

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 350**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2006 E 06847258 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1952151**

54 Título: **ELISA rápido**

30 Prioridad:

04.11.2005 GB 0522600

06.02.2006 GB 0602336

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS S.R.L.
(100.0%)
VIA FIORENTINA 1
53100 SIENA (SI), IT**

72 Inventor/es:

**BERTI, DUCCIO;
CASINI, DANIELE y
FONTANI, PAOLA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 350 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

ELISA rápido

Campo de la técnica

La presente invención pertenece al campo de los ensayos de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA)

5 Técnica anterior

El ELISA es uno de los procedimientos más usados para la detección de y cuantificación de anticuerpos, antígenos, hormonas, citocinas, péptidos sintéticos y otras moléculas (Engvall E. 1980 Methods Enzymol. 70:419-39).

10 Con mucha frecuencia, el ELISA se usa como procedimiento exclusivo no solo para detectar y cuantificar diversos ligandos, sino también para estudiar sus interacciones moleculares. De hecho, el ensayo es extremadamente popular tanto en la investigación como en la clínica debido a la capacidad de probar un gran número de muestras y porque no implica radiactividad. Al llevar a cabo el procedimiento, un ligando (normalmente en forma de un antígeno, anticuerpo o péptido) se coloca sobre la superficie de cada micropocillo en una microplaca de 96 pocillos y se mantiene ahí mediante enlaces no covalentes entre las regiones hidrofóbicas de la proteína y la superficie de plástico apolar. El área residual no recubierta de cada pocillo se bloquea después con una proteína o polímero inerte para prevenir cualquier unión inespecífica de los reactivos. A continuación, la correspondiente contramolécula se incubaba con el ligando durante un periodo de varias horas. Después, se lava el pocillo y se añade un segundo anticuerpo conjugado con enzima, específico de la contramolécula, y se incubaba durante aproximadamente 2 horas o más. Por último, se proporciona un sustrato para la enzima conjugada y la reacción se cuantifica midiendo cualquier cambio de color en el sustrato. La Figura 1 muestra las etapas en una prueba ELISA estándar para analizar los anticuerpos séricos.

20 El ELISA estándar a menudo implica velocidades de reacción lentas que requieren elevados tiempos de incubación en el intervalo de 1-3 horas. En la técnica existe la necesidad de un ELLISA de alto rendimiento que use tiempos de incubación más cortos y, por tanto, que se pueda completar en un periodo de tiempo más corto.

Divulgación de la invención

25 La velocidad de una reacción con dos o más reactantes se controla mediante dos etapas: (a) la velocidad de difusión de los reactantes (caracterizada por la $k_{dif.}$) y (b) la velocidad de la reacción química (caracterizada por la $k_{quim.}$). Cuando ambos reactantes son capaces de moverse con libertad, la reacción se denomina reacción de fase homogénea (es decir, una en la que al menos dos reactantes están en una fase fluida) y cuando un reactante está inmovilizado, la reacción se denomina reacción de fase heterogénea. Como uno de los componentes en una reacción de fase heterogénea tiene una $k_{dif.}$ de cero, la reacción tiene lugar a una velocidad menor que una reacción homogénea, en la que ambos reactantes tienen una $k_{dif.}$ elevada.

30 Todas las etapas de reacción en un ELISA estándar son reacciones de fase heterogénea, es decir un componente está en solución mientras que el otro está inmovilizado.

35 Los presentes inventores han encontrado, sorprendentemente, que cambiando una o más de las etapas en el ELISA de una reacción en fase heterogénea a una en fase homogénea se obtiene como resultado un tiempo de finalización global muchos más corto, lo que permite completar un ELISA en menos tiempo que el requerido para un ELISA conocido en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el cambio de una etapa a una reacción en fase homogénea permite la finalización en aproximadamente un 30 % del tiempo requerido para un ELISA conocido en la técnica. En otras realizaciones, el tiempo se puede reducir en aproximadamente, por ejemplo, 10 %, 20 %, 40 %, 50 % o 60 %. Además, cambiando una etapa a una fase homogénea se garantiza que cada unión de los complejos inmunitarios a los pocillos de la placa sea una unión eficaz en términos de desarrollo de señal, por tanto, el tiempo de incubación de la fase heterogénea se puede reducir espectacularmente o se usa un tiempo de incubación estándar para dar un incremento elevado de la amplificación de la señal. El procedimiento de ELISA corto confiere muchas ventajas sobre el ELISA estándar. Po ejemplo, la mayor velocidad de finalización del procedimiento de ELISA corto permite la simple y rápida detección de patógenos en un contexto clínico y, por tanto, permite entregar resultados a los pacientes y, en consecuencia, el tratamiento de los pacientes durante un periodo de tiempo más corto.

45 En algunas realizaciones del nuevo procedimiento de ELISA corto para anticuerpos, los anticuerpos séricos (analito) se mezclan con los anticuerpos marcados específicos de los anticuerpos séricos en un contenedor de reacción, por ejemplo un tubo de ensayo (fase homogénea) y se incuban durante 10 minutos o 5 minutos (Etapa 1). Después, la mezcla de productos se transfiere a un pocillo de microtitulación revestido con un antígeno y se incubaba durante 10 minutos o 10-15 minutos (etapa 2). El micropocillo se lava y se añade un reactivo de color y se desarrolla durante 30 minutos o 10 minutos (etapa 3). Una etapa de lavado final puede preceder a medir la absorbancia a una longitud de onda específica del reactivo de color. Por tanto, el analito y el marcador se mezclan previamente en una fase homogénea antes de juntarse con la pareja de unión inmovilizada para el analito (es decir, el anticuerpo sérico en este ejemplo). La Figura 2 proporciona una representación gráfica de una realización del procedimiento de ELISA corto de la presente solicitud para analizar los anticuerpos séricos como el analito. Si el analito es un antígeno, el

contenedor de la segunda reacción se reviste con un anticuerpo frente al antígeno.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un ensayo de unión para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de (i) mezclar en una fase homogénea la muestra y una primera pareja de unión al analito para formar un primer producto de mezcla y (ii) exponer el primer producto de mezcla a una segunda pareja de unión al analito. Preferentemente, la primera pareja de unión está marcada.

5

Normalmente, la segunda pareja de unión está inmovilizada de modo que la etapa (iii) se produce en la fase heterogénea. Por ejemplo, la etapa (i) se puede llevar a cabo en un primer contenedor de reacción y la etapa (ii) en un segundo contenedor de reacción en el que la segunda pareja de unión está inmovilizada sobre la superficie del segundo contenedor de reacción.

10 Por tanto, la invención proporciona un ensayo de unión para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de (i) mezclar en una fase homogénea, en un primer contenedor de reacción, la muestra y una primera pareja de unión al analito para formar un primer producto de mezcla; (ii) transferir el primer producto de mezcla a un segundo contenedor de reacción; y (iii) mezclar en el segundo contenedor de reacción el primer producto de mezcla y una segunda pareja de unión al analito. Preferentemente, la primera pareja de unión está marcada.

15 Etapas (i)

La etapa (i) del procedimiento de ELISA corto implica mezclar, en una fase homogénea, la muestra que se va a analizar con respecto a un analito y una primera pareja de unión al analito para formar un primer producto de mezcla. Esta etapa tiene lugar en un primer contenedor de reacción.

20 Una muestra puede contener, o sospecharse que contiene, uno o más analitos destinados a la detección mediante el procedimiento de ELISA corto. Incluso si no hay analito, el ensayo sigue siendo "para detectar" el analito. Por ejemplo, el ensayo se puede realizar en una muestra control negativo para confirmar la fidelidad del ensayo. Como ejemplo adicional, si el procedimiento de ELISA corto se usa para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos séricos frente a un patógeno en un paciente, el primer producto de mezcla de la etapa (i) puede ser un complejo inmunitario, en el caso de un paciente infectado, o se puede definir por la ausencia de un complejo inmunitario en un paciente no infectado.

25

La elección de la pareja de unión usada en la etapa (i) dependerá del analito. Por ejemplo, cuando el analito es un anticuerpo sérico, la primera pareja de unión puede ser un anticuerpo marcado específicamente dirigido al anticuerpo sérico, por ejemplo a su cadena pesada, y la segunda pareja de unión puede ser un polipéptido que contiene un epítipo reconocido por el anticuerpo sérico. En un segundo ejemplo, el analito puede ser un polipéptido que contiene un primer epítipo reconocido por la primera pareja de unión, un anticuerpo marcado, y la segunda pareja de unión puede ser un anticuerpo que reconoce un segundo epítipo en el polipéptido. En ciertas realizaciones, la segunda pareja de unión puede reconocer un epítipo escondido o críptico sobre la primera pareja de unión. Se cree que tal epítipo solo se presenta después de que se ha producido un cambio estructural en la primera pareja de unión. Por ejemplo, se produce un cambio como resultado de la unión de la primera pareja de unión al analito. Será evidente para el experto en la técnica que la pareja de unión variará en función de la elección del analito.

30

35

La mezcla requerida en la etapa (i) está en la fase homogénea y está destinada a garantizar una composición uniforme a lo largo de la solución. Esto se puede conseguir por cualquier medio, incluidos, entre otros, agitación, agitación mecánica o manual, o pipeteado repetido.

40 Como en los procedimientos de ELISA conocidos, la reacción de unión se puede detectar por varios medios. Normalmente, la primera pareja de unión se puede marcar por cualquier medio conocido en la técnica, en particular los medios usados en el ELISA estándar. La primera pareja de unión se puede marcar mediante conjugación de la pareja de unión con un marcador directo, por ejemplo una partícula coloreada, un reactivo electroquímicamente activo, un reactivo redox, un isótopo radiactivo, un marcador fluorescente o un marcador luminiscente. La primera pareja de unión también se puede marcar mediante conjugación de la pareja de unión con un marcador indirecto, por ejemplo una enzima.

45

Cuando la primera pareja de unión está conjugada con un marcador indirecto, éste puede ser una enzima. La enzima es capaz, preferentemente, de causar un cambio detectable en un reactante, por ejemplo de modificar un reactante de modo que produzca un cambio de color. Por ejemplo, la enzima puede ser una peroxidasa, particularmente peroxidasa de rábano, que se puede usar con un sustrato adecuado para dar un producto de reacción coloreado, por ejemplo 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. El marcador indirecto puede ser también una molécula con una afinidad elevada por otra molécula, por ejemplo avidina. En este caso, la exposición de la primera pareja de unión a una molécula de biotina marcada permitiría su detección.

50

Cuando la primera pareja de unión está conjugada con un marcador directo, el marcador directo es una entidad, que es detectable en su estado natural. Por ejemplo, cuando el marcador directo es una partícula coloreada, tal como soles en pigmento, soles metálicos (p. ej., oro) y partículas de látex coloreadas, esto puede ser visible a simple vista o convertirse en visible con la ayuda de un filtro óptico. Cuando el marcador directo es un marcador fluorescente,

55

éste se puede someter a estimulación aplicada, por ejemplo luz UV, para estimular la fluorescencia.

5 La segunda pareja de unión normalmente no está marcada. No obstante, la segunda pareja de unión puede marcarse usando, por ejemplo, un procedimiento tal como la detección FRET. En este caso, la primera pareja de unión se marcará con un pigmento donante o aceptor, mientras que la segunda pareja de unión se marcará con la otra. Solo cuando las dos parejas de unión, primera y segunda, se ponen en contacto estrecho, a través de su correspondiente unión del analito, se podrá observar la emisión de fotones.

Los anticuerpos usados en el ensayo pueden ser policlonales o monoclonales y se pueden producir por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

10 Los anticuerpos para usar para detección pueden ser de cualquier isotipo (p. ej., IgA, IgG, IgM, es decir una cadena pesada α , γ o μ). Los anticuerpos pueden tener una cadena ligera κ o λ . Dentro del isotipo IgG, los anticuerpos pueden ser de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones del procedimiento de ELISA corto en el que la primera pareja de unión es un anticuerpo conjugado, el anticuerpo es para usar a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1:100 a 1:12.000, por ejemplo de aproximadamente 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:1.000, 1:1.500, 1:2.000, 1:3.000, 1:4.000, 1:5.000, 1:6.000, 1:7.000, 1:8.000, 1:9.000, 1:10.000, 1:12.000.

15 Los contenedores de reacción adecuados para usar en la invención pueden contener un volumen de líquido e incluyen, entre otros, tubos de ensayo, tubos eppendorf, pocillos en placas de microtitulación y bandejas de mezclado.

20 En la etapa (i) del procedimiento ELISA corto se pretende incubar durante un periodo de tiempo finito en el intervalo de aproximadamente 1 a 300 minutos, por ejemplo de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 o 300. Más preferentemente la etapa (i) se incuba durante aproximadamente 10 minutos o aproximadamente 5 minutos.

La etapa (i) puede incubarse a cualquier temperatura en el intervalo de aproximadamente 0 – 99 °C, por ejemplo de aproximadamente 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 50, 60, 80 o 100 ° C. Más preferentemente la etapa (i) se incuba a aproximadamente 37 °C.

Etapa (ii)

25 La etapa (ii) del procedimiento ELISA corto implica exponer el primer producto de mezcla a una segunda pareja de unión al analito. Esta etapa puede tener lugar en el mismo contenedor de reacción o puede implicar la transferencia del primer producto de mezcla a un segundo contenedor de reacción.

30 Si la etapa (ii) del ELISA corto tiene lugar en el mismo vaso de reacción, la exposición del primer producto de mezcla a la segunda pareja de unión se puede facilitar por la adición de un portaobjetos, perlas rodor, revestido con la segunda pareja de unión, al primer vaso de unión.

Si la etapa (ii) del ELISA corto implica la transferencia del primer producto de mezcla a un segundo contenedor de reacción, después esta transferencia se puede conseguir por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos, entre otros, pipeteado, vertido y transferencia a lo largo de microcanales entre pocillos en un circuito de microfluidos.

35 También dentro de la invención hay un primer contenedor de reacción separado del segundo contenedor de reacción por una división extraíble. La división evita que el producto de mezcla de la etapa (i) tenga acceso a la segunda pareja de unión hasta la etapa (ii). En tal caso, la transferencia del primer producto de mezcla al segundo contenedor de reacción implica la eliminación de la división. Por ejemplo, el contenedor de mezclado puede ser un tubo eppendorf que contiene un tapón de cera que separa los reactivos usados en la etapa (i) y la etapa (iii) de la reacción. La transferencia del primer producto de mezcla entre el primer contenedor de reacción y el segundo en este caso se alcanza aumentando la temperatura del tubo lo suficiente para fundir el tapón de cera (Figura 26).

45 Usando el procedimiento ELISA estándar, todas las reacciones se producen en la fase heterogénea. En el procedimiento ELISA corto de la presente invención, la mezcla de la primera pareja de unión y la muestra que contiene el analito son para que tenga lugar en una reacción de fase homogénea. No obstante, la mezcla del primer producto de mezcla con la segunda pareja de unión (la segunda reacción de mezcla) se puede producir en una reacción de fase homogénea o, preferentemente, de fase heterogénea.

50 Para que la segunda reacción de mezcla se produzca en una fase heterogénea, se prevé que la segunda pareja de unión esté inmovilizada. En algunas realizaciones, la segunda pareja de unión está inmovilizada sobre un sustrato. El sustrato puede ser cualquier superficie o soporte sobre el cual se puede inmovilizar la segunda pareja de unión, incluido uno o más de un soporte sólido (p. ej., cristal, tal como un portaobjetos de cristal o una placa recubierta, sílice, plástico o plástico derivatizado, metal paramagnético o no magnético), un soporte semisólido (p. ej., un material polimérico, un gel, agarosa u otra matriz) y/o un soporte poroso (p. ej., un filtro, una membrana de nylon o nitrocelulosa u otra membrana). En algunas realizaciones, los polímeros sintéticos se pueden usar como sustrato, incluidos, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, poliglicidilmetacrilato, poliestirenos aminados o carboxilados, poliacrilamidas, poliamidas, polivinilcloruros y similares. En realizaciones preferidas, el sustrato comprende una placa de inmunoensayo de microtitulación u otra superficie adecuadas para usar en un ELISA.

La superficie del sustrato o soporte puede ser plana, curva, esférica, de tipo barra, puntiaguda, una oblea o de tipo oblea, o cualquier forma bidimensional o tridimensional adecuada sobre la cual se puede inmovilizar la segunda pareja de unión, incluidos, por ejemplo, películas, perlas o microperlas, tubos o microtubos, pocillos o pocillos de placas de microtitulación, microfibras, capilares, una placa de cultivo tisular, en clavija, alfiler, cabezas de alfiler, tiras, chips preparados mediante fotolitografía etc. En algunas realizaciones, la superficie es analizable por UV, por ejemplo transparente a UV.

La inmovilización se puede conseguir de cualquiera de los modos, conocidos en la técnica, descritos en el presente documento y/o como se puede desarrollar. Por ejemplo, la inmovilización puede implicar cualquier técnica que tenga como resultado la asociación directa y/o indirecta de un analito (y su correspondiente antagonista) con el sustrato, incluido cualquier medio que prevenga o dificulte al menos temporalmente su liberación a una solución u otro medio circundante. El medio puede ser mediante enlace covalente, enlace no covalente, enlace iónico, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces hidrófobos o una combinación de los mismos. Por ejemplo, la inmovilización puede estar mediada por reacción química en la que el sustrato contiene un grupo químico activo que forma un enlace covalente con la segunda pareja de unión. Por ejemplo, una superficie de soporte modificada con aldehído puede reaccionar con grupos amino en receptores proteicos; o una superficie de soporte modificada con amino puede reaccionar con restos de hidratos de carbono activados por oxidación en receptores glicoproteicos; una superficie de soporte que contiene grupos hidroxilo puede reaccionar con reactivos químicos bifuncionales, tales como carbonato de N,N-disuccinimidilo (DSC) o cloroformiato de N-hidroxisuccinimidilo, para activar los grupos hidroxilo, y reaccionar con receptores que contienen amino. En algunas realizaciones, la superficie de soporte del sustrato puede comprender poliestirenos animados o carboxilados; poliacrilamidas; poliaminas; polivinilcloruros, y similares. En otras realizaciones más, la inmovilización puede usar uno o más pares de unión para unirse o, de otro modo, fijar un receptor a un sustrato, incluidos, entre otros, un par de unión antígeno-anticuerpo, sistemas hapteno-antihapteno, un par de unión avidina-biotina; un par de unión estreptavidina-biotina, un par de unión ácido fólico-folato; moléculas de acoplamiento fotoactivadas y/u oligonucleótidos bicatenarios que se unen de forma selectiva a las proteínas, por ejemplo factores de transcripción.

La segunda pareja de unión puede estar inmovilizada sobre la superficie del segundo contenedor de reacción o a perlas dentro del segundo contenedor de reacción o estar añadida al primer contenedor de reacción (p. ej., perlas de poliestireno superparamagnético- Dynabeads M-450). Una vez que se ha conseguido la unión del primer producto de mezcla a la segunda pareja de unión, los reactantes sin unir se pueden lavar del segundo producto de mezcla inmovilizado. A continuación es posible detectar el segundo producto de mezcla.

La segunda reacción de mezcla también se puede producir en la fase homogénea. Por ejemplo, la unión de la segunda pareja de unión al primer producto de mezcla puede inducir una precipitación del segundo producto de mezcla. Dicha precipitación permitiría la separación del segundo producto de mezcla de los reactantes sin unir. Dicha separación se podría facilitar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluidos, entre otros, centrifugación o filtración.

Si la reacción de la etapa (ii) se lleva a cabo en una fase homogénea, se pretende que la mezcla sea una composición uniforme en toda la solución. Si la reacción de la etapa (ii) se lleva a cabo en una fase heterogénea con la segunda pareja de unión inmovilizada sobre la superficie del segundo contenedor de reacción, no es posible alcanzar una composición uniforme. En este caso, la mezcla puede incluir agitación del segundo contenedor de reacción para aumentar la probabilidad de que los reactantes entren en contacto entre sí.

En la etapa (i) del procedimiento ELISA corto se pretende incubar durante un periodo de tiempo finito en el intervalo de aproximadamente 1 a 300 minutos, por ejemplo de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 o 300. Más preferentemente la etapa (i) se incuba durante aproximadamente 10 minutos o aproximadamente 10 - 15 minutos.

La etapa (ii) puede incubarse a cualquier temperatura en el intervalo de aproximadamente 0 – 99 °C, es decir de aproximadamente , 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 50, 60, 80 o 100° C. Más preferentemente la etapa (ii) se incuba a aproximadamente 37 °C.

Etapa (iii)

El procedimiento puede incluir una etapa (iii) adicional. La etapa (iii) del procedimiento ELISA corto implica la detección opcional de un segundo producto de mezcla que comprende la primera pareja de unión, el analito y la segunda pareja de unión.

En una realización preferida, la detección del segundo producto de mezcla se consigue mediante la detección de un cambio de color en un reactivo mezclado con el segundo producto de mezcla.

En la reacción de la etapa (iii) del procedimiento ELISA corto se pretende incubar durante un periodo de tiempo finito en el intervalo de aproximadamente 1 a 300 minutos, por ejemplo de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 240 o 300. Más preferentemente, la etapa (iii) se incuba durante aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 10 minutos.

La reacción de la etapa (iii) puede incubarse a cualquier temperatura en el intervalo de aproximadamente 0 – 99 °C, por ejemplo de aproximadamente , 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 50, 60, 80 o 100 ° C. Más preferentemente la etapa (iii) se incuba a aproximadamente 37 °C.

5 Cuando la etapa (iii) implica la detección de un cambio de color a p-NNP, la concentración de p-NPP puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 15,0 o 20 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de p-NNP es de aproximadamente 3,0 mg/ml

10 Se pretende que el procedimiento ELISA corto dure un periodo de tiempo finito en el intervalo de aproximadamente 1 a 300 minutos, por ejemplo de aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 100, 120, 150, 180, 240 o 300. Más preferentemente, el procedimiento ELISA corto dura menos de una hora.

Muestras y analitos

15 Una muestra para usar en la invención puede hacer referencia a un material de muestra usado para un ensayo, reacción, ciclo, ensayo y/o experimento dado. Por ejemplo, una muestra puede comprender un alícuota del material de muestra recogido, hasta e incluida toda la muestra. Las muestras pueden ser muestras brutas o muestras procesadas, por ejemplo obtenidas tras varias etapas de procesamiento o preparación llevadas a cabo en la muestra original. Por ejemplo, se pueden aplicar varios procedimientos de separación celular, por ejemplo clasificación de células activadas magnéticamente, para separar o enriquecer analitos de interés en un fluido biológico, tal como sangre. Una muestra puede también comprender una dilución de una muestra, por ejemplo suero diluido o diluciones de otras mezclas complejas y/o ricas en proteínas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra se puede diluir en serie para proporcionar una serie de muestras diluidas en serie para análisis. Como se usa en el presente documento, los términos ensayo, reacción, ciclo, ensayo y/o experimento se pueden usar de forma intercambiable. Realizaciones preferidas de la presente invención se pueden practicar usando pequeñas cantidades de partida de analitos, dando resultados cuantificables.

25 Las muestras para usar en la etapa (i) se pueden obtener de una fuente *in vivo* o *in vitro*. Ejemplos de fuentes *in vivo* incluyen extractos de sangre, suero, extractos celulares o tejido homogeneizado tomados de un paciente. Ejemplos de fuentes *in vitro* incluyen extractos de cultivos tisulares o extractos de medios de crecimiento de diversos cultivos celulares, incluidas líneas de células animales, hibridomas, levaduras y bacterias.

30 Los analitos para usar en la invención incluyen, entre otros, por ejemplo, moléculas pequeñas tales como moléculas orgánicas pequeñas naturales o sintéticas de hasta 2.000 Da, preferentemente de 800 Da o menos; peptidomiméticos; moléculas inorgánicas; fármacos o productos farmacéuticos; citocinas; toxinas; estructuras macromoleculares; metabolitos; sustratos naturales o modificados; esteroides; enzimas; hormonas; ácidos nucleicos; proteínas; receptores; péptidos; glicoproteínas; dominios o motivos; aminoácidos; lectinas; lípidos; hidratos de carbono; azúcares; polímeros; tejidos; células; componentes de superficie celular; componentes celulares; orgánulos subcelulares; microbios completos o partes (tales como patógenos, parásitos, virus, bacterias, hongos y similares) de cualquier organismo conocido, más particularmente cualquier virus, bacteria u hongo conocido, en particular VIH, VHC, VHB, gripe, rinovirus, picornavirus, poliovirus, E. coli, Helicobacter sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Chlamydia sp., Enterococcus sp., Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Bacillus sp., Neisseria sp, Candida sp., Cryptococcus sp., Aspergillus sp; agentes de guerra biológica y química; y/o anticuerpos, por ejemplo frente a una o más de las moléculas descritas anteriormente, incluidas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE; miméticos estructurales o funcionales de los anteriores y cualquier combinación de los mismos.

40 Normalmente, un analito como se usa en la invención estará en una concentración de aproximadamente 0,1 ng/ml a 10 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,1 ng/ml, 1,0 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1,0 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml, 1,0 mg/ml o 10 mg/ml.

General

45 El término “que comprende” abarca “que incluye” además de “que consiste en”, *por ejemplo* una composición “que comprende” X puede consistir en sólo X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo* X + Y.

El término “aproximadamente” en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa las etapas implicadas en un ELISA estándar.

50 La Figura 2 representa las etapas implicadas en una realización del procedimiento de ELISA corto.

La Figura 3 muestra un gráfico de la recuperación (%) frente a la dilución recíproca en suero.

La Figura 4 muestra un gráfico de la A_{405} nm frente a la dilución recíproca en suero.

La Figura 5 muestra un gráfico de la recuperación frente a la recuperación nominal (%) a diferentes concentraciones

recíprocas del anticuerpo conjugado.

La Figura 6 muestra una comparación de la recuperación (%) frente al tiempo de preincubación de la reacción de fase homogénea.

5 La Figura 7 muestra un gráfico de la A_{405} nm frente a UA/ml con una regresión logística para un tiempo de incubación del complejo inmune de 1 hora a 37 °C.

La Figura 8 muestra un gráfico de A_{405} nm frente a UA/ml con una línea de mejor ajuste.

La Figura 9 muestra un gráfico de la A_{405} nm frente a UA/ml con una regresión lineal para un tiempo de incubación del complejo inmune de 10 minutos a 37 °C.

10 La Figura 10 muestra gráficos de A_{405} nm frente a UA/ml con diferentes tiempos de incubación del complejo inmune.

La Figura 11 muestra una representación de gráfico de barras de la suma de desviaciones desde una función de calibración lineal frente a tiempos de incubación del complejo inmune.

La Figura 12 muestra una representación de gráfico de barras de la suma de desviaciones desde una función de calibración lineal frente a la concentración de p-NPP.

15 Las Figuras 13 - 16 muestran gráficos de la A_{405} nm frente a UA/ml para diferentes concentraciones de p-NPP en los que todas las demás variables experimentales se han mantenido constantes.

Las Figuras 17 - 19 muestra gráficos de la A_{405} nm frente a UA/ml para diferentes tiempos de incubación del complejo inmune usando una concentración de p-NPP de 3,0 mg/ml.

20 La Figura 20 muestra una representación en gráfico de barras de la suma de las desviaciones desde una función de calibración lineal frente al tiempo de incubación del complejo inmune en el que la concentración de p-NPP es de 3,0 mg/ml. La Figura 21 muestra un gráfico de la A_{405} nm frente a la UA/ml usando un patrón para verificar la precisión.

La Figura 22 muestra un gráfico de la A_{405} nm frente a UA/ml para una comparación entre el ELISA estándar y el corto usando VME.

25 La Figura 23 muestra una representación en gráfico de barras de la recuperación (%) frente a los valores previstos para una comparación entre el ELISA estándar y el corto usando VME.

La Figura 24 muestra una representación en gráfico de barras de la recuperación (%) frente a los valores previstos para una comparación entre el ELISA estándar y el corto usando 287.

La Figura 25 muestra una representación en gráfico de barras de la recuperación (%) frente a los valores previstos para una comparación entre el ELISA estándar y el corto usando GBS.

30 La Figura 26 muestra una realización preferida de un primer contenedor de reacción separado del segundo contenedor de reacción por una división extraíble, en este caso un tapón de cera.

Modos para realizar la invención

Ejemplo 1 – Optimización del procedimiento de ELISA corto

35 Una serie de aspectos de una realización de un ensayo de ELISA rápido para varios antígenos diferentes se optimizó experimentalmente con respecto al análisis de los anticuerpos séricos usando un anticuerpo conjugado frente a los anticuerpos séricos como la primera pareja de unión, p-nitrofenilfosfato (p-NPP) como medio de detección y una proteína como la segunda pareja de unión.

Optimización de la dilución sérica

40 Para optimizar la concentración de la dilución sérica usada en el ELISA corto se realizaron una serie de experimentos y se comparó la recuperación media (%) y la sensibilidad en un intervalo de diluciones séricas de 1:3.000 – 1:12.000. Los resultados se muestran en la Tabla 1 y las Figuras 3 y 4:

Tabla 1

Dilución del anticuerpo en suero	Recuperación media (%)	Sensibilidad]
3.000	115	2.150
6.000	105	2.049

(cont.)

9.000	111	1.826
12.000	118	1.751

En este experimento se eligió una dilución sérica de 1:6.000, ya que esta dilución proporciona la mejor recuperación al tiempo que mantiene una buena sensibilidad.

Optimización de la dilución del anticuerpo conjugado

- 5 Para optimizar la dilución del anticuerpo conjugado usado en el ELISA corto, la recuperación (%) frente a la recuperación nominal (%) se comparó sobre un intervalo de diluciones de anticuerpos conjugados. La dilución de anticuerpos séricos se mantuvo constante a 1:6.000. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 5.

Tabla 2

Dilución del anticuerpo conjugado	80 %	60 %	40 %	20 %	Recuperación media (%)
500	80	94	82	88	82
1.000	107	105	95	104	103
2.000	113	125	105	100	111
4.000	91	89	105	85	93
8.000	123	112	99	96	108

- 10 En este experimento, una dilución de 1:1.000 del anticuerpo conjugado dio el mejor acuerdo entre a recuperación y la recuperación nominal.

Optimización del tiempo de incubación para formar el primer producto de mezcla de la reacción en fase homogénea

Para optimizar el tiempo de incubación de la reacción en fase homogénea usada en el ELISA corto, la recuperación media (%) se analizó con una serie de tiempos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 6.

15

Tabla 3

Tiempo de incubación (min)	Recuperación media (%)
5	96
10	96
15	96
20	83

Se estimó que los tiempos que varían de 5 minutos a 15 minutos eran una elección adecuada para la incubación en fase homogénea. En este experimento se eligió un periodo de incubación de 10 minutos o de 5 minutos como un buen compromiso de precisión y de la velocidad de la prueba.

- 20 Optimización del tiempo de incubación para formar el segundo producto de mezcla (el complejo inmune)

El tiempo de incubación para el complejo inmune de 1 h a 37 °C dio buenos resultados. No obstante, los datos usando este tiempo de incubación requirieron una función de calibración, regresión logística no lineal. Con el fin de alcanzar una calibración lineal se probaron tiempos de incubación diferentes (Figuras 7 – 11, Tabla 4). Se encontró que la linealidad de la función de calibración se podía conseguir usando un tiempo de incubación de 10 minutos a 37 °C.

25

Se investigó el motivo de la no linealidad de la función de calibración a tiempos de incubación más prolongados. Se propuso que a tiempos de incubación más cortos se unía menos complejo inmune a la placa y, por tanto, el reactivo de desarrollo de color (p-NPP) permanece en exceso. No obstante, con tiempos de incubación más largos el sustrato se agota y, por tanto, no se mantiene la regresión lineal. Para confirmar esta hipótesis se investigó el efecto de la concentración de p-NPP.

30

Tabla 4

Tiempo de incubación del complejo inmune (minutos a 37 °C)	Suma de las desviaciones de los valores lineales previstos
10	167
15	410
30	1.784
60	2.469
120	4.525
180	4.739

Optimización de la concentración de p-nitrofenilfosfato (p-NPP)

5 Para optimizar la concentración de p-NPP usada en la solución de desarrollo de color, se varió la concentración de 1,0 mg/ml a 4,0 mg/ml. Los experimentos se llevaron a cabo usando una dilución sérica de 1:6.000, una dilución de 1:1.000 de anticuerpo anti-ratón conjugado con ALP, un periodo de incubación de 10 minutos para la fase homogénea seguido de un periodo de incubación de 30 minutos del complejo inmune (que se ha mostrado que no es lineal con 1,0 mg/ml de p-NPP en los experimentos previos).

10 La suma de las desviaciones de una función de calibración lineal se midió en el intervalo de concentraciones de p-NPP (Tabla 5, Figuras 12 -16). En este experimento se mostró que la concentración óptima de p-NPP con un periodo de incubación de 30 minutos para el complejo inmune era de 3,0 mg/ml. Habiendo deducido la concentración óptima de p-NPP se investigó una reducción del tiempo de incubación del complejo inmune con esta concentración.

Tabla 5

p-NPP mg/ml	Suma de desviaciones desde la linealidad
1,0	603
2,0	347
3,0	163
4,0	263

15 Usando una concentración de p-NPP de 3,0 mg/ml se investigaron tres tiempos de incubación del complejo inmune (Tablas 10 – 12, Figuras 17 – 20). En este experimento, se demostró que las condiciones óptimas eran un tiempo de incubación del complejo inmune de 10 minutos o de 10 – 15 minutos con una concentración de p-NPP de 3,0 mg/ml, seguido de 30 minutos o 10 minutos de desarrollo de color.

20 **Tabla 10 – 30 minutos a 37 °C**

Media	Desviaciones
2.109	59
1.205	87
680	87
323	8
152	45
71	61
Suma	347

Tabla 11 – 20 minutos a 37 °C

Media	Desviaciones
1.679	36
932	46
518	46
311	47
115	46
51	58
Suma	279

Tabla 12 – 10 minutos a 37 °C

Media	Desviaciones
1.881	41
834	100
503	22
274	20
150	9
93	8
Suma	200

5 Ejemplo 2 – Verificación del ensayo de ELISA corto mediante ensayo de precisión

Una vez que se hubo establecido las condiciones óptimas para el procedimiento de ELISA corto en estos experimentos, la prueba se verificó en un ensayo de precisión. Se encontró que la calibración lineal se mantenía sobre una serie de concentraciones estándar (Tablas 13-15, Figura 21).

Tabla 13

Placa para la verificación de la precisión									
Est.	80 % de est.	60 % de est.	40 % de est.	20 % de est.	Est.	80 % de est.	60 % de est.	40 % de est.	20 % de est.
1.676	1.738	1.482	1.616	11.49	1.159	827	788	453	486
949	938	770	824	627	581	371	379	236	224
520	513	414	405	332	316	216	220	113	111
216	237	190	246	152	138	102	99	45	50
97	154	144	137	77	70	66	47	31	15
46	37	64	113	17	83	75	58	39	20
16	40	11	26	42	44	45	40	19	70
57	49	27	50	76	83	80	71	55	22

10

Tabla 14

Est.	UA/ml
1.852	1,00
1.038	0,500
630	0,250
265	0,125
139	0,063

Tabla 15

%	A 405nm	UA/ml	% Recuperación
80	1.670	0,87	
	900	0,90	
	475	0,87	
	240	0,71	
		0,84	
60	1.193	0,61	
	674	0,65	
	355	0,61	
		0,62	
40	858	0,43	
	377	0,33	
	210	0,29	
		0,38	
20	532	0,25	
	228	0,16	
		0,21	
% Recuperación media			101,6

Ejemplo 3 – Verificación del ensayo de ELISA corto mediante ensayo de comparación

- 5 Una vez confirmada la precisión del procedimiento de ELISA corto se llevó a cabo verificación adicional en una serie de comparaciones con ELISA estándar. Inicialmente se compararon los dos procedimientos usando vesículas de membrana externa (VME) preparadas del meningococo de serogrupo B (Tabla 16, Figura 22).

Tabla 16

Procedimiento estándar UA/ml	Procedimiento de ELISA corto UA/ml
3.154	2.575
3.154	2.529
2.602	2.271
2.612	2.192
2.154	1.927
2.160	2.022
2.084	1.862
2.271	1.668
1.759	1.360
1.373	1.160
1.421	1.153
1.105	1.259
1.095	995
874	940
840	698
728	595
596	578
197	327

Se llevaron a cabo otras pruebas de comparación usando VME, la proteína “287” de meningococo y la “proteína

GBS" de estreptococo (Tablas 17 – 19, Figuras 23 – 25).

Tabla 17 – ELISA con VME

Procedimiento estándar		Procedimiento corto
Valores previstos	% Recuperación	% Recuperación
0,75	90,70	103,30
0,50	91,40	111,10
0,25	93,20	94,80

Tabla 18 – ELISA 287

Procedimiento estándar		Procedimiento corto
Valores previstos	% Recuperación	Recuperación %
0,80	104	96
0,60	100	119
0,40	103	110
0,20	119	118

5

Tabla 19- ELISA con proteína GBS 80

Procedimiento estándar		Procedimiento corto
Valores previstos	% Recuperación	Recuperación %
0,80	91	80
0,60	116	94
0,40	100	97
0,20	108	116

Debe entenderse que la invención se ha descrito únicamente a modo de ejemplo y que se pueden realizar modificaciones permaneciendo dentro del alcance de la invención.

10

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de unión para un analito en una muestra, que comprende las etapas de:
 - (i) mezclar en una fase homogénea, en un primer contenedor de reacción, la muestra y una primera pareja de unión marcada al analito para formar un primer producto de mezcla; y
 - (ii) transferir el primer producto de mezcla a un segundo contenedor de reacción y exponer el primer producto de mezcla a una segunda pareja de unión al analito para formar un segundo producto de mezcla.
2. El ensayo de unión de la reivindicación 1, en el que la primera pareja de unión está conjugada a una enzima.
3. El ensayo de unión de la reivindicación 1, en el que la primera pareja de unión está conjugada a un marcador directo.
4. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que la primera pareja de unión es un anticuerpo.
5. El ensayo de unión de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
6. El ensayo de unión de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el anticuerpo se usa a una dilución de 1:1.000.
7. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que el analito es un anticuerpo.
8. El ensayo de unión de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
9. El ensayo de unión de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo sérico.
10. El ensayo de unión de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo sérico se usa a una dilución de 1:6.000.
11. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (i) se lleva a cabo durante 10 minutos o 5 minutos.
12. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que la segunda pareja de unión está inmovilizada y la etapa (ii) se produce en la fase heterogénea.
13. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa (ii) se lleva a cabo durante 10 minutos o 10 – 15 minutos.
14. El ensayo de unión de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende detectar dicho segundo producto de mezcla.
15. El ensayo de unión de la reivindicación 14, en el que la detección implica un cambio de color en un reactante.
16. El ensayo de unión de la reivindicación 15, en el que el reactante es p-nitrofenilfosfato.
17. El ensayo de unión de la reivindicación 16, en el que el p-nitrofenilfosfato está a una concentración de 3,0 mg/ml.
18. El ensayo de unión de cualquier reivindicación precedente, en el que el ensayo se realiza en un tiempo total inferior a 4 horas.

FIGURA 1

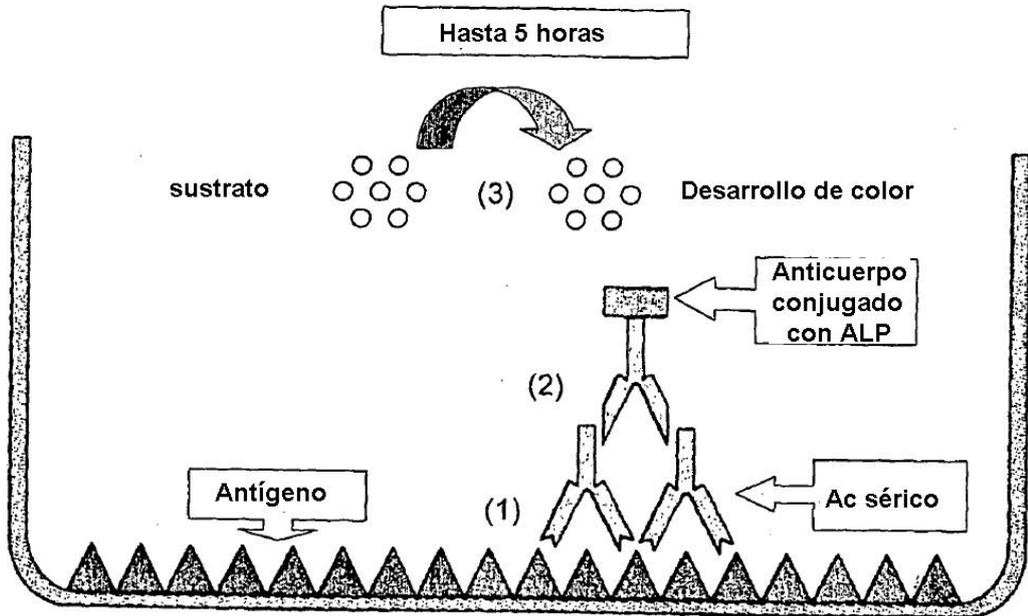


FIGURA 2

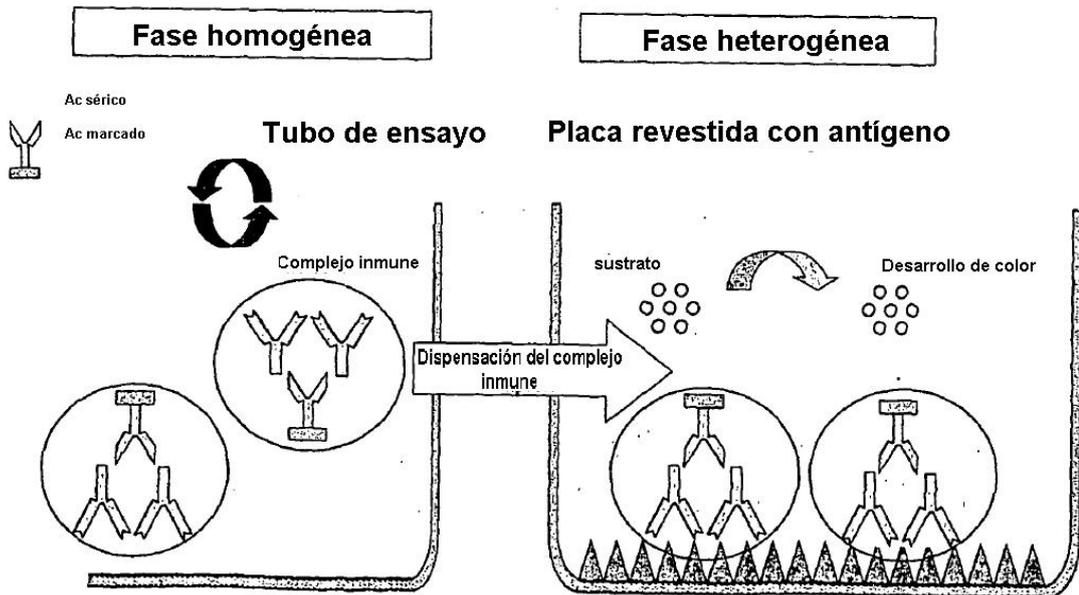


FIGURA 3

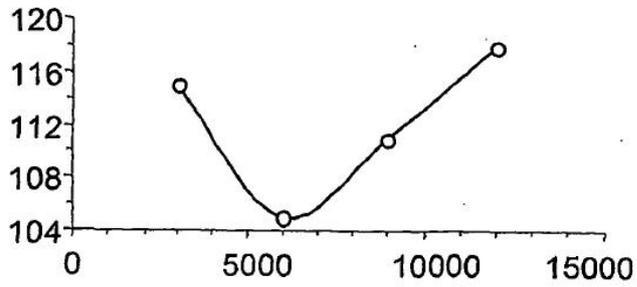


FIGURA 4

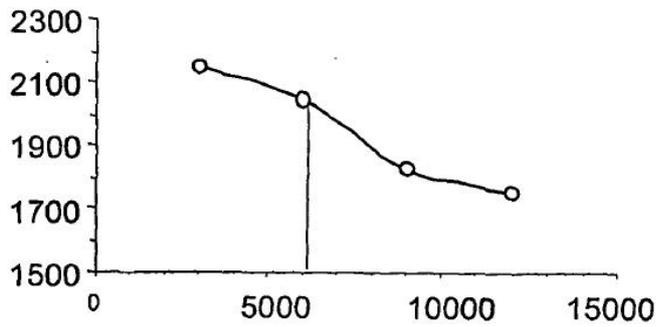


FIGURA 5

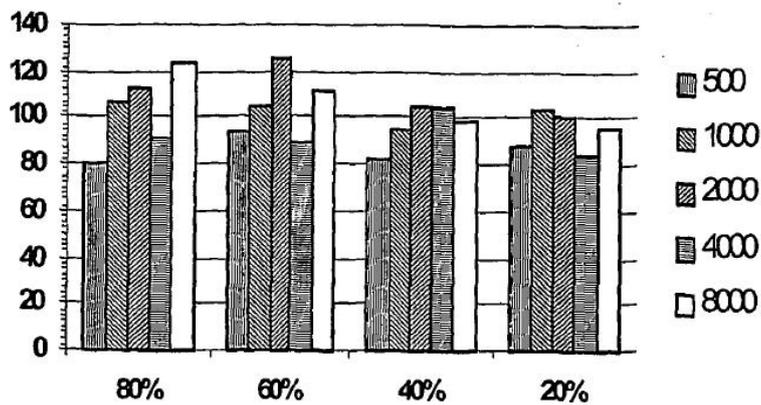


FIGURA 6

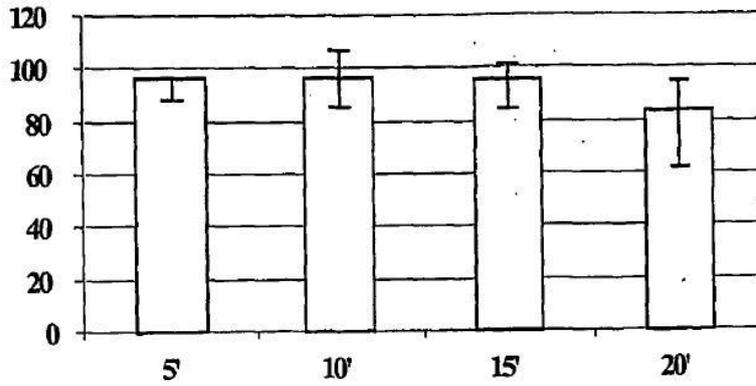


FIGURA 7

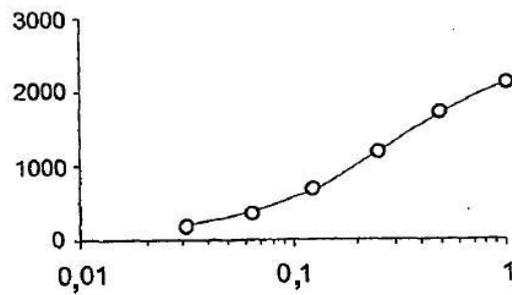


FIGURA 8

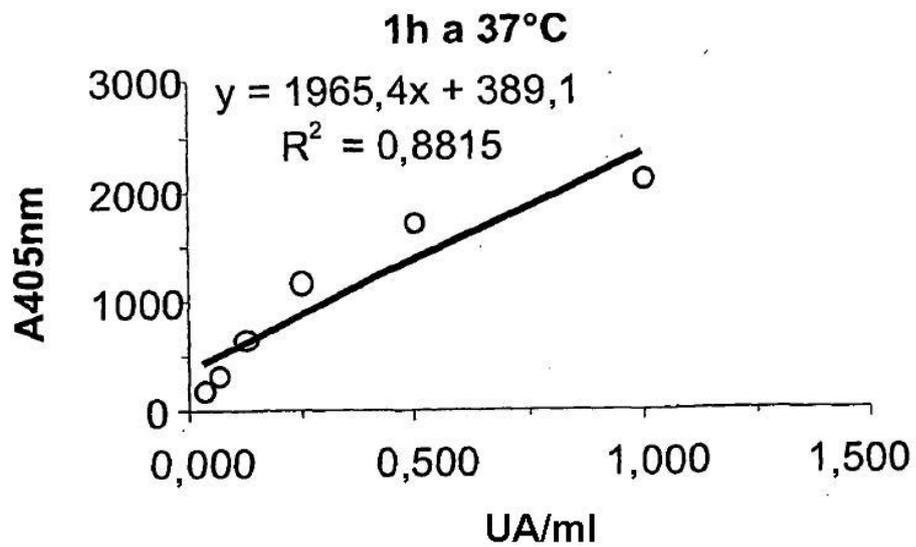


FIGURA 9

10' a 37°C

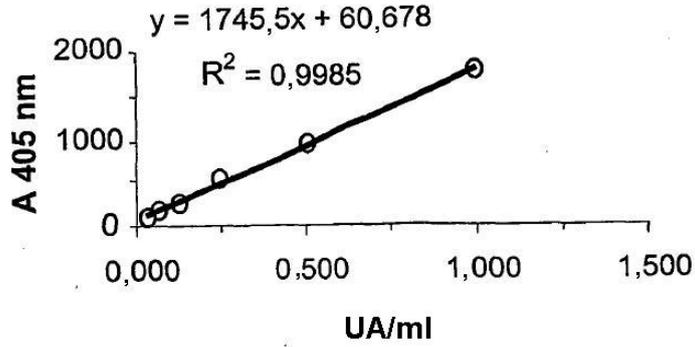


FIGURA 10

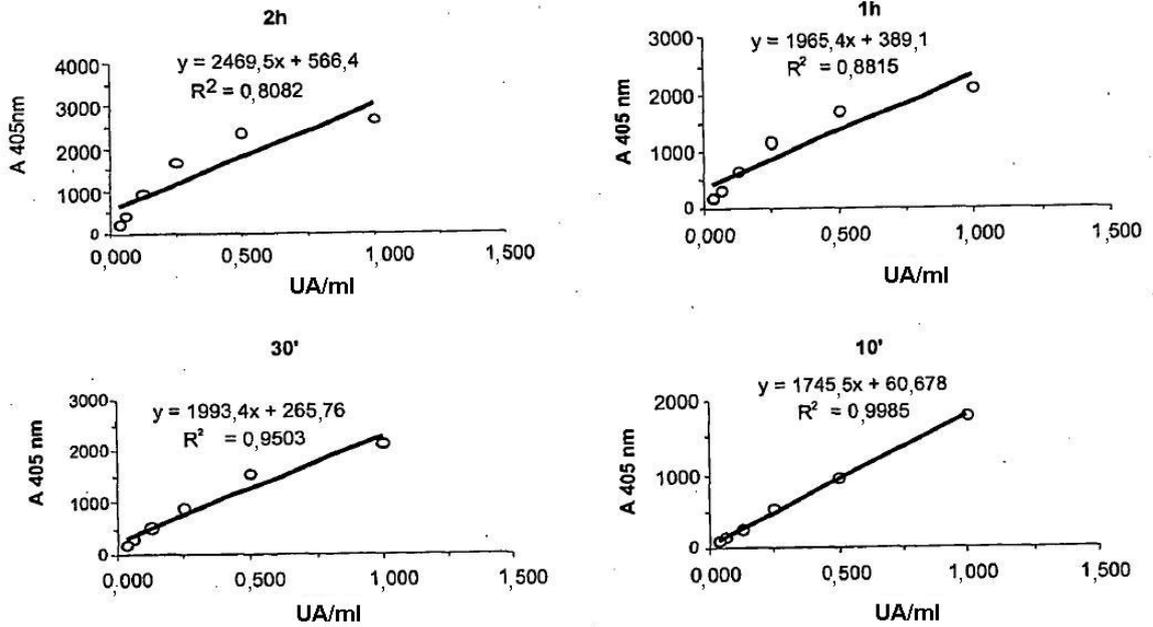


FIGURA 11

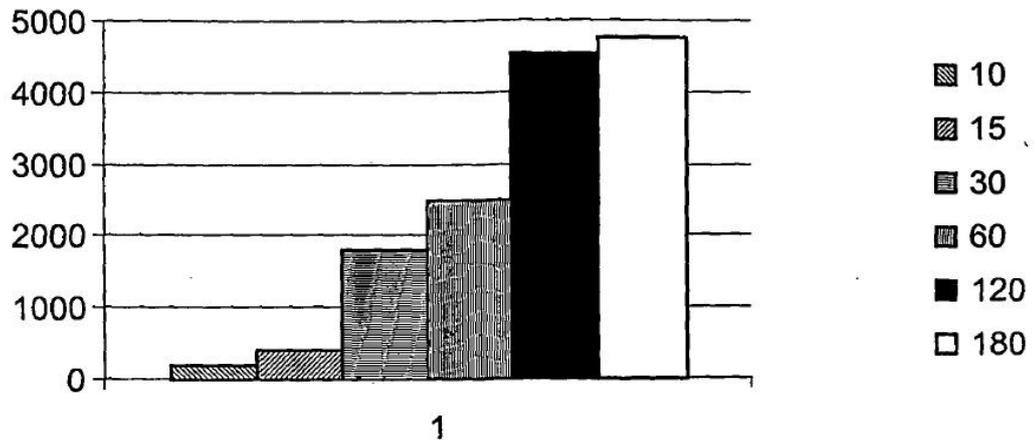


FIGURA 12

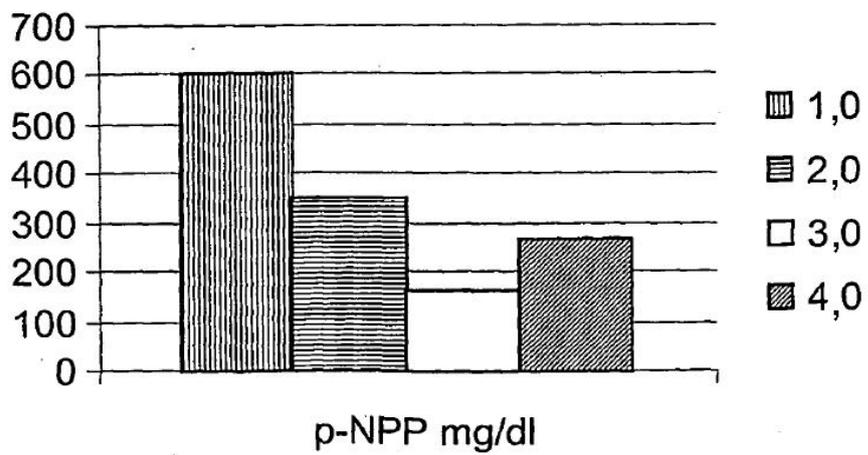


FIGURA 13

p-NPP 1 mg/dl

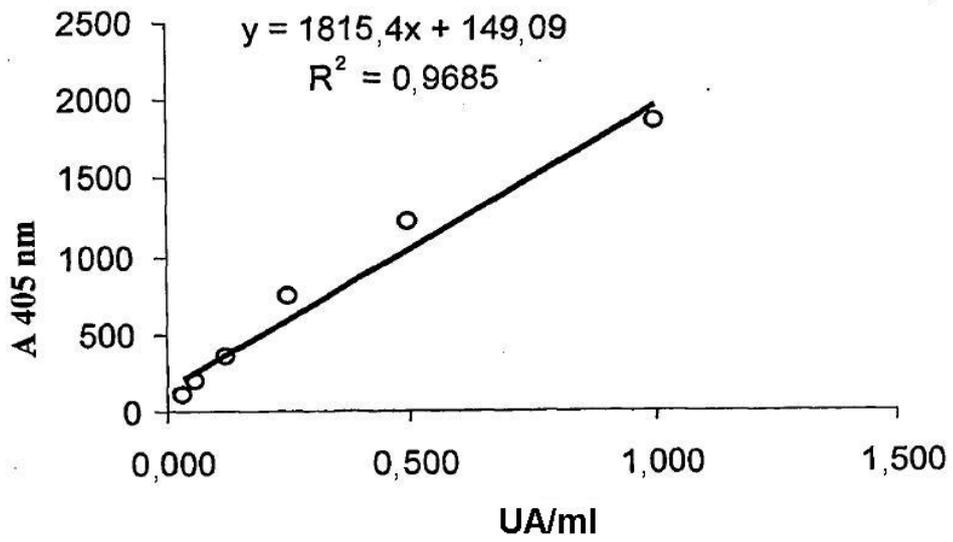


FIGURA 14

p-NPP 2mg/dl

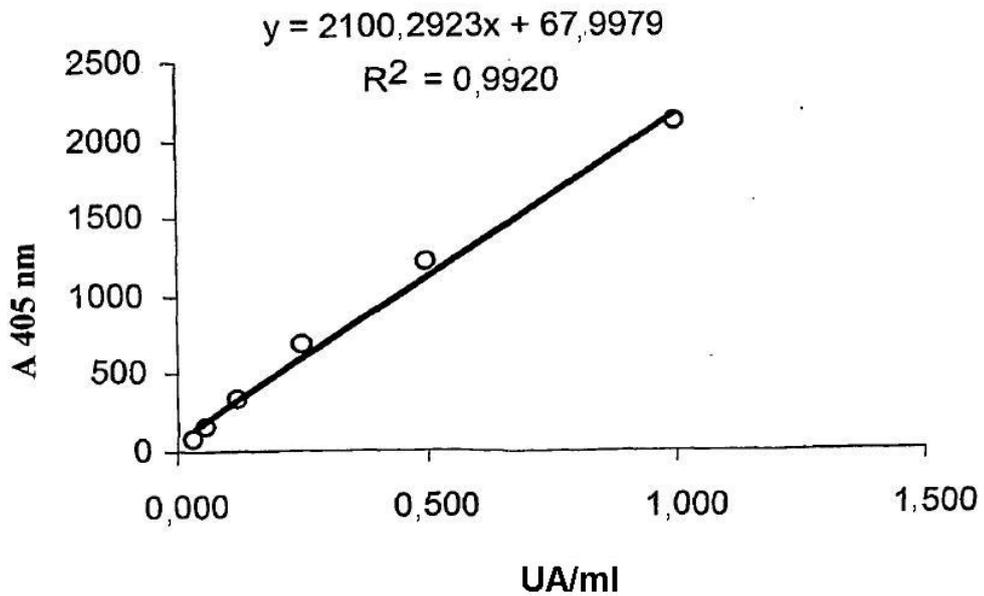


FIGURA 15

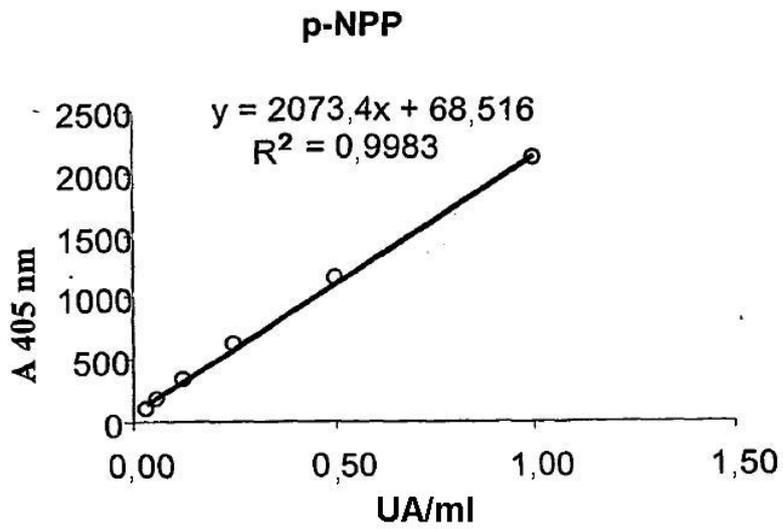


FIGURA 16

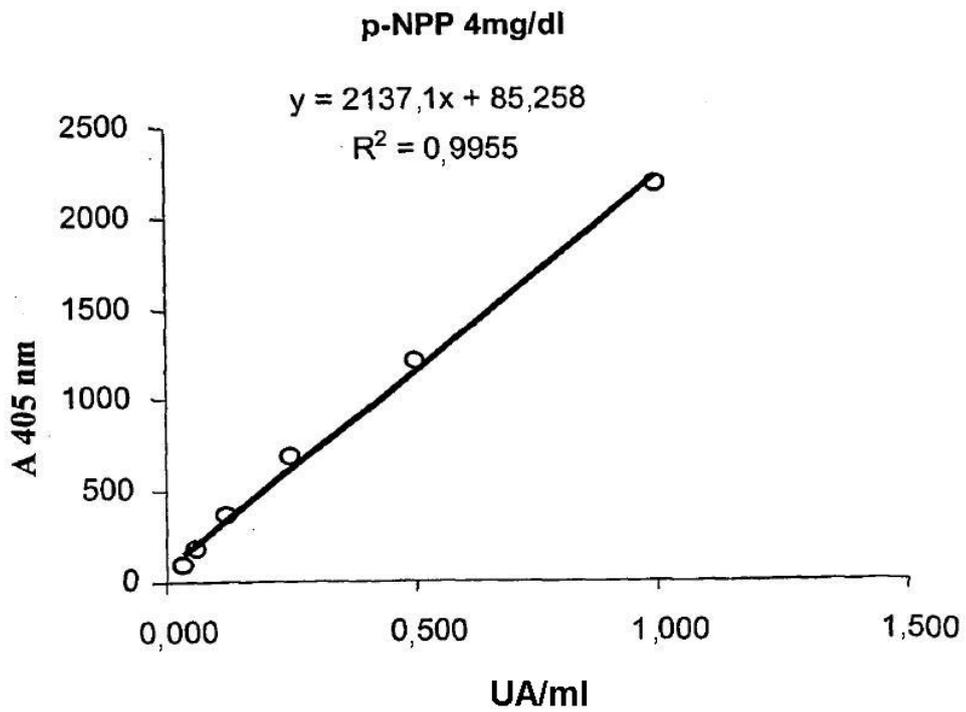


FIGURA 17
30' a 37 °C

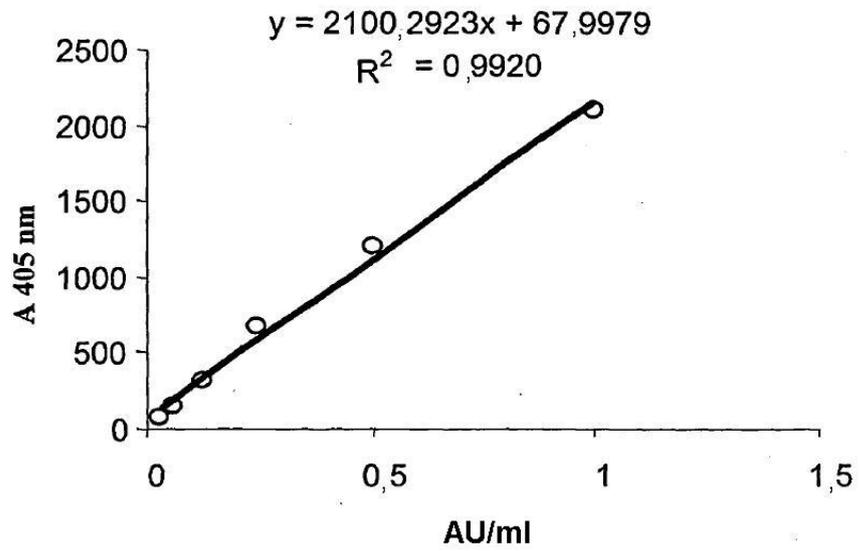


FIGURA 18
20' a 37°C

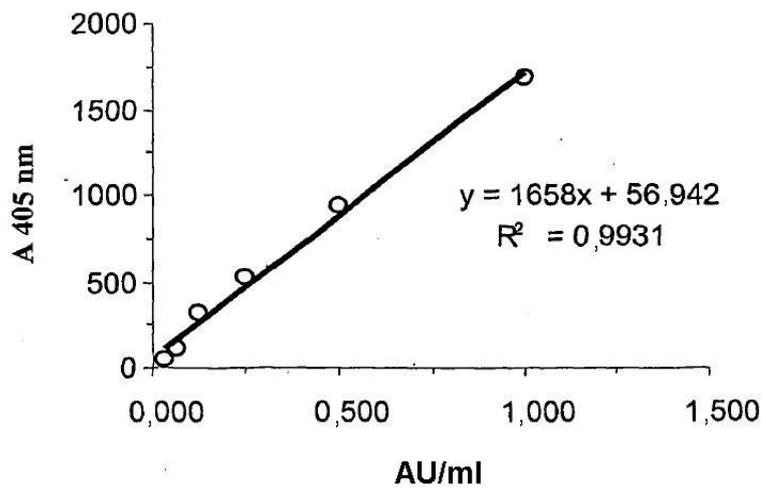


FIGURA 19

10' a 37°C

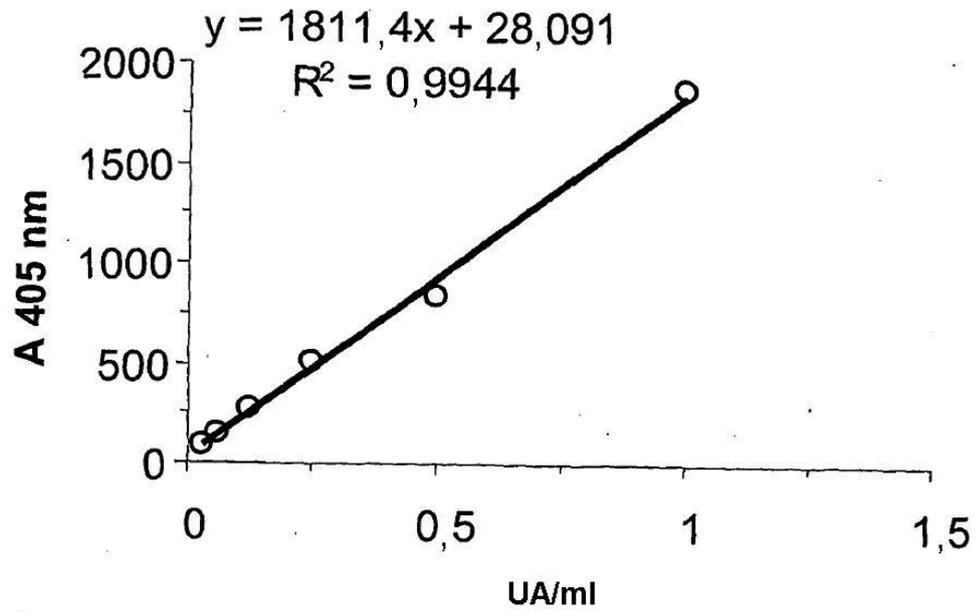


FIGURA 20

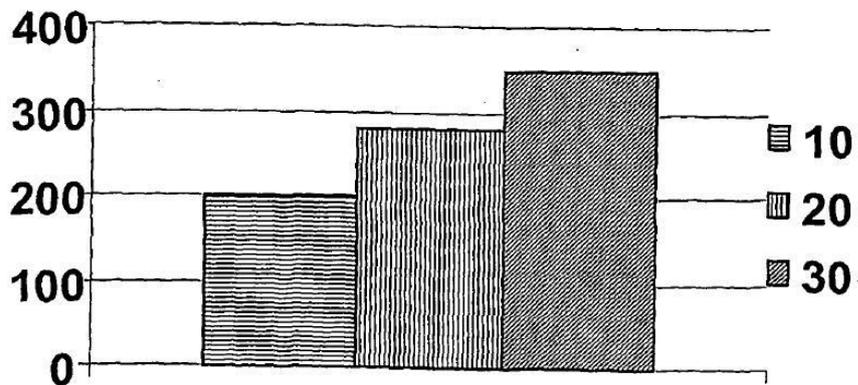


FIGURA 21

Función de calibración

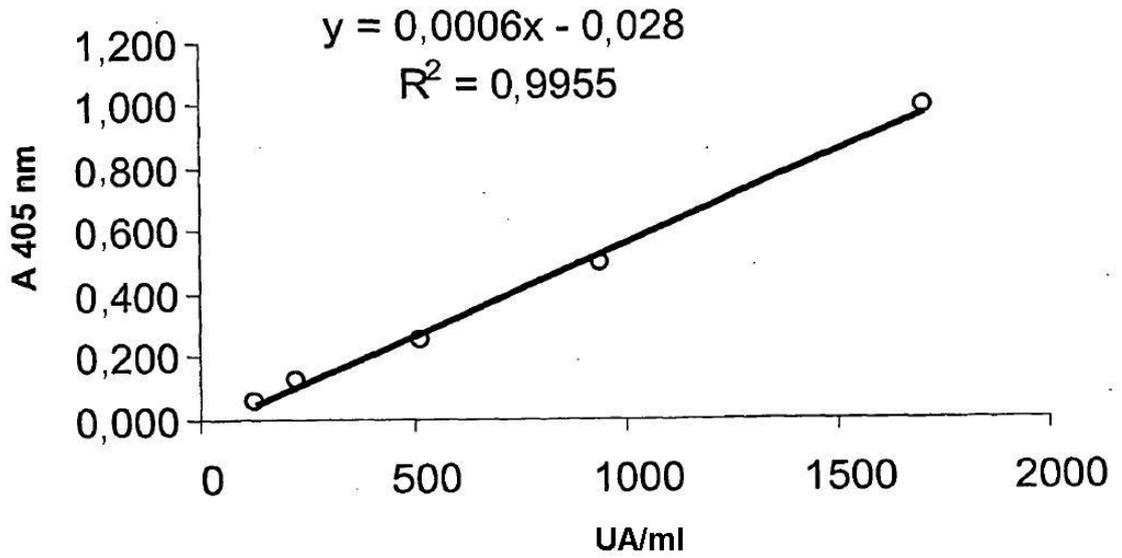


FIGURA 22

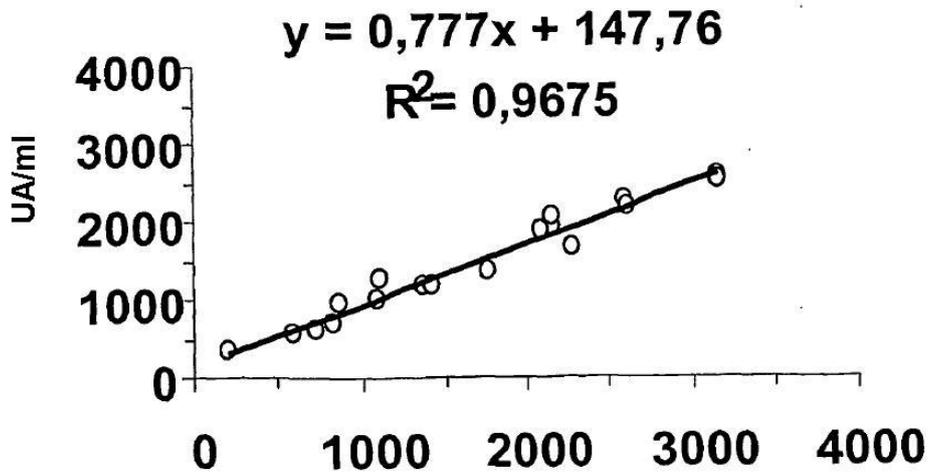


FIGURA 23

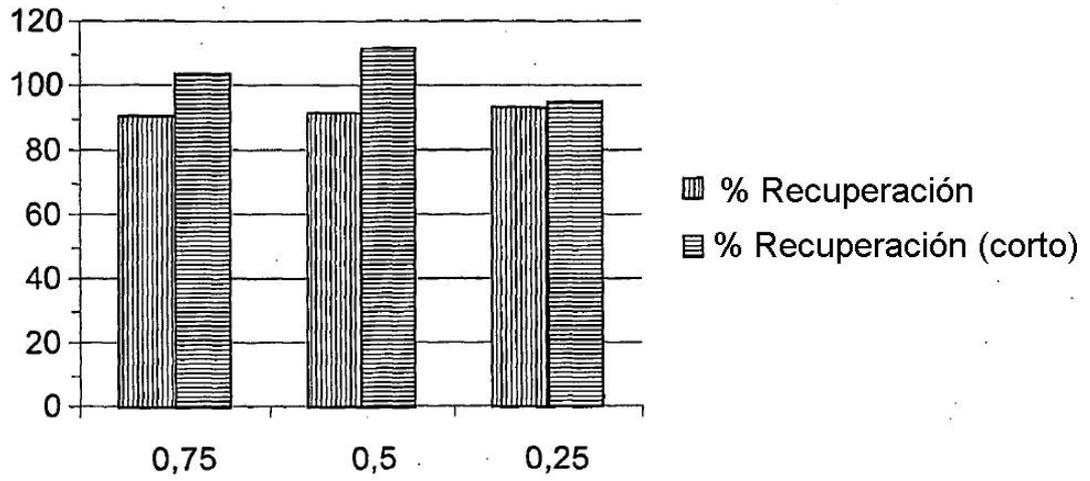


FIGURA 24

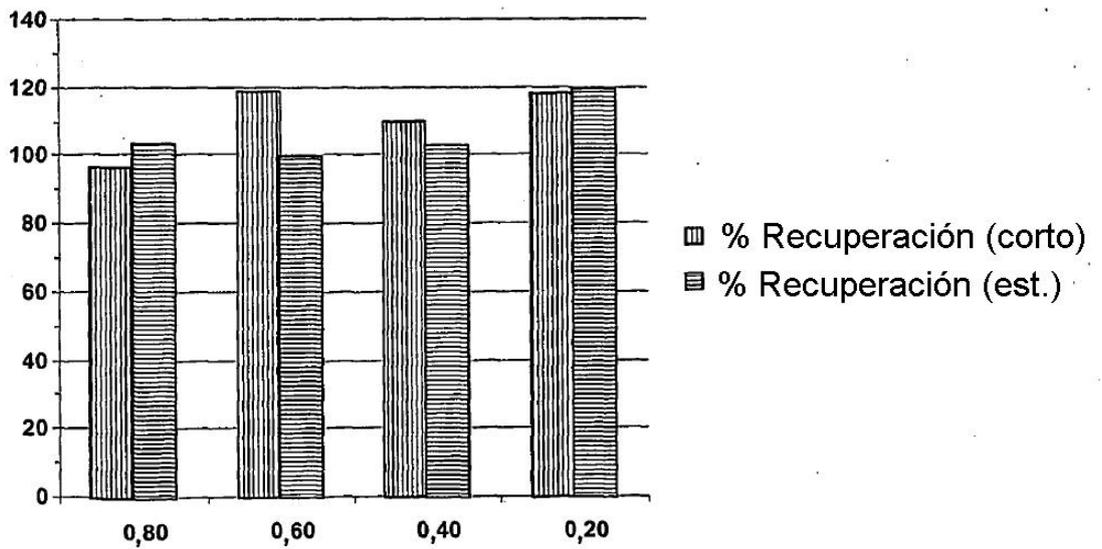


FIGURA 25

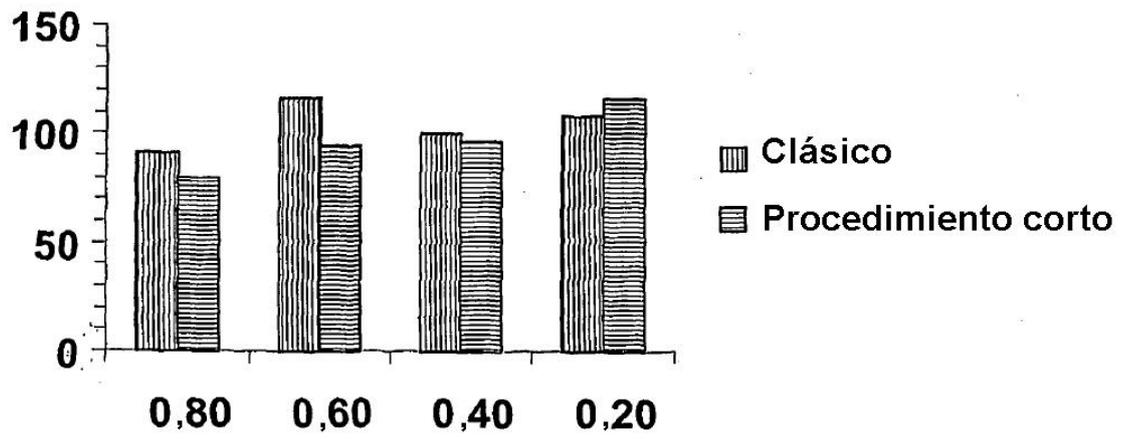


FIGURA 26

