG no enlazado interfiere y conduce a pérdidas de señal.

La EP 1 653 233 A1 describe un método de prueba o análisis para determinar anticuerpos específicos de los antígenos de la clase IgG, donde una muestra se pone en contacto con una fase sólida a la que están unidos los antígenos. En este método se emplea un anticuerpo monoclonal que distingue entre inmunoglobulinas enlazadas de forma no específica a la fase sólida e inmunoglobulinas enlazadas al antígeno. Tras la puesta en contacto de la muestra con la fase sólida se lava y después se aplica el anticuerpo monoclonal.

Un inmunoanálisis que se realiza con un dispositivo de análisis automático para la detección de la inmunoglobulina G específica del antígeno en formato de una sola fase se ha descrito en WO 99/15898 (Chien et al). Se emplea un anticuerpo que es específico para la parte o el porcentaje constante de la inmunoglobulina G humana. En esta valoración son significativas las interferencias por la IgG libre, no específica sin discriminación suficiente de la IgG libre y de la IgG que forma complejos.

Yin y cols. (Anal. Chem. 2005, 77:3525-3530) describen una prueba o ensayo inmunológico Sandwich para la detección de la IgG.

Klaassen y cols (British Journal of Haematology, 1991:77:398-402) publican un método para la determinación de un anticuerpo específico del antígeno de la clase de inmunoglobulinas G. Se detecta un inmunocomplejo bivalente con un receptor enlazado a la fase sólida (C1q) y un segundo receptor (anticuerpo marcado 125I)

Boas (Biophotonics International, April 2005, 60-61) publica una prueba o ensayo inmunológico Sandwich para la detección de ligandos difundibles derivados de los amiloides con ayuda de un anticuerpo, que es específico para oligómeros beta de amiloides.

Los métodos de una sola etapa de la tecnología actual para detectar IgG pueden diferenciar entre IgG enlazada y libre de forma insuficiente. Para conseguir una discriminación entre IgG e IgM de la misma especificidad, los antígenos deben ser monómeros, y este es un requisito que no siempre se cumple.

El cometido de la presente invención consistía en desarrollar un método para la detección de un analito en una muestra, en particular de anticuerpos específicos del antígeno de la clase de inmunoglobulina G, que se pueda llevar a cabo en una sola etapa, para poder ser empleado preferiblemente en sistemas automatizados. Además la presente invención tiene el cometido de superar al menos parcialmente los inconvenientes de la tecnología actual. Por ello es necesaria una discriminación suficiente entre los analitos libres y los analitos enlazados.

En un primer aspecto la presente invención hace referencia a un método para la determinación de un analito en una muestra, que incluye los pasos siguientes:

(a) puesta en contacto de la muestra con un primer receptor específico del analito y un segundo receptor específico del analito, de manera que uno de los dos receptores está unido a una fase sólida o bien es capaz de enlazarse a una fase sólida y el otro receptor lleva un grupo que emite una señal o bien es capaz de unirse a un grupo que emite una señal, y

(b) detección de la existencia o/y la cantidad de analito mediante la determinación del grupo que emite una señal en la fase sólida,

que se caracteriza, por que el primer receptor específico del analito contiene al menos dos lugares de enlace para el analito y el segundo receptor específico del analito está unido a una disposición de al menos dos moléculas de analito, que están unidas al primer receptor, y esta disposición puede diferenciarse de una molécula de analito individual y el analito es un anticuerpo específico del antígeno.

Sorprendentemente se ha averiguado que el método conforme a la invención no se ve alterado por la presencia del factor reumático en una muestra.

El analito es un anticuerpo específico del antígeno, por ejemplo, un anticuerpo específico del antígeno de la clase G, M, A, D o/y E. Se prefiere especialmente que el analito sea un anticuerpo específico del antígeno de la clase G, por ejemplo, contra un patógeno, un antígeno tumoral y/y un autoantígeno.

La muestra que incluye el analito es preferiblemente una muestra líquida. La muestra líquida puede ser cualquier muestra líquida, por ejemplo, una muestra acuosa. La muestra puede ser una muestra biológica o/y una muestra clínica, como por ejemplo, un líquido corporal, como sangre, suero, orina, esputo, pus, etc.. Preferiblemente una muestra puede contener un factor reumático.

En una configuración preferida se distinguen el primer y el segundo receptor específicos del analito.

En un método conforme a la invención el segundo receptor es capaz de enlazarse de forma selectiva a una disposición de al menos dos moléculas de analito, que están enlazadas al primer receptor. Por “una disposición de al menos dos moléculas de analito” se entiende que al menos dos moléculas de analito juntas presentan una estructura a la que es capaz de enlazarse el segundo receptor, es decir, la cual puede ser detectada por el segundo

receptor y la cual puede diferenciar el segundo receptor de una molécula individual de analito, en particular de una molécula individual de analito que no está enlazada al primer receptor. Por “capaz de enlazarse de forma selectiva” se entiende también que el segundo receptor se puede enlazar más fuertemente a la disposición de al menos dos moléculas de analito que a una única molécula de analito. Una disposición puede ser también un complejo inmunológico, que engloba al menos dos moléculas de analito, en especial anticuerpos, que están unidos al primer receptor. El primer receptor puede englobar un antígeno con al menos dos epítopos.

Preferiblemente una “disposición” contiene al menos dos moléculas de analito enlazadas al primer receptor, que están “agregadas”. “Agregado” en el sentido de la presente invención significa que las moléculas de analito enlazadas al receptor se encuentran a una distancia determinada que se elige de manera que el segundo receptor específico del analito está unido a al menos dos moléculas de analito enlazadas al primer receptor. Las moléculas de analito enlazadas al primer receptor se encuentran también en una cercanía espacial. Las distancias de las moléculas de analito enlazadas al primer receptor se determinan por medio de la distancia de los puntos o lugares de enlace en el receptor. “Agregado” en el sentido de la presente invención incluye que las moléculas de analito unidas al primer receptor no están enlazadas o unidas entre ellas por un enlace químico, es decir, por enlaces covalentes o no covalentes, como por ejemplo, enlaces de puentes de hidrógeno o enlaces anticuerpo-antígeno.

El primer receptor específico del analito contiene al menos dos lugares o puntos de enlace para el analito. El primer receptor específico del analito puede contener al menos dos lugares de enlace distintos, al menos dos lugares de enlace iguales o una combinación de lugares o puntos de enlace con el analito iguales y distintos.

En otra configuración preferida el primer receptor es un receptor oligomérico o multimérico. “Oligomérico” o “multimérico” en el sentido de la presente invención significa que el primer receptor contiene varios puntos de enlace para los analitos, preferiblemente al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 100 hasta 50, hasta 20, hasta 10 o hasta 5 lugares de enlace. “Oligomérico” o “multimérico” en el sentido de la presente invención incluye también que el primer receptor puede ser un oligómero o un multímero de subunidades o componentes, de manera que cada subunidad puede tener respectivamente ninguno, uno o varios lugares o puntos de enlace. “Oligomérico” o “multimérico” engloba también “oligovalente” o “multivalente”.

En otra configuración preferida el primer receptor se prepara en forma de precursores del receptor. Preferiblemente se preparan al menos dos precursores del receptor. Preferiblemente los precursores del receptor se asocian unos con otros para configurar el primer receptor. Los precursores del receptor se pueden crear de manera que durante la etapa o fase (a) del método conforme a la invención se puedan asociar o bien unir unos con otros para formar el primer receptor. También se pueden crear de manera que antes de la etapa o fase (a) del método conforme a la invención se puedan asociar o bien unir unos con otros. Se pueden crear dos precursores del receptor como mínimo de manera que o bien uno de los precursores del receptor engloba todos los puntos de unión para el analito, o bien de manera que ambos precursores del receptor incluyen al menos un lugar o punto de unión para el analito.

Al menos dos precursores del receptor se pueden asociar o unir uno con otro mediante un enlace o unión química, de forma que el enlace pueda ser covalente o no covalente. Para la asociación o el enlace se puede emplear cualquier sistema de enlace conocido por el experto. Se prefieren los sistemas de enlace X/anti X aquí descritos como, por ejemplo, el sistema de avidina/estreptavidina-biotina. Uno de los dos precursores del receptor puede contener un grupo biotina y el otro precursor del receptor contiene un grupo de avidina o estreptavidina. Por ejemplo, una molécula biotinilada, por ejemplo, un péptido, que tiene al menos un lugar de enlace para el analito, puede formar un primer receptor por medio del enlace o la asociación de una microesfera revestida con avidina o estreptavidina, que incluya al menos dos puntos de enlace para los analitos. Asimismo el lecho puede ser biotinilado y la molécula, que al menos tiene un grupo de enlace, se puede acoplar con avidina o estreptavidina.

El primer receptor puede incluir también una microesfera, que tenga una disposición de al menos dos lugares de enlace para los analitos. Es preferible que el primer receptor incluya una microesfera, que incluya al menos 10, al menos 50, al menos 100 lugares o puntos de enlace.

En otra configuración preferida del método conforme a la invención el primer receptor tiene un antígeno, que al menos contiene dos epítopos como lugares de enlace para los analitos. En esta configuración el analito es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo de la clase G, M, A, D o/y E, a ser posible un anticuerpo de la clase G.

El antígeno conforme a la invención puede ser un antígeno oligomérico o multimérico. Al menos dos epítopos pueden ser iguales o distintos. EL antígeno puede incluir al menos 2 epítopos distintos, al menos 2 epítopos iguales o bien una combinación de epítopos iguales y distintos. El antígeno puede incluir un epítopo repetitivo. El antígeno puede contener varios epítopos, preferiblemente al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 50 epítopos. El antígeno puede contener hasta 100, hasta 50, hasta 20, hasta 10 o hasta 5 epítopos.

El antígeno conforme a la invención puede presentar cualquier epítopo con distintas propiedades estructurales y composiciones. El antígeno puede incluir un microorganismo, una célula, una organela celular, un compartimento celular o un lisado o una preparación de ellos, por ejemplo, una preparación de la membrana. El antígeno puede ser un antígeno aislado de una fuente natural o bien se pueden fabricar por la expresión recombinante en organismos procarióticos o/y eucarióticos o/y por síntesis química. Si se diera el caso la oligomerización o bien

multimerización del antígeno se puede producir por la agregación natural o por el acoplamiento covalente o de adsorción.

En otra configuración preferida el segundo receptor específico del analito incluye un anticuerpo. Se prefieren especialmente los anticuerpos con propiedades similares al factor reumático, que pueden enlazarse preferiblemente a inmunoglobulinas agregadas o bien oligomerizadas, pero no a inmunoglobulinas singulares.

Asimismo el segundo receptor incluye preferiblemente un anticuerpo con afinidad baja para la unión del analito. Por afinidad de un anticuerpo conforme a la invención se entiende la intensidad de todas las interacciones no covalentes entre cada lugar de enlace-antígeno sobre un anticuerpo y el propio epítopo. Los anticuerpos con afinidad baja se unen débilmente y se disocian rápidamente mientras que los anticuerpos con afinidad alta se unen más fuertemente y se mantienen unidos.

La afinidad en un lugar de enlace no siempre refleja la intensidad real de una interacción antígeno-anticuerpo, como por ejemplo, entre los antígenos conforme a la invención como primeros receptores con al menos dos epítopos, a los cuales se han unido moléculas de analito, por ejemplo, anticuerpos específicos del antígeno, y por ejemplo anticuerpos con varios lugares de enlace como segundos receptores. La interacción del antígeno y un lugar o punto de enlace con el antígeno de un anticuerpo en un punto aumenta la probabilidad de reacción en un segundo lugar de enlace con el antígeno de este mismo anticuerpo, de manera que se crea una reticulación del compañero de la reacción. La intensidad de dichas interacciones entre anticuerpo multivalente y antígeno se conoce como avididad. Por lo tanto una elevada avididad compensa una baja afinidad como la de la inmunoglobulina IgM pentamérica.

El segundo receptor es un anticuerpo que al menos incluye dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco y en particular 10 o más parátopos.

En la presente invención el segundo receptor incluye mayoritariamente un anticuerpo con baja afinidad y elevada avididad para los analitos, por ejemplo, un anticuerpo de antígeno específico, que incluye al menos dos, al menos tres, al menos cinco y especialmente 10 o más paratopo. Un segundo receptor todavía más preferido es un anticuerpo de antígeno específico de la clase de inmunoglobulinas IgM o bien de las inmunoglobulinas IgG reticuladas entre ellas.

El preferido es el anticuerpo <h-agg.IgG>IgM.

Preferiblemente los anticuerpos poco afines conforme a la invención presentan un coeficiente de afinidad superior a 10^{-8}M, preferiblemente mayor a 10^{-7}M, en especial mayor a 10^{-6}M.

El anticuerpo poco afín conforme a la invención como segundo receptor reconoce al anticuerpo de antígeno específico, que en una disposición o/y como agregado está unido al primer receptor, por ejemplo, en una densidad suficiente. Las moléculas de analito enlazadas al primer receptor de forma no específica que están distribuidas de forma no uniforme o homogénea no son detectadas o bien lo son de forma insignificante. Por lo tanto dicho segundo receptor específico del analito es capaz de enlazarse de forma selectiva a un primer receptor con al menos dos moléculas de analito.

Los anticuerpos de clase IgM tienen las propiedades de la clase global de anticuerpos reumatoides, es decir se unen preferiblemente a los anticuerpos de la clase IgG específicos del antígeno, ya que solamente detectan o reconocen los anticuerpos de la clase de inmunoglobulinas IgG específicos del antígeno empaquetados de forma suficientemente hermética en el antígeno multimérico del inmunoanálisis. Las inmunoglobulinas G libres que no forman complejos, que no son específicas para el antígeno, no son detectadas o bien lo son de manera insignificante.

De este modo tiene lugar, por ejemplo, la detección de IgG específica del antígeno en presencia de las inmunoglobulinas de otras clases con la misma especificidad del antígeno a la que existe en presencia de IgG no específica sin pérdida de sensibilidad importante para el ensayo. El empleo del segundo receptor conforme a la invención consigue una elevada discriminación entre la inmunoglobulina G enlazada de forma específica al antígeno y la IgG libre, no específica del antígeno. Además el segundo receptor conforme a la invención detecta preferiblemente las moléculas de inmunoglobulina localizadas y enlazadas de forma específica al antígeno conforme a la invención, que pueden ser oligomerizadas pero no o bien solo mínimamente las inmunoglobulinas específicas del antígeno libres, que no forman complejos.

Por lo tanto se garantiza la detección de inmunoglobulinas de clase G específicas del antígeno en una muestra en presencia de moléculas IgG en formato de una sola etapa no específicas del antígeno, que existen en exceso y de forma natural.

Por “proceso de una etapa” se entiende que la reacción del analito se puede realizar con los reactantes conforme a la invención en una preparación o lote de reacción, en particular sin que los componentes del lote deban pasar por una o varias etapas de lavado.

"Proceso de una etapa" o "reacción en un lote de reacción" incluye que los reactantes se pueden añadir al mismo tiempo/uno tras otro a la mezcla de reacción (muestra), o/y que las sustancias auxiliares o aditivos (por ejemplo, tampón, sales, etc..) se pueden añadir al mismo tiempo/uno tras otro.

Un "método o proceso de una sola etapa" preferido se realizará sin etapa de lavado

En otra configuración preferida se realiza en un método conforme a la invención una etapa(a) en un lote de reacción sin etapa de lavado. Es preferible llevar a cabo las etapas (a) y (b) en un lote de reacción sin fase de lavado. El método conforme a la invención permite la detección de anticuerpos específicos del antígeno de la clase de inmunoglobulinas G en un formato de una sola etapa. Estas detecciones de anticuerpos son de gran importancia en el diagnóstico in vitro de enfermedades infecciosas así como de enfermedades autoinmunológicas.

En otras formas de ejecución el método conforme a la invención puede incluir una etapa de lavado.

En una configuración mayoritariamente preferida el primer receptor en un método conforme a la invención es un antígeno conforme a la invención, el segundo receptor es un anticuerpo similar a un factor reumático, en particular una inmunoglobulina de clase M, y el analito es una inmunoglobulina G específica del antígeno. Así es posible la unión de varias inmunoglobulinas G específicas a los elementos enlazados al antígeno, lo que puede dar lugar a una oligomerización de las moléculas IgG, es decir dos o más IgGs se pueden encontrar próximas y enlazarse para el receptor similar al factor reumático.

En otra configuración preferida el método conforme a la invención es un método diagnóstico, en particular para la detección de anticuerpos en muestras biológicas, en especial muestras clínicas. En un método diagnóstico conforme a la invención se pueden detectar anticuerpos contra un patógeno, por ejemplo, un virus o un microorganismo, contra un antígeno tumoral o/y autoanticuerpo. En particular se pueden detectar anticuerpos contra virus como la rubeola, CMV, HAV, HBV, HCV.

En un método conforme a la invención se pueden emplear también fragmentos de anticuerpos como receptores. La fragmentación de los anticuerpos es conocida por el experto y se lleva a cabo según técnicas convencionales. Ejemplos de fragmentos fabricados de forma recombinante y/o escindida proteolíticamente contienen Fab, F(ab')2, Fab', Fv y anticuerpos de un solo ramal (scFv), que tienen unos dominios V(L) y/o V(H) con un enlazador peptídico. Los scFv pueden estar unidos mediante un enlace covalente o no covalente, de manera que se forme un anticuerpo con dos o más lugares de enlace. El anticuerpo conforme a la invención puede ser un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico o humanizado, que se puede fabricar de forma recombinante. Es preferible que el segundo receptor sea un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo conforme a la invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal en particular de la clase IgM con la característica de una afinidad baja y una elevada avididad por las IgG, especialmente las IgG humanas. Este anticuerpo puede mediante una unión de varios puntos garantizar la detección de la IgG humana en un estado acomplejado por medio de una elevada avididad.

Uno de ambos receptores está unido a una fase sólida conforme a la invención o bien es capaz de unirse a una fase sólida, y el otro de los dos receptores lleva un grupo que emite una señal o bien es capaz de unirse a un grupo que emite señal. En una configuración preferida el primer receptor está unido a la fase sólida o es capaz de unirse a la fase sólida, y el segundo receptor lleva el grupo que emite señales o es capaz de unirse al grupo que emite señales. En otra configuración preferida el segundo receptor está enlazado a la fase sólida o es capaz de unirse a la fase sólida, y el primer receptor lleva el grupo que emite una señal o es capaz de unirse al grupo que emite una señal.

Como grupos que emiten señales se pueden emplear todos los grupos que emiten señales indicados por el experto. Se prefiere un grupo directamente detectable, por ejemplo un grupo químicamente luminiscente, fluorescente o radioactivo o bien una partícula de oro, látex o metálica. La detección de los grupos que emiten señales puede ser realizada por el experto de forma conocida.

El primer o segundo receptor capaz de enlazarse es preferiblemente soluble y lleva preferiblemente una marca, que sirve para unirse al receptor. Se prefiere que la marca o el etiquetado sea el partner de un sistema de unión X/anti-X, por ejemplo, un partner de una combinación a elegir entre biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/antibiotina, hapteno/anti-hapteno, fragmento Fc de un anticuerpo y un anticuerpo contra este fragmento Fc, un anti-anticuerpo o hidrato de carbono y lectina. El otro partner de la reacción del sistema de unión está unido al soporte o al grupo que emite la señal. El enlace del partner del sistema de enlace puede llevarse a cabo según los métodos convencionales, conocidos por el experto. Aquí es tan adecuado un enlace covalente como un enlace de adsorción.

En otra configuración la marca o el etiquetado es un grupo emisor de una señal como el aquí descrito. Se emplea preferiblemente como marca un grupo directamente detectable. Los métodos para el marcaje del receptor son conocidos a nivel técnico. La detección de la marca se realiza de forma conocida directamente midiendo el grupo emisor de la señal.

La detección de la marca o etiquetado puede realizarse de forma indirecta. Con ello otro partner de unión, que propiamente está acoplado a un grupo emisor de señales, se une de forma específica al receptor, a una marca en el receptor, al antígeno o/y a una marca en el antígeno.

Una configuración especialmente preferida del método conforme a la invención es un método para la detección de anticuerpos específicos del antígeno de la clase de inmunoglobulina G en una muestra por medio de un inmunoanálisis en forma de una sola fase, que incluye las fases:

(a) puesta en contacto de una muestra, que contiene anticuerpos de inmunoglobulina G, que son específicos para un antígeno, con un primer receptor que incluye un antígeno en forma oligomérica o multimérica y un grupo emisor de una señal, y con un segundo receptor, que se enlaza de forma selectiva a la inmunoglobulina G agregada, enlazada al antígeno y que lleva una marca, en unas condiciones en las que se forma un complejo inmunitario de antígeno, las inmunoglobulinas G enlazadas específicamente con él y el segundo receptor;

(b) puesta en contacto de la mezcla de reacción (a) con una fase sólida, que contiene un partner de enlace para el marcaje del segundo receptor, en unas condiciones en las cuales el complejo inmunitario de (a) se une a la fase sólida a través del segundo receptor;

(c) Detección del complejo enlazado de (b) a través del grupo emisor de la señal

Otra configuración especialmente preferida del método conforme a la invención es un método para la detección de anticuerpos específicos del antígeno de la clase de inmunoglobulina G en una muestra por medio de un inmunoanálisis en formato de una sola fase, que incluye las etapas:

(a) puesta en contacto de una muestra, que contiene anticuerpos de inmunoglobulina G, que son específicos para un antígeno, con un primer receptor que incluye un antígeno en forma oligomérica o multimérica, de manera que el primer receptor lleva una marca, y con un segundo receptor, que se enlaza de forma selectiva a la inmunoglobulina G agregada, enlazada al antígeno y que lleva un grupo emisor de una señal, en unas condiciones en las que se forma un complejo inmunitario de antígeno, las inmunoglobulinas G enlazadas específicamente con él y el segundo receptor;

(b) puesta en contacto de la mezcla de reacción (a) con una fase sólida, que contiene un partner de enlace para el marcaje del primer receptor, en unas condiciones en las cuales el complejo inmunitario de (a) se une a la fase sólida a través del primer receptor;

(c) Detección del complejo enlazado de (b) a través del grupo emisor de la señal

Otro objetivo conforme a la invención es un kit o estuche que es adecuado para el uso en el método conforme a la invención aquí descrito, que incluye las configuraciones o formas de ejecución preferidas.

Se prefiere un kit que incluya un primer receptor específico del analito y un segundo receptor específico del analito, de manera que uno de ambos receptores esté enlazado a una fase sólida o bien sea capaz de unirse a una fase sólida y el otro receptor lleve un grupo emisor de una señal o bien sea capaz de unirse a un grupo emisor de señales, que se caracterice por que el primer receptor específico del analito contenga al menos dos lugares o puntos de enlace para los analitos y el segundo receptor específico del analito se una a una disposición de al menos dos moléculas de analito, que estén unidas al primer receptor, y esta disposición se pueda diferenciar de una única molécula de analito y el analito sea un anticuerpo específico del antígeno.

Se prefiere especialmente un kit conforme a la invención donde el primer receptor específico del analito y el segundo receptor específico del analito se formulen para ser utilizados en un lote de reacción.

Una configuración especialmente preferida hace referencia a un kit, en el que el primer receptor está unido a la fase sólida o bien es capaz de unirse a la fase sólida y el segundo receptor lleva un grupo emisor de señales o bien es capaz de enlazarse al grupo emisor de señales.

Otra configuración asimismo preferida hace referencia a un estuche o kit, en el que el segundo receptor está enlazado a la fase sólida o bien es capaz de unirse a la fase sólida y el primer receptor lleva el grupo emisor de señales o es capaz de unirse al grupo emisor de señales.

En otra configuración el primer receptor puede disponerse en un estuche conforme a la invención incluso en forma de precursores del receptor. Los precursores del receptor se han descrito aquí en relación con el método conforme a la invención. En particular el kit puede contener una microesfera como precursor del receptor y otro precursor del receptor, por ejemplo, un péptido.

EL kit conforme a la invención puede incluir como primer receptor una microesfera que tenga al menos 10, al menos 50 o al menos 100 lugares de enlace.

Otro aspecto conforme a la invención hace referencia al uso de un receptor específico del analito, que contenga al menos dos lugares de enlace para los analitos, en un método para la determinación de un analito en una muestra, que aquí se describe. Se prefiere que este método sea el método diagnóstico aquí descrito.

La invención se aclara con ayuda de los ejemplos siguientes. Cada uno de los ejemplos contiene datos y datos comparativos conforme a la invención, que se han obtenido con el método de tecnología actual.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de la inmunoglobulina G específica anti-rubeola en suero humano según el método conforme a la invención y comparación de la sensibilidad del método conforme a la invención con un inmunoanálisis de la técnica en un formato de prueba indirecto con fase de lavado.

1.1 Método conforme a la invención

Se ha realizado una detección inmunológica de IgG antirubeola en suero nativo con un Elecsys®2010-Analyzer (Roche Diagnostics GmbH). Las mediciones se efectuaban utilizando un anticuerpo conforme a la invención como anticuerpo de captura. El conjugado de biotina de este anticuerpo se inmovilizaba en la superficie de la microesfera magnética revestida de estreptavidina y se enlazaba a la IgG antirubeola unida a una partícula tipo rubeola multimérica (RLP) de una muestra. El complejo se detectaba a través de un anticuerpo monoclonal rutenilado en la banda RLP.

La detección de la señal en el Elecsys®2010 se basaba en electroquimioluminiscencia.

En presencia de un inmunoglobulina-analito específico se enlazaba el complejo cromógeno de rutenio a la fase sólida y emitía luz a 620 nm tras irradiar un electrodo de platino. La señal luminosa se indica en unidades arbitrarias. La medición se efectuaba con muestras positivas anti-rubeola-IgG de un panel con valoración mixta y dos paneles de seroconversión.

1.2 Estado de la técnica

Un inmunoanálisis de dos etapas (Cobas Core, Rubella IgG recomb II), de la técnica actual se llevaba a cabo para efectuar una comparación.

Paneles con valoración mixta

	Inmunoanálisis de una sola etapa conforme a la invención coi<1 neg coi≥1 pos		Inmunoanálisis de dos etapas <10 U/ml neg ≥10 IU/ml pos
Límite	3500 Recuentos		10 IU/ml
Muestra	Recuentos	COI	IU/ml
PTR 201-1	3867	1.1	20.8
PTR 201-2	73943	21.1	144.8
PTR 201-3	626833	179.1	134.8
PTR 201-4	434690	124.2	300
PTR 201-5	2268	0.65	0.4
PTR 201-6	5371	1.53	19.6
PTR 201-7	185186	52.9	15.4
PTR 201-8	9367	2.68	26.4
PTR 201-9	174982	50.0	129.1
PTR 201-10	134451	38.4	84.5
PTR 201-11	71459	20.4	56
PTR 201-12	582819	166.5	300
PTR 20113	582257	166.4	109.1
PTR 201-14	31982	9.1	22.2
PTR 201-15	645934	184.6	300
PTR 201-16	2250	0.64	1.2
PTR 201-17	36001	10.3	64.9
PTR 201-18	12711	3.6	16.5
PTR 201-19	141224	40.3	12.1
PTR 201-20	350990	100.3	155.3
PTR 201-21	57148	16.3	91.1
PTR 201-22	5030	1.4	28.7
PTR 201-23	30672	8.8	66.6
PTR 201-24	27950	8.0	8.3
PTR 201-25	194719	55.6	142.5

Paneles de seroconversión

		Inmunoanálisis de una sola etapa conforme a la invención coi<1 neg coi≥1 pos		Inmunoanálisis de dos etapas <10 U/ml neg ≥ 10 IU/ml pos
Muestra	Límite	3500 recuentos		10 IU/ml
	Día	Recuentos	COI	IU/ml
RP 001-001	0	1767	0.50	0.8
RP 001-002	2	1821	0.52	0.7
RP 001-003	7	1833	0.52	0.4
RP 001-004	9	1732	0.49	0.6
RP 001-005	14	1880	0.47	0.5
RP 001-006	17	2592	0.74	0.5
RP 001-007	21	30305	8.66	3
RP 001-008	24	76058	21.73	5.7
RP 001-009	28	203264	58.08	13.8
RP 001-010	31	293043	83.73	23.7
RP 001-011	35	262759	75.07	23.8
RP 001-012	38	194288	55.51	16.3
RP 001-013	42	181673	51.91	16.3
RP 001-014	45	160403	45.83	14.4
RP 001-015	50	139584	39.88	18.1
RP 011-001	0	1902	0.54	0
RP 011-002	3	1766	0.50	0.2
RP 011-003	9	1753	0.50	0
RP 011-004	12	1720	0.49	0.1
RP 011-005	18	3928	1.12	0.4
RP 011-006	19	92242	26.35	7.7
RP 011-007	24	366359	104.57	28.8
RP 011-008	27	408392	116.88	37.4
RP 011-009	31	405799	115.94	33.9
RP 011-010	36	417007	119.14	39.1
RP 011-011	39	414958	118.55	38
RP 011-012	43	385813	110.23	44.4
RP011-013	46	398357	113.82	52.8

En los paneles de seroconversión se podrían detectar valores cuantitativos positivos en un método de una sola etapa el día 21 o el 18 y en un método de dos etapas el día 28 ó 24.

El formato de inmunoanálisis conforme a la invención es más sensible que el inmunoanálisis de dos etapas de la técnica actual, puesto que es posible una detección de un valor positivo en un momento previo.

Ejemplo 2: Comparación del rendimiento de un receptor de anticuerpos de IgG antihumano con propiedades conforme a la invención (afinidad baja, enlace selectivo de IgG humano agregado) con un receptor de anticuerpos de IgG antihumano con propiedades de la tecnología actual (afinidad alta, enlace igualmente intenso de IgG agregada y no agregada)

Calibrador principal (MC). Se han investigado sueros positivos y negativos en anticuerpos de IgG anti-rubeola con el método inmunológico conforme al ejemplo 1.

	Mab<h-IgG> IgM-Typ Afinidad baja coi<1 neg coi≥1 pos		Mab<h-IgG> IgG-Typ Afinidad alta coi<1 neg coi≥1 pos	
Muestra	6859 Recuentos		3521 Recuentos	
	Recuentos	COI	Recuentos	COI
MC10 IU/ml	2399	0.35	1483	0.42
MC2 10 IU/ml	6859	1.00	3521	1.00
MC3 50 IU/ml	35617	5.19	3385	0.96
MC4 150 IU/ml	170048	24.79	6027	1.71
MCS 300 IU/ml	334483	48.76	10946	3.11
neg. 700-1899	2349	0.34	1269	0.36
neg. 705-2814	2171	0.32	1308	0.37
pos. 1810	287386	41.90	5291	1.50
pos. 1851	55348	8.07	1666	0.47

En el presente ejemplo se ha investigado la tendencia a las perturbaciones del ensayo conforme a la invención por la IgG libre. La columna de resultados de la izquierda indica que el ensayo no se ve alterado por la IgG libre que existe siempre en una muestra de suero humano, de manera que se alcanza una sensibilidad del ensayo elevada. El anticuerpo de captura que va dirigido contra la IgG agregada, humana y presenta una afinidad baja, no se une a la IgG libre o bien solo de forma insignificante. A la fase sólida se une solamente la IgG agregada, que luego es detectada por medio de un enlace con un antígeno de rubeola multímero/multivalente ("partícula tipo rubeola") y la detección por un MAK de anti-rubeola rutenilado, como IgG específica de la antirubeola.

En la columna de la derecha en el ejemplo 2 se representan por el contrario los resultados para una prueba conforme a la tecnología actual. En la técnica el anticuerpo de captura no discrimina entre IgG agregada y no agregada, es decir libre. Como consecuencia de ello, tanto la IgG libre como la agregada están unidas a la fase sólida. Esto conduce claramente a que falle la sensibilidad del ensayo o prueba en el enlace posterior del antígeno de rubeola y la reacción de detección. La muestra MC4 presenta un valor de 24,79 para la realización de la prueba conforme a la invención, mientras que la misma muestra con el método de la tecnología actual solamente llega a un valor de 1,.71, superándose solo escasamente el índice de corte de 1.

Se ve muy claramente la diferencia en las dos últimas filas de la tabla de resultados, en particular en la última fila. El suero "pos. 1851" es claramente positivo anti-rubeola con el método de la invención (valor: 8,07) mientras que el método de la técnica actual clasifica la misma muestra como negativa, es decir falsamente negativa (valor 0,47, incluso bajo el índice de corte de 1).

La falta de sensibilidad del método de la técnica podría por tanto tener consecuencias fatales, ya que las muestras positivas son detectadas como falsos negativos.

Los resultados demuestras claramente que la utilización de un anticuerpo del receptor conforme a la invención facilita una detección más sensible de los anticuerpos anti-rubeola en comparación con los anticuerpos del receptor de la técnica.

Ejemplo 3: Detección de anticuerpos de IgG anti-rubeola en muestras de suero humanas, que contienen factor reumático.

Se han analizado muestras de suero humano que se comercializan (Bioclinical Partners), que contienen factor reumático, y se han investigado los anticuerpos de IgG anti-rubeola con el método conforme a la invención descrito en el ejemplo 1.

Un inmunoanálisis de dos etapas (Cobas Core, Rubella IgG recomb II) de la técnica se ha realizado como ensayo de comparación

	Inmunoanálisis de una sola etapa coi<1 neg coi≥1 pos		Inmunoanálisis de dos etapas <10 U/ml neg ≥10 IU/ml pos	Factor reumático
Límite	3254 Recuentos		10 IU/ml	
Muestra	Recuentos	COI	IU/ml	IU/ml
BCP 9808-114-04673	141077	43.35	103.76	24
BCP 9808-114-04674	765	0.24	3.53	353
BCP 9808-114-04675	173111	53.19	208.43	429
BCP 9808-114-04676	167319	51.41	82.80	186
BCP 9808-114-04677	153119	47.05	124.57	324
BCP 9808-114-04678	82728	25.42	42.28	189
BCP 9808-114-04679	164793	50.64	>300	400
BCP 9808-114-04680	171594	52.73	204.08	185
BCP 9808-114-04681	5696	1.75	11.18	56
BCP 9808-114-04682	64006	19.67	65.89	272
BCP 9808-114-04683	167373	51.43	146.24	56
BCP 9808-114-04684	138037	42.42	71.94	40
BCP 9808-114-04685	166660	51.21	187.39	139
BCP 9808-114-04686	79085	24.30	85.52	315

Los resultados indican claramente que el método conforme a la invención clasifica las muestras correctamente a pesar de la presencia de factor reumático.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de un analito en una muestra, que engloba las etapas:

(a) puesta en contacto de la muestra con un primer receptor específico del analito y un segundo receptor específico del analito, de manera que uno de los dos receptores está unido a una fase sólida o bien es capaz de enlazarse a una fase sólida y el otro receptor lleva un grupo que emite una señal o bien es capaz de unirse a un grupo que emite una señal, y

(b) detección de la existencia o/y la cantidad de analito mediante la determinación del grupo que emite una señal en la fase sólida,

que se caracteriza, por que el primer receptor específico del analito contiene al menos dos lugares de enlace para el analito y el segundo receptor específico del analito está unido a una disposición de al menos dos moléculas de analito, que están unidas al primer receptor, y puede distinguir esta disposición de una molécula de analito individual y el analito es un anticuerpo específico del antígeno.

2. Método conforme a la reivindicación 1, **que se caracteriza por que** el analito es un anticuerpo específico del antígeno de la clase de inmunoglobulina G.

3. Método conforme a la reivindicación 1 ó 2, **que se caracteriza por que** el primer receptor contiene al menos dos puntos de enlace distintos, al menos dos puntos o lugares de enlace iguales o una combinación de lugares de enlace distintos e iguales para los analitos, que preferiblemente el primer receptor es un receptor oligomérico o un receptor multimérico.

4. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza por que** el primer receptor incluye un antígeno, que al menos tiene dos epítopos como lugares de enlace para los analitos.

5. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, de manera que el primer receptor se dispone en forma de precursores del receptor.

6. Método conforme a la reivindicación 5, donde los precursores del receptor se crean de manera que durante o antes de la etapa (a) se pueden asociar o bien enlazar unos con otros para formar el primer receptor.

7. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza por que** el segundo receptor es un anticuerpo similar al factor reumático.

8. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza por que** el segundo receptor es un anticuerpo con al menos dos paratopos.

9. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, **que se caracteriza por que** el segundo receptor es un anticuerpo con afinidad baja y elevada avididad hasta los analitos.

10. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (a) se lleva a cabo en un lote de reacción sin etapa de lavado.

11. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que es un método diagnóstico.

12. Kit o estuche que comprende un primer receptor específico del analito y un segundo receptor específico del analito, de manera que uno de los dos receptores está unido a una fase sólida o es capaz de unirse a una fase sólida y el otro receptor lleva un grupo emisor de una señal o es capaz de unirse a un grupo emisor de una señal, **que se caracteriza por que** el primer receptor específico del analito tiene al menos dos lugares de enlace para los analitos y el segundo receptor específico del analito se une a una configuración de al menos dos moléculas de analito, que están unidas al primer receptor, y esta disposición puede diferenciarse de una molécula de analito individual y el analito es un anticuerpo específico del antígeno.

13. Kit o estuche conforme a la reivindicación 12, de manera que el primer receptor específico del analito y el segundo receptor específico del analito son formulados para ser utilizados en un lote de reacción.

14. Utilización de un receptor específico del analito, que contiene al menos dos lugares de enlace para los analitos, en un método para la determinación de un analito en una muestra conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 11.

15. Utilización conforme a la reivindicación 14 en un método diagnóstico.