(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 403 198**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09795414 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 2376650**

(54) Título: **Conjugado de detección y método de análisis policromático**

(30) Prioridad:

17.12.2008 DE 102008062372

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2013

(73) Titular/es:

MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER (100.0%)
Carl-Neuberg-Strasse 1
30625 Hannover, DE

(72) Inventor/es:

HENNIG, CHRISTIAN y
HANSEN, GESINE

(74) Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

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

Conjugado de detección y método de análisis policromático

La invención se refiere a conjugados de detección con una parte anticuerpo, a procedimientos para la detección de analitos mediante conjugados de detección y a la utilización de estos conjugados de detección en procedimientos para la detección específica de analitos, por ejemplo de antígenos específicos, que están unidos en solución, extracelular o intracelularmente, a células suspendidas o unidas a un sustrato soporte, en particular que se encuentran en células vivas o desnaturalizadas y permeabilizadas en suspensión o unidas a un sustrato soporte. Como alternativa a la parte anticuerpo, ciertos conjugados de detección contienen una parte de unión específica a un analito, por ejemplo un ligando de receptor, un receptor, una molécula de unión específica, por ejemplo una lectina, biotina, avidina, un oligosacárido, en cada caso como parte de unión del conjugado de detección.

Los conjugados de detección según la invención incluyen una parte de unión y una parte fluorocromo asociada a ésta y con un primer extremo de un enlazante. La parte de unión puede estar dispuesta en el segundo extremo del enlazante opuesto al primero, de modo que el enlazante está situado entre la parte de unión y la parte fluorocromo. Los conjugados de detección se caracterizan porque el enlace unido a la parte fluorocromo del conjugado está diseñado para desactivar la actividad óptica de la parte fluorocromo del conjugado mediante interacción con un reactivo. En una primera forma de realización, la parte de unión puede estar asociada a la parte fluorocromo, mientras que el enlace está asociado a la parte fluorocromo a través de su primer extremo.

La preparación según la invención del enlazante para desactivar la actividad óptica de la parte fluorocromo en caso de estar presente un reactivo, consistente en un compuesto que reacciona específicamente con el enlazante, hace posible un procedimiento de detección donde se utilizan simultánea y/o sucesivamente al menos dos conjugados de detección de especificidad diferente, en cada caso con el paso de desactivación, específico de un enlazante, de la actividad óptica de la parte fluorocromo del conjugado, por ejemplo después de detectarse un conjugado de detección, de forma que, si se utiliza por ejemplo como alternativa a la decoloración con partes iguales y diferentes del fluorocromo de los conjugados, no se produce perturbación esencial alguna, por ejemplo interferencia alguna, o no se produce la excitación recíproca de los fluorocromos. De este modo se evita una reducción no específica de la señal óptica de un fluorocromo o que se genere una señal óptica no específica de un conjugado residual procedente de un paso de análisis previo. Preferentemente, los enlazantes de conjugados que entran en contacto sucesiva o simultáneamente con la misma muestra tienen diferentes especificidades de unión para un reactivo específico dado en cada caso para desactivar la parte fluorocromo.

Estado de la técnica

Mahnke y Roederer (Clin. Lab. Med. 2007, 27(3) (2007)) han descrito cómo se pueden adaptar uno tras otro múltiples conjugados de anticuerpos para detectar antígenos celulares en citometrías de flujo con el fin de evitar, en caso de utilización simultánea, interferencias de aquellas partes fluorocromo que tienen en cada caso espectros de emisión diferentes con el fin de hacerse distinguibles. Para separar los espectros de emisión solapados, en particular en caso de excitación no específica de un fluorocromo por transferencia de energía de otro fluorocromo, se propone evaluar las señales de forma asistida por ordenador, eliminándose las señales de emisión no específicas de fondo.

Hennig, Adams y Hansen, Cytrometry Part A, 362 - 370 (2009), describen el análisis de células unidas a soportes con marcado sucesivo mediante anticuerpos marcados por fluorescencia. Entre los pasos de marcado individuales se inactivaron los colorantes de fluorescencia por decoloración.

Mittag y col., Cytometry Part A, 691 - 703 (2006), describen el análisis celular en citometrías de flujo con tinción simultánea de las células con hasta ocho fluorocromos conjugados de diferentes anticuerpos. La distinción de los fluorocromos se produce mediante medidas sucesivas a longitudes de onda diferentes en cada caso y filtros de detección, a continuación los datos se superponen.

La WO 2004/057023 A1 describe el análisis de ácidos nucleicos mediante unión con oligonucleótidos capturadores inmovilizados y unión a oligonucleótidos marcados con colorantes, inactivándose ópticamente los oligonucleótidos marcados con colorantes no unidos mediante oligonucleótidos complementarios específicos con un agente de extinción (quencher).

La WO 2006/002167 A2 describe una sonda de detección con una estructura en horquilla cuyos extremos hibridados están unidos, por un lado, a moléculas fluorescentes y, por otro lado, a agentes de extinción. La interacción de la parte no hibridada de la estructura en horquilla con un analito conduce a una variación de la actividad óptica del marcador de fluorescencia.

La US 2004/0219526 A1 describe un ELISA en sándwich donde el anticuerpo capturador está unido al soporte mediante un oligonucleótido que presenta secciones de cadena doble.

Laffers y col. (Cytometry Part A 69A: 127-130 (2006)) describen el análisis de células mediante citometría de flujo o con células inmovilizadas con conjugados anticuerpo-fluorocromo, que presentaban fluorocromos diferentes en cada caso. Para la evaluación, los datos de la citometría de flujo (CF) o microscopía de detección de fluorescencia se someten a superposición asistida por ordenador.

Tárnok (Cytometry Part A 69A: 555-562 (2006)) menciona, junto a la citometría utilizando conjugados de anticuerpos con diferentes fluorocromos, el uso sucesivo de conjugados anticuerpo-fluorocromo, la inactivación de fluorocromos por irradiación, la activación así como la destrucción de fluorocromos con radiación.

Perfetto y col. (Nature 648-654 (2004)) describen citómetros de flujo para la detección de numerosos fluorocromos mediante excitación específica sucesiva muy seguida y detección específica a longitudes de onda de luz emitida, denominada medición simultánea. Dicho documento muestra que diferentes fluorocromos presentes simultáneamente en una muestra, en caso de excitación a una longitud de onda específica para el fluorocromo, presentan no obstante emisiones no específicas, lo que se atribuye a una transferencia de energía entre los fluorocromos. Para evitar señales no específicas se propone la adaptación de los conjugados anticuerpo-fluorocromo a utilizar simultáneamente según un procedimiento empírico. Para evitar aun más las señales de emisión no específicas se propone una compensación matemática con la que se eliminan emisiones que pueden ser debidas a transferencias de energía no específicas entre fluorocromos.

El documento US 6.150.173 describe una máquina automática de pipetear controlada por ordenador con la que sucesivamente se incuban conjugados anticuerpo-fluorocromo con una muestra; después de irradiarse a una longitud de onda de excitación, se mide la radiación emitida, a continuación el fluorocromo se destruye con radiación UV y se añade un nuevo conjugado anticuerpo-fluorocromo a la misma muestra.

La WO 2007/101706 A1 describe que, antes de la detección de un conjugado anticuerpo-fluorocromo específico, la muestra biológica se trata con radiación para reducir la fluorescencia no específica.

Los procedimientos arriba mencionados para la detección de varios conjugados anticuerpo-fluorocromo tienen la desventaja de que los fluorocromos pueden emitir luz de forma no específica, por ejemplo después de una transferencia de energía desde otro fluorocromo, cuando se utilizan varios fluorocromos diferentes simultáneamente en el análisis de la muestra. Los procedimientos donde varios conjugados anticuerpo-fluorocromo entren sucesivamente en contacto con una muestra, destruyéndose en cada caso un fluorocromo con radiación, tienen la desventaja de que, por un lado, la alta aportación de energía para destruir los fluorocromos puede modificar la muestra y de que, por otro lado, la destrucción del fluorocromo no se produce de forma completa o no irreversible, de modo que, con frecuencia, después de dicha radiación destructora, se pueden seguir detectando emisiones no específicas de fluorocromos, lo que también se denomina regeneración de los fluorocromos.

Además, en los procedimientos para desactivar fluorocromos por radiación, la duración relativamente larga de ésta resulta desventajosa.

Objeto de la invención

En comparación con el estado conocido de la técnica, la invención tiene por objeto proponer reactivos que incluyen un conjugado con una parte de unión que se une específicamente a un analito y una parte fluorocromo (también denominada fluoróforo o colorante fluorescente), que permita evitar las desventajas del estado actual de la técnica; en particular proporcionar un conjugado de parte de unión-fluorocromo, principalmente un conjugado anticuerpo-fluorocromo, adaptado de modo que, en caso de un contacto simultáneo y/o secuencial de una muestra con al menos dos conjugados de parte de unión-parte flourocromo, el efecto de uno de los fluorocromos se pueda inactivar selectivamente.

Otro objeto de la invención es poner a disposición un procedimiento de análisis donde se emplean los reactivos y donde, entre el contacto de la muestra con diferentes conjugados de parte de unión-fluorocromo, la actividad óptica de al menos un fluorocromo se desactiva, en particular con conjugados cuyas partes de unión son diferentes y cuyas partes fluorocromo son idénticas. Se pretende sustituir en el procedimiento de análisis la radiación desactivante de los fluorocromos por una interacción selectiva de un reactivo con tal fluorocromo.

Descripción general de la invención

La invención resuelve los objetos arriba mencionados con las características indicadas en las reivindicaciones y, en particular, proporciona una combinación de reactivos, también denominada kit de análisis, que contiene un conjugado de detección con una parte de unión y un reactivo para desactivar la parte fluorocromo por interacción con un enlazante. En particular, la parte de unión es una parte anticuerpo. El conjugado de detección presenta una parte fluorocromo unida a la parte anticuerpo y un enlazante unido a la parte fluorocromo, enlazante que incluye o consiste en un oligonucleótido. Preferentemente, el primer extremo del enlazante está asociado a la parte fluorocromo. Opcionalmente, el segundo extremo del enlazante opuesto al primero está asociado a la parte de unión, de modo que el enlazante une entre sí la parte de unión y el fluorocromo. Dado que el enlazante presenta o consiste en un oligonucleótido, éste también se denomina enlazante de oligonucleótido. El conjugado de detección puede consistir en la parte de unión, que preferentemente es un anticuerpo natural o sintético, el fluorocromo y el enlazante de oligonucleótido. Para los fines de la invención, el concepto “oligonucleótido” incluye en general ADN y/o ARN de cadena simple o doble y secuencias de oligonucleótidos sintéticas, por ejemplo APN (ácido peptidonucleico), en particular de una longitud de 6 a 200 nucleótidos, preferentemente de 20 a 100 nucleótidos.

En la siguiente descripción, el concepto “anticuerpo” se utiliza en sustitución de parte de unión y el concepto “conjugado de detección o conjugado de anticuerpo” se utiliza también en sustitución de conjugados de parte de unión que, en lugar de la parte anticuerpo, presentan otra parte de unión seleccionada por ejemplo de entre el grupo consistente en ácidos oligonucleicos, ligandos de receptor, receptores, lectinas, oligosacáridos, complejos coordinados, antígenos, por ejemplo aptámeros, péptidos específicos para MHCI o MHCII predeterminados, tetrámeros MHC, biotina, avidina y fragmentos de anticuerpos formadores de paratopos. La parte unión presenta afinidad por un analito, que es la pareja de unión de la parte de unión. Como parte de unión de alta afinidad son preferentes los anticuerpos y sus secciones formadoras de paratopos, así como también los aptámeros. El aptámero, que es una parte de unión, consiste preferentemente en un ADN o ARN de cadena simple, por ejemplo incluyendo o formando parte de la secuencia 5-GCAGTTGATCCTTTGGATACCCTGG-3’ (Seq.-ID nº 3), que es específica para el marcador tumoral MUC1 S1.3, o 5’-UCGUAUGGGUGGGAUCGGGAAGGGCUACGAACA-3’ (Seq.-ID nº 4), que es específica para ratón-CD30 (marcador de linfoma).

En una primera forma de realización, además del primer reactivo que incluye el conjugado de detección, la combinación de reactivos contiene, como segundo reactivo que desactiva la parte fluorocromo del conjugado de detección al entrar en contacto con la misma, un agente de extinción unido a un oligonucleótido, que se puede hibridar específicamente con el oligonucleótido del enlazante de oligonucleótido, y que presenta en particular una sección cuya secuencia de bases es inversamente complementaria a la del enlazante de oligonucleótido. Preferentemente, el oligonucleótido del agente de extinción tiene una longitud suficiente para hibridar el enlazante de oligonucleótido, por ejemplo una longitud de 10 a 30 nt. La sección del enlazante de oligonucleótido donde se puede hibridar el oligonucleótido asociado al agente de extinción también se denomina sección de agente de extinción.

Preferentemente, el enlazante de oligonucleótido asocia la parte de unión a la parte fluorocromo, pero alternativamente el enlazante de oligonucleótido puede estar unido únicamente a la parte fluorocromo y la parte fluorocromo puede estar asociada a la parte de unión directamente o mediante un grupo de unión, ya que con esta disposición también se produce el efecto según la invención del enlazante de oligonucleótido, que consiste en proporcionar una secuencia de nucleótidos como sección de agente de extinción en el conjugado de detección, que se une a un oligonucleótido hibridable con el agente de extinción unido, de modo que el agente de extinción se sitúa cerca de la parte fluorocromo.

En la primera forma de realización, el oligonucleótido contenido en el conjugado de anticuerpo según la invención como componente del enlazante de oligonucleótido posibilita la desactivación específica del fluorocromo, ya que el oligonucleótido unido al agente de extinción dispone el enlazante de oligonucleótido junto a la parte fluorocromo mediante la hibridación con la sección del agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, y después el agente de extinción absorbe la radiación emitida por la parte fluorocromo.

En la primera forma de realización, el conjugado de anticuerpo según la invención es adecuado para un kit de análisis y para un procedimiento de detección con al menos dos conjugados de detección utilizados de forma sucesiva, ya que la parte fluorocromo se puede desactivar gracias a la posibilidad de disponer directamente junto a la parte fluorocromo un agente de extinción que puede absorber la radiación emitida por la parte fluorocromo y extinguir ésta sin radiación. En cada una de las formas y variantes de realización de la invención, en lugar de un conjugado de anticuerpo se pueden utilizar simultáneamente al menos dos, preferentemente de 2 a 10 o de 2 a 4 conjugados de anticuerpo. La adaptación del conjugado de anticuerpo para poderle asociar un agente de extinción a la parte fluorocromo se realiza dotando al agente de extinción de un oligonucleótido capaz de hibridarse con una sección del agente de extinción del enlazante de oligonucleótido y que, en particular, presenta una secuencia de bases inversamente complementaria a una

sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido. Por ejemplo, el oligonucleótido asociado al agente de extinción puede consistir en un oligonucleótido antisentido hibridable con una sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, por ejemplo un ARN, ADN o APN, preferentemente un oligonucleótido que se hibrida en solución acuosa con una sección del enlazante de oligonucleótido adyacente a la parte fluorocromo. Se ha comprobado que la hibridación de un oligonucleótido inversamente complementario a una sección del agente de extinción del enlazante de oligonucleótido y que está asociado a un agente de extinción sitúa dicho agente de extinción muy cerca de la parte fluorocromo del conjugado, con lo que la parte fluorocromo y el agente de extinción se encuentran dentro del radio de Förster y la transferencia de energía se produce desde la parte fluorocromo al agente de extinción, y desde éste tiene lugar la disipación de la energía sin radiación o de forma no detectable ópticamente.

En una segunda forma de realización, el enlazante de oligonucleótido está situado entre la parte de unión y la parte fluorocromo y la desactivación del fluorocromo durante la utilización en procedimientos de análisis se logra mediante hidrólisis del enlazante, de modo que la parte fluorocromo del conjugado se separa independientemente de la unión anticuerpo a antígeno, desactivándose así para la detección específica de posición, por ejemplo la emisión de radiación en el lugar de unión de la parte de unión. Para la hidrólisis del enlazante de oligonucleótido según la invención se pueden utilizar hidrolasas no específicas, por ejemplo ribonucleasas (RNAsas), desoxirribonucleasas (DNAsas), en particular endo-RNAsas y endo-DNAsas, y también una restrictasa específica cuando el enlazante de oligonucleótido contiene una secuencia de nucleótidos específica para dicha restrictasa.

El enlazante de oligonucleótido de conjugados de la parte de unión según la invención puede estar unido a esta última generalmente de forma covalente o a través de grupos de acoplamiento, por ejemplo por un enlace tío, éster, amida o amina, o de forma covalente a través de compuestos al menos bifuncionales, o a través de un complejo de dos grupos de acoplamiento que se unen específicamente entre sí, en particular grupos de acoplamiento formadores de complejos, de los cuales uno está unido a la parte de unión y el otro está asociado o unido de forma covalente al enlazante de oligonucleótido. Por ejemplo, los grupos de acoplamiento pueden consistir en biotina y avidina, o en biotina y estreptavidina, de los cuales en cada caso un grupo está asociado a un extremo del enlazante de oligonucleótido y el otro está asociado a la parte de unión y/o a la parte fluorocromo.

Se puede emplear una de las posibilidades de unión del enlazante de oligonucleótido a la parte de unión en cada forma de realización, para la unión de la parte fluorocromo al enlazante de oligonucleótido e, independientemente de ello, en la primera forma de realización, para la unión del agente de extinción con su oligonucleótido.

La desactivación según la invención de la parte fluorocromo de un conjugado anticuerpo-fluorocromo posibilita reacciones de detección sucesivas en cada caso de diferentes epitopos o antígenos gracias a la parte de anticuerpo del conjugado específica para el epitopo correspondiente, y mediante la desactivación de la parte fluorocromo del conjugado, bien de acuerdo con la segunda forma de realización mediante separación de la parte de fluorocromo, bien de acuerdo con la primera forma de realización mediante inhibición o extinción de la actividad de la parte de fluorocromo con un agente de extinción, la unión específica de posición de la parte de unión ya no se puede detectar por identificación de la parte fluorocromo. Por ello, en el procedimiento de detección se puede poner en contacto otro conjugado de anticuerpo con la misma muestra para detectar otro antígeno específico. La parte fluorocromo del conjugado de anticuerpo previamente utilizado está desactivada y, por ello, no puede generar emisiones perturbadoras, por ejemplo no puede generar ninguna emisión no específica a causa de una transferencia de energía, mientras que la parte de fluorocromo del otro conjugado de anticuerpo sí es detectable. También en esta forma de realización, en lugar de un conjugado de anticuerpo se pueden utilizar al menos dos conjugados de anticuerpo con diferentes especificidades al analito de la parte de unión.

Por consiguiente, la invención proporciona un conjugado de detección y un procedimiento para su preparación *in situ*, por ejemplo en contacto con la muestra, y la utilización del conjugado de detección para el análisis.

El conjugado de detección presenta una parte de unión y una parte fluorocromo, así como un enlazante de oligonucleótido que preferentemente une entre sí la parte de unión y la parte fluorocromo y que puede presentar secciones de cadena simple o de cadena doble. El enlazante de oligonucleótido es hidrolizable por una nucleasa en la segunda forma de realización y contiene una sección de agente de extinción en la primera forma de realización preferente. La sección contenida en el enlazante de oligonucleótido en una variante de la invención con la que se puede hibridar el oligonucleótido del fluorocromo hibridable, en particular con respecto a la cual dicho oligonucleótido es inversamente complementario, también se denomina sección de fluorocromo. En la realización de cadena doble, el enlazante de oligonucleótido en su secuencia de nucleótidos presenta una sección de fluorocromo y el fluorocromo está asociado a un oligonucleótido que contiene una sección hibridable con la sección de fluorocromo, por ejemplo inversamente complementaria con respecto a ésta. En la forma de realización preferente, el enlazante de oligonucleótido presenta una

sección de agente de extinción y el conjugado de detección en la combinación está asociado a un agente de extinción hibridable que, al entrar en contacto con el conjugado de detección, desactiva la parte fluorocromo de éste.

En caso de un enlazante de oligonucleótido que presenta secciones de cadena doble a través de la hibridación del fluorocromo hibridable con la sección de fluorocromo, la sección de agente de extinción puede estar contenida en la parte del enlazante de oligonucleótido unida como segunda sección de enlazante de oligonucleótido con el fluorocromo, por ejemplo directamente o sin hibridación de ácido nucleico, o en la sección asociada a la parte de unión mediante hibridación de ácido nucleico. Por ejemplo, la segunda sección de enlazante de oligonucleótido unida al fluorocromo, que es hibridable con la sección de fluorocromo, contiene la sección de agente de extinción. Una sección de oligonucleótido que está asociada sin hibridación de ácido nucleico, está asociada por ejemplo de forma covalente o mediante formación de complejos sin intervención de ácidos nucleicos.

Preferentemente, la invención se refiere a un conjugado de anticuerpo en cuya sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido está hibridado el oligonucleótido de un agente de extinción hibridable, así como a un procedimiento para su preparación mediante hibridación del oligonucleótido de un agente de extinción hibridable con la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, por ejemplo en el procedimiento para análisis. En el procedimiento según la invención, el conjugado de anticuerpo se puede preparar poniendo en contacto la muestra con los componentes del conjugado de detección, que preferentemente presenta un enlazante de oligonucleótido con una sección de agente de extinción, y preferiblemente poniéndola en contacto a continuación con un agente de extinción hibridable. El contacto del conjugado de anticuerpo con el agente de extinción hibridable conduce a la desactivación de la parte fluorocromo y posibilita el análisis subsiguiente con otro conjugado de detección que presenta la misma parte fluorocromo o una parte fluorocromo diferente, sin que se produzcan interacciones con uno de los conjugados de detección utilizados previa o simultáneamente, en particular en caso de conjugados de detección cuyas secciones de agente de extinción sean únicas en cada caso o estén asignadas específicamente a una parte de unión.

Las formas de realización de la invención tienen la ventaja de posibilitar el uso de varios conjugados de anticuerpo sucesivos con la misma parte fluorocromo en cada caso para el análisis de diferentes antígenos, es decir, con diferentes partes de anticuerpo, dado que, en cada caso, antes de poner en contacto la muestra con otro conjugado de anticuerpo, las partes fluorocromo ya presentes en la muestra se han desactivado. En el caso de los conjugados de detección de la invención, el enlazante de oligonucleótido también puede presentar en cada caso la misma secuencia de oligonucleótidos, ya que no se produce ninguna interacción de magnitud significativa con enlazantes de oligonucleótido o con oligonucleótidos de agentes de extinción hibridables de conjugados de anticuerpo que han entrado en contacto con la muestra en pasos previos del procedimiento de detección, especialmente no se producen tales interacciones gracias a los pasos de lavado que preferentemente se llevan a cabo como pasos de procedimiento después del contacto con un conjugado de anticuerpo y/o después de la adición de un agente de extinción hibridable o de una nucleasa.

Correspondientemente, el procedimiento según la invención prevé, en la primera forma de realización, poner en contacto una muestra con el conjugado de detección según la invención, preferentemente su lavado para eliminar el conjugado de detección no unido, irradiar energía a una longitud de onda de excitación con el fin de excitar la parte fluorocromo para la emisión de radiación, detectar la radiación emitida y desactivar subsiguientemente la parte fluorocromo poniendo ésta en contacto con un agente de extinción hibridable. Correspondientemente, en la primera forma de realización, el enlazante de oligonucleótido presenta una sección de agente de extinción.

En la segunda forma de realización, la desactivación de la parte fluorocromo tiene lugar mediante hidrolización del enlazante de oligonucleótido, por ejemplo poniendo éste en contacto con una endonucleasa. Después de desactivar la parte fluorocromo, la muestra se lava para eliminar el agente de extinción hibridable o la nucleasa no unidos. A continuación, la muestra se pone en contacto con otro conjugado de detección según la invención y se detecta la parte fluorocromo de éste, igualmente mediante irradiación a una longitud de onda de excitación, y detección de la radiación emitida. Se ha comprobado que el procedimiento de detección se puede llevar a cabo en una muestra de células humanas inmovilizadas sobre un portaobjetos, poniendo ésta en contacto al menos 15 veces sucesivas con conjugados de detección sin interacciones dignas de mención de los conjugados de detección entre sí.

Los enlazantes de oligonucleótido y los oligonucleótidos unidos a agentes de extinción, en particular secciones de agente de extinción y secciones de fluorocromo, preferentemente tienen secuencias de ácidos nucleicos únicas y diferentes entre sí en cada caso; es decir, secuencias que no presentan ninguna similitud entre sí para la hibridación con respecto a otros ácidos nucleicos y que no se hibridan con la muestra a analizar, en particular una secuencia de ácidos nucleicos que no es hibridable con los ácidos nucleicos de las células a analizar o que no es complementaria a éstos. En formas de realización donde la parte de unión consiste en un oligonucleótido, la parte de unión contiene secuencias complementarias a la muestra, mientras

que el enlazante de oligonucleótido presenta una secuencia no complementaria a la muestra y no hibridable con ésta. Preferentemente, el oligonucleótido del agente de extinción tiene una secuencia no complementaria a la muestra y no hibridable con ésta, sino una secuencia hibridable únicamente con la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido. El agente de extinción está asociado a su oligonucleótido de modo que, en caso de hibridación con la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, adopta una posición muy cercana a la parte fluorocromo.

En una variante de la invención, posible para la primera y la segunda forma de realización, el oligonucleótido del enlazante que asocia la parte de unión a la parte fluorocromo presenta una sección de cadena doble donde una sección de enlazante de oligonucleótido asociada a la parte fluorocromo se hibrida con una sección del enlazante de oligonucleótido asociada a la parte de unión. La segunda sección de enlazante de oligonucleótido asociada a la parte fluorocromo tiene una secuencia de nucleótidos hibridable con la sección de fluorocromo del enlazante de oligonucleótido, por ejemplo inversamente complementaria a ésta. Mediante la hibridación de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido (que está asociada a la parte fluorocromo) con la primera sección de enlazante de oligonucleótido, el conjugado presenta un enlazante de oligonucleótido que asocia la parte fluorocromo a la parte de unión. Este conjugado de parte de unión-enlazante de oligonucleótido-parte de fluorocromo presenta un enlazante de oligonucleótido con secciones de cadena doble mediante la hibridación de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido asociada a la parte fluorocromo.

Correspondientemente a la primera forma de realización, el enlazante de oligonucleótido se puede hibridar en una sección con el oligonucleótido del agente de extinción, por ejemplo en una sección de agente de extinción de la primera sección de enlazante de oligonucleótido donde se puede hibridar el oligonucleótido asociado con el agente de extinción. Correspondientemente a la segunda forma de realización, la sección de cadena doble del enlazante de oligonucleótido también es hidrolizable, por lo que no se requiere ninguna sección de cadena simple adicional en el enlazante de oligonucleótido para la desactivación. Para la segunda forma de realización, la sección de cadena doble del enlazante de oligonucleótido puede incluir una secuencia de reconocimiento de una restrictasa. Un fluorocromo provisto de una segunda sección de enlazante de oligonucleótido complementaria a la primera sección de enlazante de oligonucleótido, también designado como fluorocromo hibridable, se asocia específicamente, a través de la hibridación específica mediante su segunda sección de enlazante de oligonucleótido complementaria, con la sección de fluorocromo de la primera sección de enlazante de oligonucleótido que porta la parte de unión, constituyendo así el conjugado que presenta una parte de unión, un enlazante de oligonucleótido con una sección de secuencia de nucleótidos de cadena doble y un fluorocromo, o consistente en estos elementos. En esta variante, el conjugado de anticuerpo-fluorocromo consiste correspondientemente en al menos una parte de unión, al menos una parte fluorocromo y al menos un enlazante de oligonucleótido con secciones de cadena doble y, por tanto, es adecuado para la desactivación específica de la parte fluorocromo, en particular por la unión de un agente de extinción hibridable, por ejemplo con una secuencia de nucleótidos inversamente complementaria, con la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, o mediante hidrólisis del enlazante de oligonucleótido con nucleasas.

En la variante de los conjugados de unión con un enlazante de oligonucleótido que presenta secciones de cadena doble por la hibridación de una segunda sección de enlazante de oligonucleótido unida a la parte fluorocromo con la sección de fluorocromo, el conjugado de unión también se puede formar al llevar a cabo el procedimiento en mezcla con la muestra. En este caso, el kit de análisis de la invención incluye correspondientemente un primer reactivo con una primera parte que presenta un conjugado de parte de unión-primer sección de enlazante de oligonucleótido y, separada de la primera parte o mezclada con ésta, una segunda parte que presenta un fluorocromo que tiene unida una segunda sección de enlazante de oligonucleótido hibridable con la sección de fluorocromo de la primera sección de enlazante de oligonucleótido.

En esta variante, el procedimiento de análisis incluye preferentemente los pasos consistentes en poner en contacto una muestra con el conjugado de parte de unión-sección de enlazante de oligonucleótido, lavar la muestra para eliminar el conjugado de parte de unión-sección de enlazante de oligonucleótido no unido, poner en contacto la muestra con la parte fluorocromo que presenta una sección de oligonucleótido hibridable con la sección de enlazante de oligonucleótido (también designada como fluorocromo hibridable) y lavar para eliminar el fluorocromo hibridable no unido, y detectar ópticamente el fluorocromo. A continuación, la parte fluorocromo se desactiva poniendo la muestra en contacto con un agente de extinción que presenta un oligonucleótido hibridable con el enlazante de oligonucleótido y/o poniendo la muestra en contacto con una nucleasa y lavándola después.

La sección de fluorocromo y la segunda sección de enlazante de oligonucleótido hibridable con ésta del fluorocromo hibridable, y preferentemente también la sección de agente de extinción y la sección hibridable con ésta del oligonucleótido del agente de extinción hibridable, son únicas, en particular la sección de fluorocromo y la sección de agente de extinción preferiblemente son únicas en cada caso y constituyen exclusivamente una sección de cadena doble en cada caso con las secciones hibridables con ellas de los

oligonucleótidos del fluorocromo hibridable o del agente de extinción hibridable, respectivamente, bajo las condiciones de detección. De forma especialmente preferente, la sección de fluorocromo y la sección de agente de extinción son únicas y no se hibridan entre sí bajo condiciones de hibridación poco rigurosas, por ejemplo bajo condiciones fisiológicas, en particular sólo se pueden hibridar con la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo hibridable y con el oligonucleótido del agente de extinción hibridable, respectivamente, y de forma especialmente preferente no son hibridables con una secuencia de nucleótidos de la muestra a analizar. De este modo, en el procedimiento según la invención se produce la formación de un enlazante de oligonucleótido en la sección de fluorocromo específica para la parte de unión mediante hibridación con la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo hibridable.

En esta forma de realización, cuando la sección de agente de extinción forma parte de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo hibridable, también forma parte del enlazante de oligonucleótido, ya que la sección de agente de extinción forma parte del enlazante de oligonucleótido en la formación del enlazante de oligonucleótido mediante hibridación de su sección de fluorocromo con una sección del oligonucleótido del fluorocromo hibridable específica para la parte de unión inversamente complementaria a ésta. Aquí es preferible disponer la sección de extinción en la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo hibridable, ya que en este caso, en el procedimiento según la invención, cuando entra en contacto una muestra con varias partes de unión con un enlazante de oligonucleótido que presenta una sección de fluorocromo única específica para la parte de unión, y sucesivamente la muestra entra en contacto con un único fluorocromo hibridable en cada caso, la sección de agente de extinción del fluorocromo hibridable puede ser la misma en todos los casos y correspondientemente la sección hibridable del oligonucleótido del agente de extinción hibridable también puede presentar en cada caso la misma secuencia de nucleótidos única e inversamente complementaria a la sección de agente de extinción.

Se ha comprobado que el enlazante de oligonucleótido de cada forma de realización de los conjugados según la invención, en particular de los conjugados de anticuerpo según la invención, gracias a la desactivación específica de la parte fluorocromo, es adecuado para poner la muestra en contacto varias veces sucesivas con conjugados de detección, en procedimientos tanto para analizar células vivas, en particular células animales, como para analizar tejidos, que pueden estar en suspensión o inmovilizados sobre un sustrato.

En general, el fluorocromo está situado en un primer extremo de la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido y correspondientemente el agente de extinción está asociado al extremo de su oligonucleótido, que en la hibridación está situado junto al primer extremo de la sección de agente de extinción. La parte de unión está dispuesta en el segundo extremo del enlazante de oligonucleótido opuesto al primer extremo de la sección de agente de extinción, o el segundo extremo del enlazante de oligonucleótido está libre cuando la parte de unión está asociada al fluorocromo sin enlazante del oligonucleótido intermedio.

Por ejemplo, cuando el primer extremo del enlazante de oligonucleótido es el extremo 3’ de la sección de agente de extinción donde está dispuesta la parte fluorocromo, el agente de extinción está dispuesto preferentemente en el extremo 5’ de su oligonucleótido, o en su extremo 3’ si el primer extremo de la sección de agente de extinción es el extremo 5’ del enlazante de oligonucleótido. Preferentemente, el oligonucleótido del agente de extinción es inversamente complementario a la sección de agente de extinción y el agente de extinción está dispuesto en el extremo opuesto al extremo de la secuencia de nucleótidos de la sección de agente de extinción, de modo que, en caso de un oligonucleótido del agente de extinción inversamente complementario a la sección de agente de extinción, el agente de extinción se puede situar cerca de la parte fluorocromo.

La base para el procedimiento de análisis según la invención consiste, en cada caso, en el enlazante de oligonucleótido que permite inactivar un fluorocromo específico del enlazante de oligonucleótido, en la segunda forma de realización mediante hidrólisis del enlazante y en la primera forma de realización preferente por hibridación específica de un oligonucleótido con una sección de agente de extinción que porta un agente de extinción.

Principalmente, los conjugados de anticuerpo según la invención se pueden utilizar en procedimientos de análisis de muestras biológicas en suspensión o inmovilizadas sobre un soporte que presentan antígenos desnaturalizados, en particular tejidos y células procariotas y eucariotas desnaturalizadas y/o perforadas, principalmente células y tejidos animales.

Por ejemplo, los conjugados según la invención se pueden utilizar en el análisis de analitos en suspensión, incluyendo antígenos unidos a células, por ejemplo en citometrías de flujo para el marcado de células animales vivas, opcionalmente con clasificación de las células marcadas en función de la detección del fluorocromo.

En una forma de realización preferente del procedimiento de análisis según la invención, una muestra biológica inmovilizada sobre un sustrato soporte, en particular una muestra de células animales vivas que, por ejemplo, están inmovilizadas por unión sobre un sustrato soporte revestido, se pone en contacto sucesivamente con un conjugado de detección según la invención. La inmovilización sobre el sustrato soporte, que preferentemente consiste en un portaobjetos de vidrio, se facilita por ejemplo con un revestimiento del sustrato soporte que favorece la adsorción celular, por ejemplo un revestimiento de polilisina. Para los pasos sucesivos de puesta en contacto de la muestra biológica con diferentes composiciones acuosas, el sustrato soporte se cubre preferentemente con una tapa a cierta distancia, por ejemplo una tapa de vidrio paralela al sustrato soporte. Para separar la tapa del sustrato soporte, éste y/o la tapa pueden presentar resaltes que actúan como distanciadores, por ejemplo dos resaltes separados dispuestos aproximadamente paralelos entre sí que conforman un canal de paso entre el sustrato soporte y la tapa. La muestra biológica está inmovilizada o fijada en el canal de paso, concretamente sobre el sustrato soporte y puede entrar en contacto sucesivamente con las composiciones, teniendo lugar la detección del conjugado de anticuerpo que interacciona con un antígeno de la muestra detectando la radiación emitida por la parte fluorocromo y producida como reacción a la radiación aplicada a una longitud de onda de excitación. Preferentemente, después de poner en contacto el conjugado de detección con la muestra, el conjugado de detección no unido se elimina, sustituyendo el medio que rodea la muestra. La eliminación del conjugado de anticuerpo no unido se produce preferentemente haciendo pasar un medio de lavado a través del canal de paso, de modo que en la muestra inmovilizada sólo queda el conjugado de detección unido a la misma y emisor de radiación, mientras que el conjugado de detección no unido se ha eliminado por el lavado de la muestra.

Para inmovilizar muestras biológicas, por ejemplo secciones de tejido, el sustrato soporte puede estar provisto de un marco dispuesto como un resalte en unión positiva sobre el sustrato soporte y que presenta por ejemplo una altura de 0,8 a 5 veces el espesor de capa de la muestra de tejido, preferentemente una altura de 1 a 5 veces el espesor de capa de la muestra de tejido, mientras que, de forma especialmente preferente, la tapa está dispuesta a cierta distancia de la muestra de tejido y del marco. Así, el marco en unión positiva alrededor de una muestra sobre el sustrato soporte posibilita el paso de composiciones acuosas a través del canal de paso formado entre el sustrato soporte y la tapa, lo que permite llevar hasta la muestra de tejido fijada y retirar de la misma composiciones acuosas, por ejemplo soluciones de lavado, y las composiciones que contienen el conjugado de detección según la invención.

Además, las muestras biológicas, en particular células y muestras de tejidos animales, también pueden estar desnaturalizadas y/o perforadas y fijadas sobre un sustrato soporte de forma convencional.

Mediante la inmovilización o fijación de la muestra biológica, el procedimiento de análisis según la invención permite superponer las señales de diferentes conjugados detectadas sucesivamente en el tiempo, en particular representaciones microscópicas que contienen la radiación emitida por los conjugados de la muestra. De forma especialmente ventajosa, la inmovilización y la fijación de la muestra biológica en un canal de paso permiten mantener la muestra en una posición fija en la zona de exploración de un detector, por ejemplo en el campo visual de un microscopio, durante los pasos de detección sucesivos, por ejemplo con conjugados de anticuerpo con partes de anticuerpo diferentes en cada caso, o permiten disponer la muestra reiteradamente en la misma posición con una disposición idéntica del sustrato soporte en la zona de exploración del detector, por ejemplo en el campo visual de un microscopio, por ejemplo cuando los pasos de detección del contacto con diferentes conjugados de anticuerpo se llevan a cabo en posiciones diferentes del sustrato soporte.

Una vez detectado ópticamente el conjugado de anticuerpo unido a la muestra, o la parte fluorocromo del mismo, la parte fluorocromo se puede desactivar o inactivar, de acuerdo con la invención, preferentemente mediante hidrólisis del enlazante de oligonucleótido o poniendo la muestra en contacto con un agente de extinción asociado a un oligonucleótido que presenta secciones inversamente complementarias al enlazante de oligonucleótido. Adicional o alternativamente a la parte fluorocromo unida al enlazante de oligonucleótido, también es posible poner en contacto un fluorocromo hibridable con el conjugado de anticuerpo, lo que conduce a la hibridación específica del fluorocromo con el conjugado de anticuerpo.

Para los fines de la invención, los oligonucleótidos y sus secciones son hibridables en particular cuando forman específicamente un dímero bajo condiciones fisiológicas celulares, por ejemplo en un medio tampón fisiológico celular, preferentemente a 20-37ºC. Un oligonucleótido que es inversamente complementario a una sección de agente de extinción o a una sección de fluorocromo del enlazante de oligonucleótido y que está asociado al agente de extinción o al fluorocromo, respectivamente, designa en particular un oligonucleótido que, en las composiciones acuosas utilizadas durante el procedimiento de detección, por ejemplo PBS (solución salina con tampón fosfato), tampón HE-PES, tampón Tris, preferentemente de pH 6,5 a 7,5 y con concentraciones de sal de 20 a 800 mM de la suma de iones monovalentes y divalentes, forma con el enlazante de oligonucleótido un híbrido de ácido nucleico de cadena doble que, en particular, es específico con respecto a la secuencia. Se trata principalmente de oligonucleótidos con una secuencia inversamente complementaria a una sección del enlazante de oligonucleótido, por ejemplo con una identidad de al menos

un 80%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos de un 95 a un 99%, con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos inversamente complementaria.

En variantes donde el enlazante de oligonucleótido presenta una cadena doble en una sección en la que se pueden hibridar o están hibridadas una sección de enlazante de oligonucleótido y una sección de oligonucleótido asociada a la parte fluorocromo, la sección de fluorocromo y la segunda sección de enlazante de oligonucleótido presentan preferentemente secuencias de ácidos nucleicos inversamente complementarias entre sí que forman un híbrido de ácido nucleico en las composiciones acuosas utilizadas durante el procedimiento de detección, en particular un híbrido de ácido nucleico con una identidad de secuencia inversamente complementaria de al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, de forma especialmente preferente al menos de un 95 a un 99%.

Preferiblemente, el enlazante de oligonucleótido y preferentemente también el oligonucleótido unido al agente de extinción y la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo presentan secuencias de ácidos nucleicos que no están presentes en el ADN y/o el ARN de la muestra a analizar, por ejemplo de la célula animal a analizar, y que preferentemente tienen una diferencia de secuencia de al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10% y de forma especialmente preferente al menos un 20%. Las longitudes preferentes del enlazante de oligonucleótido, del oligonucleótido unido al agente de extinción y de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido del fluorocromo oscilan entre 10 y 150 nt (nucleótidos), preferentemente de 15 a 100 nt, de forma especialmente preferente de 20 a 50 nt, de los que al menos 10 nt, preferiblemente 30 nt y de forma especialmente preferente todos los nt son complementarios entre sí.

Los fluorocromos adecuados se pueden seleccionar de entre el grupo consistente en Cy3, PE, FITC, APC, colorantes Alexa y colorantes Atto; los agentes de extinción adecuados que se pueden adaptar al fluorocromo por ejemplo de entre el grupo que incluye Dabcyl, Dabsyl, Dark-Hole-Quencher, Black-Berry-Quencher y colorantes QSY.

Descripción detallada de la invención

La invención se describe a continuación de forma más detallada por medio de ejemplos y con referencia a las figuras, en las que

Figura 1: una representación esquemática del procedimiento de detección de la primera forma de realización;
Figura 2: una representación esquemática del procedimiento de detección en una variante de la segunda forma de realización;
Figura 3: una representación esquemática del procedimiento de detección de la primera forma de realización en una variante de la primera forma de realización;
Figuras 4a) a d): leucocitos humanos inmovilizados después de su incubación con anticuerpos según la invención, en la imagen microscópica bajo excitación de fluorescencia en los pasos del procedimiento de detección;
Figuras 5a) a d): antígenos libres de células inmovilizados procedentes de una solución de incubación con anticuerpos según la invención, en la imagen microscópica bajo excitación de fluorescencia en los pasos del procedimiento de detección; y
Figura 6: A) imagen microscópica de una muestra biológica con un anticuerpo según la invención y B) imagen microscópica de la misma muestra pero después de hidrólisis del conjugado utilizado en A) e incubación con un segundo conjugado de anticuerpo con otra especificidad de antígeno en la muestra fijada, C) resultados de CF de la muestra celular no tratada, D) resultados de CF de una parte alícuota de la muestra después de su incubación con un anticuerpo según la invención y E) resultados de CF de una parte alícuota de la muestra analizada en D) después de la hidrólisis del enlazante.

La Figura 1 muestra esquemáticamente la estructura de un conjugado de la primera forma de realización según la invención que, como primer reactivo de un kit de ensayo, consiste en la parte de unión 1, la parte fluorocromo 5 y el enlazante de oligonucleótido 4 que las asocia. La parte fluorocromo 5, en este caso Cy3, está unida de forma covalente, por ejemplo a través de compuestos bifuncionales, al primer extremo del enlazante de oligonucleótido 4. La parte de unión 1 está representada esquemáticamente en forma de un anticuerpo IgG que está unido al segundo extremo del enlazante de oligonucleótido 4 mediante un primer reactivo de acoplamiento 2 unido de forma covalente, por ejemplo estreptavidina y mediante de un segundo reactivo de acoplamiento 3, por ejemplo biotina, al primer reactivo de acoplamiento 2. En caso de irradiación de luz (hv) a una longitud de onda de excitación para el fluorocromo 5, la parte fluorocromo 5 emite radiación.

Para la unión del segundo reactivo de acoplamiento 3, el enlazante de oligonucleótido 4 puede presentar en un extremo un dominio aceptor de biotina (DAB). Alternativamente a la unión del enlazante de oligonucleótido 4 con la parte de unión 1 mediante un primer y un segundo reactivo de acoplamiento, la unión puede ser covalente, por ejemplo por derivación de la parte de unión 1 y/o del enlazante de oligonucleótido 4, por

ejemplo formando un enlace éster, amida o tío. Preferentemente, la unión del fluorocromo 5 con el enlazante de oligonucleótido 4 es covalente.

El enlazante de oligonucleótido 4 puede presentar la secuencia de ácidos nucleicos TTT TTT TTT TGT TTT TTT TT (Seq.-ID. nº 1) de 5' a 3', que como sección de agente de extinción 4b sitúa un agente de extinción 6 cerca de la parte fluorocromo 5 mediante el contacto o la hibridación con el oligonucleótido 7 que está asociado al agente de extinción 6. De este modo, la parte fluorocromo 5 se desactiva ópticamente. El oligonucleótido 7 hibridable con la sección de agente de extinción 4b del enlazante de oligonucleótido 4 presenta preferentemente secciones inversamente complementarias a la sección de agente de extinción 4b, por ejemplo con la secuencia de ácidos nucleicos AAA AAA AAA ACA AAA AAA AAA (Seq.-ID nº 2, de 5' a 3').

Para situar el agente de extinción 6 cerca del fluorocromo 5, en particular dentro del radio de Förster de éste, el agente de extinción 6 está unido preferentemente al extremo del oligonucleótido 7 situado junto al fluorocromo 5 durante la formación del híbrido con el enlazante de oligonucleótido 4.

Para el procedimiento de análisis se puede poner en contacto una muestra con el primer reactivo, que consiste en la parte de unión 1, la parte fluorocromo 5 y el enlazante de oligonucleótido 4 unido por su primer extremo a la parte fluorocromo 5. Después de un lavado, se puede analizar la unión específica de la parte de unión 1 con la muestra mediante detección de la parte fluorocromo. El enlazante de oligonucleótido 4 presenta una sección de agente de extinción 4b con la que se puede hibridar un oligonucleótido 7 que está asociado al agente de extinción 5. La parte fluorocromo 5 se desactiva al entrar en contacto el primer reactivo unido a la muestra con un segundo reactivo que presenta un agente de extinción 6 unido a un oligonucleótido 7. El contacto subsiguiente de la muestra con otro primer reactivo permite detectar la parte fluorocromo de éste sin ninguna influencia negativa del primer reactivo previamente en contacto con la muestra, cuyo fluorocromo se ha desactivado por la disposición del agente de extinción 6 cerca del mismo. Como alternativa a la desactivación mediante la disposición específica de un agente de extinción 6 junto al primer reactivo, su parte fluorocromo 5 se puede desactivar eficazmente por hidrólisis del enlazante de oligonucleótido 4 y lavado, tal como muestra esquemáticamente la Figura 2 para la segunda forma de realización.

La Figura 2 muestra esquemáticamente la estructura de un conjugado de la segunda forma de realización según la invención, que consiste en la parte de unión 1, mostrada aquí en forma de un ligando de receptor, y en un fluorocromo 5 unido a ésta mediante un enlazante de oligonucleótido 4 unido de forma covalente a la parte de unión 1. El enlazante de oligonucleótido 4 presenta una cadena doble en la sección donde la segunda sección de oligonucleótido 8 unida al fluorocromo 5 está hibridada con la primera sección de enlazante de oligonucleótido hibridable 4a. Preferentemente, las uniones entre la pieza de unión 1 y la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a, y entre la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 y el fluorocromo 5, están formadas mediante asociación de un primer y un segundo reactivo de acoplamiento unidos en cada caso de forma covalente a un componente, correspondientemente a la Figura 1, o son uniones covalentes.

Dado que la segunda forma de realización en esta variante del enlazante de oligonucleótido 4 que incluye secciones de cadena doble también presenta un enlazante de oligonucleótido 4 hidrolizable con endonucleasa, en este caso el kit de análisis contiene una endonucleasa como segundo reactivo. De forma correspondiente, en este caso el enlazante de oligonucleótido 4 opcionalmente no contiene ninguna sección de agente de extinción 4b.

En el procedimiento de análisis, la muestra se puede poner en contacto con una primera parte del primer reactivo que consiste en la parte de unión con enlazante de oligonucleótido 4 unido, con una primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a que incluye una sección de fluorocromo, y al mismo tiempo o a continuación se puede poner en contacto con una segunda parte que incluye la parte fluorocromo 5 unida a la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 hibridable o hibridada en la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a. Después de eliminar por lavado las partes no unidas a la muestra, la parte de unión 1 unida específicamente se puede detectar por detección de la parte fluorocromo 5 unida a la misma a través del enlazante de oligonucleótido 4 que presenta secciones de cadena doble. Para desactivar la parte fluorocromo 5, el enlazante de oligonucleótido 4 se puede eliminar y en consecuencia desactivar eficazmente poniéndolo en contacto con una endonucleasa (no representada) y eliminando por lavado a continuación la parte de unión 1.

La Figura 3 muestra esquemáticamente la estructura de un primer conjugado de la primera forma de realización según la invención en aquella variante donde el enlazante de oligonucleótido 4 presenta secciones de cadena doble. La parte de unión 1 está unida al enlazante de oligonucleótido 4 que presenta una primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a con sección de fluorocromo, en la que se puede hibridar la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 unido a la parte fluorocromo 5. El enlazante de oligonucleótido 4 presenta correspondientemente la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a con la que se puede hibridar la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 unida al fluorocromo 5, por

ejemplo siendo ésta inversamente complementaria a la primera. Junto a la primera sección de oligonucleótido 4a, el enlazante de oligonucleótido 4 presenta una sección de agente de extinción 4b con la que se puede hibridar, por ejemplo siendo inversamente complementario a la misma, el oligonucleótido 7 unido al agente de extinción 6. Para situar el fluorocromo 5 cerca del agente de extinción, el fluorocromo 5 se une preferentemente al extremo de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 que durante la hibridación con la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a está situada junto a la sección de agente de extinción 4b del enlazante de oligonucleótido 4 con la que se hibrida el oligonucleótido 7 y que porta el agente de extinción 6. Para situar el agente de extinción 6 cerca del fluorocromo 5, en particular dentro del radio de Förster de éste, el agente de extinción 6 se une preferentemente al extremo del oligonucleótido 7 que, durante la formación del híbrido con el enlazante de oligonucleótido 4 o con su sección de agente de extinción 4b, está situado junto a la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a del enlazante de oligonucleótido 4 con la que se puede hibridar la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8 del fluorocromo 5.

Durante la hibridación de la segunda sección de enlazante de oligonucleótido 8, que está unida al fluorocromo 5, con la primera sección de enlazante de oligonucleótido 4a, la parte de unión 1 se asocia con el fluorocromo 5 de modo que, al irradiarla con luz hv a una longitud de onda de excitación, emite una fluorescencia. De acuerdo con la invención, se mide esta emisión para detectar el conjugado.

La adición de un agente de extinción hibridable 6 está asociado a un oligonucleótido 7 complementario a una sección de agente de extinción 4b del enlazante de oligonucleótido 4 conduce a la desactivación del fluorocromo 5 gracias al posicionamiento del agente de extinción 6 cerca del fluorocromo 5.

Tal como muestran las Figuras 1 a 3, los conjugados según la invención pueden presentar uno o más enlazantes de oligonucleótido 4 asociados a la parte de unión 1.

Ejemplo 1: Preparación de un conjugado de anticuerpo-fluorocromo con un enlazante de oligonucleótido

Como ejemplo de un conjugado de la primera forma de realización según la invención, un anticuerpo antirratón-CD4 (clon Sk1.5, de BD Bioscience) se incubó con estreptavidina y el conjugado de estreptavidina-anticuerpo formado se purificó. Como enlazante de oligonucleótido se utilizó un ADN de cadena simple de Seq.-ID nº 1 producido sintéticamente, en cuyo extremo 3' estaba acoplada una biotina y en cuyo extremo 5' estaba acoplado el fluoróforo Cy3 (de Molecular Probes Inc.). Para unir el enlazante de oligonucleótido con el anticuerpo utilizado como parte de unión, el oligonucleótido biotinilado se incubó con el anticuerpo acoplado con estreptavidina y a continuación se purificó por cromatografía en gel. La unión entre la estreptavidina y la biotina dio como resultado un conjugado de estructura anticuerpo-biotina-estreptavidina-biotina-enlazante de oligonucleótido-fluorocromo.

Ejemplo 2: Detección de un antígeno sobre la superficie de células humanas

Como ejemplo de una muestra biológica se aislaron leucocitos humanos de sangre periférica y se inmovilizaron sobre un portaobjetos de vidrio con un revestimiento adhesivo celular (polilisina, de Karl Roth GmbH). El portaobjetos presentaba dos resaltes paralelos separados a modo de distanciadores que portaban una tapa de vidrio paralela al portaobjetos. Las aberturas resultantes en los extremos del portaobjetos se utilizaron como aberturas de entrada y salida para aportar y retirar soluciones.

Después de retirar los componentes no unidos por lavado con una solución salina fisiológica de tampón fosfato (PBS, pH 7,4), las células se analizaron microscópicamente (microscopio Axioplan 2e, Zeiss, con ajuste de platina portaobjetos y enfoque motorizados, lámpara de mercurio HBO 100 para la excitación, filtro para PE o FITC, objetivo de inmersión Plan-Neofluar 16x/0,50 y cámara CCD Axiocam MRm para el registro) bajo radiación a una longitud de onda de excitación para determinar la fluorescencia de fondo. La Figura 4a) muestra la imagen microscópica obtenida, en la que las células identificadas por el microscopio óptico están marcadas con círculos. A continuación se añadió conjugado de anticuerpo de acuerdo con el Ejemplo 1, que contenía anticuerpo anti-CD4 como parte de anticuerpo. La Figura 4 muestra el mismo lugar que la Figura 4a) en el caso de la detección de fluorescencia de la luz emitida por el fluorocromo Cy3. Esta imagen muestra que algunos conjugados según la invención son adecuados para la detección específica de antígenos celulares, ya que las células CD4-positivas están marcadas selectivamente.

A continuación se añadió a las células, a través de la abertura de entrada, un oligonucleótido unido con un agente de extinción, en concreto el oligonucleótido de Seq.-ID nº 2 con secciones inversamente complementarias a la Seq.-ID nº 1, en cuyo extremo 3' estaba unido el agente de extinción BHQ2 (Black-Hole-Quencher, de BioSearch, Novato, EE.UU.). Después de 1 minuto de incubación a temperatura ambiente, se añadieron a través de la abertura de entrada 100 µl de PBS para el lavado y se retiró aproximadamente el mismo volumen por la abertura de salida. La figura 4c) muestra una nueva imagen de microscopía de fluorescencia del mismo lugar. Este resultado muestra claramente que la actividad óptica del

fluorocromo del conjugado según la invención se puede desactivar de forma selectiva. Alternativamente a la adición del agente de extinción que porta un oligonucleótido, para la desactivación de la parte fluorocromo también se podía añadir DNAsa seguida de un lavado con aproximadamente 100 a 200 µl de PBS con el fin de hidrolizar el enlazante de oligonucleótido del conjugado y eliminar el fluorocromo.

A continuación, las mismas células inmovilizadas se pusieron en contacto con un conjugado de anticuerpo preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, pero con un anticuerpo antirratón-CD19. La Figura 4d) muestra la imagen de microscopía de fluorescencia, que evidencia que algunos conjugados según la invención son adecuados para la detección sucesiva de antígenos, en cada caso con una desactivación específica de la parte fluorocromo de un conjugado antes de poner la muestra en contacto con otro conjugado. La fluorescencia del conjugado anti-CD19 también se pudo desactivar, es decir, eliminar, mediante la adición del mismo agente de extinción que portaba el oligonucleótido inversamente complementario al enlazante de oligonucleótido, o mediante la adición de DNAsa.

Ejemplo 3: Detección sucesiva de antígenos solubles después de inmovilización sobre un sustrato soporte

Se utilizaron conjugados según la invención para el análisis de analitos libres de células, por ejemplo para detectar IgG2a unida superficialmente. Sobre un portaobjetos de vidrio revestido con polilisina, tal como el utilizado en el Ejemplo 2, se permitió que se uniera inmunoglobulina Ig2Ga kappa de rata marcada con ficoeritrina. A continuación, los sitios de unión libres del portaobjetos se saturaron con seroalbúmina bovina (3% en PBS). La figura 5a) muestra una imagen de microscopía de fluorescencia en la que se puede observar la fluorescencia de moléculas individuales. Después se determinó la posición de la IgG2a marcada y se almacenó en memoria en relación con el portaobjetos.

Para extinguir la fluorescencia propia de la inmunoglobulina de rata marcada con ficoeritrina, ésta se irradió a la longitud de onda de excitación específica (488 nm). La imagen microscópica de moléculas individuales y de fluorescencia de la Figura 5b) muestra que la actividad de fluorescencia de la ficoeritrina se extinguió con dicha radiación.

A continuación se añadió un conjugado de anticuerpo preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, pero con un anticuerpo anti-IgG2a. El conjugado no unido se eliminó por lavado con PBS. La siguiente imagen de microscopía de fluorescencia de la Figura 5c) muestra que el conjugado marcó las mismas posiciones que en la Figura 5a), es decir, estos conjugados también son adecuados para la identificación de analitos libres de células.

La incubación subsiguiente con el agente de extinción asociado a un oligonucleótido inversamente complementario del Ejemplo 2 condujo a la desactivación de la fluorescencia del conjugado según la invención específica para el analito. La Figura 5d) muestra una imagen de microscopía de fluorescencia en la que se puede ver claramente la extinción de la fluorescencia de los conjugados. Como alternativa al agente de extinción, para desactivar la fluorescencia del conjugado también se podía añadir DNAsa y lavar los analitos inmovilizados.

Ejemplo 4: Hidrólisis de un conjugado de anticuerpo según la invención en células humanas inmovilizadas y suspendidas (CF)

En este ejemplo se pudo demostrar que era posible desactivar la parte fluorocromo de un conjugado de anticuerpo según la invención obtenible de acuerdo con el Ejemplo 1, cuya parte de anticuerpo consistía en un anticuerpo anti-CD4 y cuya parte fluorocromo consistía en Cy3, estando estas partes asociadas a un enlazante de oligonucleótido (Seq.-ID nº 1), en inmunocitos vivos inmovilizados y en inmunocitos vivos suspendidos.

Se incubaron inmunocitos humanos inmovilizados con el conjugado de anticuerpo correspondientemente al Ejemplo 2. La Figura 6 A) muestra la imagen microscópica de la fluorescencia detectada. A continuación, la muestra se trató poniéndola en contacto con DNAsa para separar la parte fluorocromo. La muestra inmovilizada se lavó para eliminar el fluorocromo no unido. Alternativamente se añadió el agente de extinción hibridable utilizado en el Ejemplo 2 con oligonucleótido inversamente complementario a la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido, lo que también condujo a la desactivación del fluorocromo.

A continuación, la muestra se incubó con un conjugado de anticuerpo con el mismo enlazante de oligonucleótido, pero con una parte de anticuerpo anti-CD19 y PE como parte fluorocromo. La Figura 5 B) muestra la imagen microscópica de las emisiones detectadas, pudiendo verse claramente que las células detectadas con el conjugado de anticuerpo anti-CD4 (identificadas en cada caso con círculos dibujados manualmente) no produjeron ninguna señal de fluorescencia en el análisis con conjugado de anticuerpo anti-CD19.

Para comprobar la desactivación efectiva de la parte fluorocromo de un conjugado de anticuerpo mediante separación de la parte fluorocromo, se analizaron por CF una parte alícuota de células sin conjugado de anticuerpo, una parte alícuota de células después de incubación con conjugado de anticuerpo (anticuerpo anti-CD4-enlazante de oligonucleótido-Cy3) y una parte alícuota de éstas después de hidrólisis del enlazante por incubación con DNAsa. Los resultados se muestran en la Figura 7C) en el caso de las células no incubadas con conjugado de anticuerpo, D) en el caso de las células incubadas con conjugado de anticuerpo anti-CD4 y E) después de hidrólisis del enlazante de células incubadas con conjugado de anticuerpo anti-CD4. Los análisis de CF muestran claramente que el conjugado de anticuerpo según la invención pudo detectar efectivamente el marcador superficial y que el conjugado de anticuerpo unido a las células genera una señal detectable de radiación emitida, conduciendo la hidrólisis del enlazante de oligonucleótido con lavado subsiguiente a la desactivación completa de la parte fluorocromo. También se obtuvieron resultados análogos por adición del agente de extinción hibridable con un oligonucleótido inversamente complementario a la sección de agente de extinción del enlazante de oligonucleótido.

Ejemplo 5: Utilización de los conjugados para la clasificación celular iterativa mediante CF

Se incubaron células de bazo de ratón en suspensión en PBS con un conjugado de anticuerpo anti-CD3 preparado según el Ejemplo 1 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas con fluorescencia, en este caso linfocitos T coadyuvantes, se separaron de las demás células por citometría de flujo (FACXAria, BD Biosciences). Después, los linfocitos T coadyuvantes se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en PBS con el agente de extinción con oligonucleótido utilizado en el Ejemplo 2. El análisis posterior por CF mostró que el fluorocromo había sido desactivado. Después de separar el agente de extinción, los linfocitos T coadyuvantes pudieron ser analizados y clasificados con un segundo conjugado de anticuerpo que presentaba una parte de anticuerpo diferente, pero el mismo enlazante de oligonucleótido y el mismo fluorocromo.

Lista de símbolos de referencia

1	Parte de unión
2	Primer reactivo de acoplamiento
3	Segundo reactivo de acoplamiento
4	Enlazante de oligonucleótido
4a	Sección de fluorocromo
4b	Sección de agente de extinción
5	Fluorocromo
6	Agente de extinción
7	Oligonucleótido inversamente complementario a la sección de agente de extinción 4b del enlazante de oligonucleótido 4
8	Segunda sección de enlazante de oligonucleótido hibridable con la sección de fluorocromo del enlazante de oligonucleótido

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medizinische Hochschule Hannover Hennig, Dr., Christian Hansen, Prof. Dr., Gesine

<120> Conjugado de detección y procedimiento de análisis

<130> M1009PCT

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> /nota="enlazante de oligonucleótido, Seq.-ID nº 1"

<400> 1
ttttttttt gttttttttt 20

<210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> /nota="oligonucleótido hibridante, Seq.-ID nº 2"

<400> 2
aaaaaaaaaa caaaaaaaaa a 21

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /nota="aptámero sintético, Seq.-ID nº 3"

<400> 3
gcagttgatc ctttggatac cctgg 25

<210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> /nota=" aptámero sintético, Seq.-ID nº 4"

<400> 4
ucguaugggu gggaucggga agggcuacga aca 33

REIVINDICACIONES

1. Combinación de reactivos para detectar analitos en muestras, que incluye un primer reactivo que presenta un conjugado de detección con una parte de unión (1) específica para un analito, una parte fluorocromo (5) asociada a la parte de unión (1) y un enlazante de oligonucleótido (4) asociado por su primer extremo a la parte fluorocromo y que, al menos en una sección, consiste en un oligonucleótido que presenta en su secuencia de ácidos nucleicos una sección de agente de extinción (4b) y un segundo reactivo que presenta un agente de extinción (6) asociado al extremo de un oligonucleótido (7) que es hibridable con la sección de agente de extinción (4b) y que durante la hibridación con el enlazante de oligonucleótido (4) se sitúa junto al primer extremo de éste.

2. Combinación según la reivindicación 1, caracterizada porque el enlazante de oligonucleótido (4) está asociado a la parte de unión (1) a través de su segundo extremo, que está situado en posición opuesta al primer extremo.

3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el enlazante de oligonucleótido (4) presenta una primera sección de enlazante de oligonucleótido (4a) asociada a la parte de unión (1), presentando la primera sección de enlazante de oligonucleótido (4a) en su secuencia de ácidos nucleicos una sección de fluorocromo (4a), y porque la parte fluorocromo (5) está asociada a la segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8) hibridable con la sección de fluorocromo (4a).

4. Combinación según la reivindicación 3, caracterizada porque la segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8) que está asociada a la parte fluorocromo (5) incluye la sección de agente de extinción (4b).

5. Combinación según la reivindicación 4, caracterizada porque incluye al menos dos conjugados de detección que presentan en cada caso secciones de fluorocromo (4a) con secuencias de nucleótidos idénticas o similares con las que se puede hibridar bajo condiciones fisiológicas la misma segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8).

6. Combinación según la reivindicación 4, caracterizada porque incluye al menos dos conjugados de detección que presentan en cada caso secciones de fluorocromo (4a) con secuencias de nucleótidos idénticas o similares con las que se puede hibridar bajo condiciones fisiológicas la misma segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8).

7. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque incluye al menos dos conjugados de detección que presentan en cada caso secciones de agente de extinción (4b) con secuencias de nucleótidos únicas.

8. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque incluye al menos dos conjugados de detección que presentan en cada caso secciones de agente de extinción (4b) con secuencias de nucleótidos idénticas o similares con las que se puede hibridar bajo condiciones fisiológicas el mismo oligonucleótido (7) asociado al agente de extinción (6).

9. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el segundo reactivo no consiste en un agente de extinción (6) asociado al oligonucleótido (7) y opcionalmente el enlazante de oligonucleótido (4) no presenta ninguna sección de agente de extinción (4b), y porque el segundo reactivo de la combinación es una nucleasa.

10. Combinación según la reivindicación 9, caracterizada porque el enlazante de oligonucleótido (4) presenta una secuencia de reconocimiento para una restrictasa, y la nucleasa es una restrictasa específica para la secuencia de reconocimiento.

11. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el enlazante de oligonucleótido (4) y/o el oligonucleótido (7) asociado al agente de extinción (6) consisten, independientemente entre sí, en un ácido oligo-ribonucleico (ARN) de cadena simple, un ácido oligo-desoxirribonucleico (ADN) o un ácido oligo-peptidonucleico (APN).

12. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, caracterizada porque la primera sección de enlazante de oligonucleótido (4a) del enlazante de oligonucleótido (4) y/o la segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8) que se puede hibridar con la primera y que está asociada a la parte fluorocromo (5) consisten, independientemente entre sí, en un ácido oligo-ribonucleico (ARN) de cadena simple, un ácido oligo-desoxirribonucleico (ADN) o un ácido oligo-peptidonucleico (APN).

13. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la parte de unión (1) está asociada con dos o más enlazantes de oligonucleótido (4).

14. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la parte de unión (1) se selecciona de entre el grupo consistente en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos formadores de paratopos, lectinas, aptámeros, péptidos específicos para MHCI o MHCII predeterminados, tetrámeros MHC, biotina y avidina.

15. Utilización de una combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el análisis de muestras biológicas, caracterizada por el contacto sucesivo de la muestra con un conjugado de detección que presenta una primera especificidad de analito, el contacto de la muestra con el segundo reactivo y el contacto de la muestra con un conjugado de detección que presenta una segunda especificidad de analito.

16. Procedimiento para el análisis de muestras biológicas, caracterizado por la producción de una combinación según una de las reivindicaciones 1 a 14 en contacto con la muestra.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, que incluye los pasos de poner en contacto una muestra biológica con un conjugado de detección que presenta una parte de unión (1) con una primera especificidad para un primer analito, una parte fluorocromo (5) asociada a la parte de unión (1) y un enlazante asociado a través de su primer extremo a la parte fluorocromo (5); detectar la radiación emitida por la parte fluorocromo (5), desactivar la parte fluorocromo (5), caracterizado porque el enlazante es un enlazante de oligonucleótido (4) que, al menos en una sección, es un oligonucleótido que presenta en su secuencia de ácidos nucleicos una sección de agente de extinción (4b), y porque la desactivación de la parte fluorocromo (5) se lleva a cabo poniendo en contacto el conjugado de detección con un agente de extinción (6) asociado al extremo de un oligonucleótido (8) que es hibridable con la sección de agente de extinción (4b) y que durante la hibridación con el enlazante de oligonucleótido (4) se sitúa junto al primer extremo de éste.

18. Procedimiento según la reivindicación 16 o 17, caracterizado por el contacto sucesivo de la muestra con un conjugado de detección que presenta una primera especificidad de analito, el contacto de la muestra con un agente de extinción específico para el primer conjugado de detección y el contacto de la muestra con un conjugado de detección que presenta una segunda especificidad de analito.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado porque la parte fluorocromo (5) y el enlazante de oligonucleótido (4) de los conjugados de detección utilizados en contactos sucesivos son idénticos entre sí en cada caso y el agente de extinción (6) es en cada caso el mismo y presenta el mismo oligonucleótido (7).

20. Procedimiento según la reivindicación 16 o 17, caracterizado porque, en lugar de emplear un contacto con un agente de extinción, la desactivación de la parte fluorocromo (5) se lleva a cabo mediante el contacto del conjugado de detección con una nucleasa y la eliminación subsiguiente de los componentes no unidos.

21. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizado porque el enlazante de oligonucleótido (4) presenta una primera sección de enlazante de oligonucleótido (4a) asociada a la parte de unión (1) y que presenta en su secuencia de nucleótidos una sección de fluorocromo (4a), y porque el conjugado de unión se produce poniendo en contacto la sección de fluorocromo (4a) con una parte fluorocromo (5) que está asociada a una segunda sección de enlazante de oligonucleótido (8) hibridable con la sección de fluorocromo.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado porque la muestra se pone en contacto simultáneamente con al menos dos conjugados de detección cuyas secciones de fluorocromo (4a) son únicas en cada caso.

23. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 22, caracterizado porque la muestra se pone en contacto simultáneamente con al menos dos conjugados de detección cuyas secciones de agente de extinción (4b) son únicas en cada caso.

24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 23, caracterizado porque los analitos están fijados sobre un sustrato de soporte.

25. Procedimiento según la reivindicación 24, caracterizado porque el sustrato de soporte forma parte de un canal de paso en el que están dispuestos los analitos de modo que alrededor de los mismos pueden fluir composiciones acuosas.

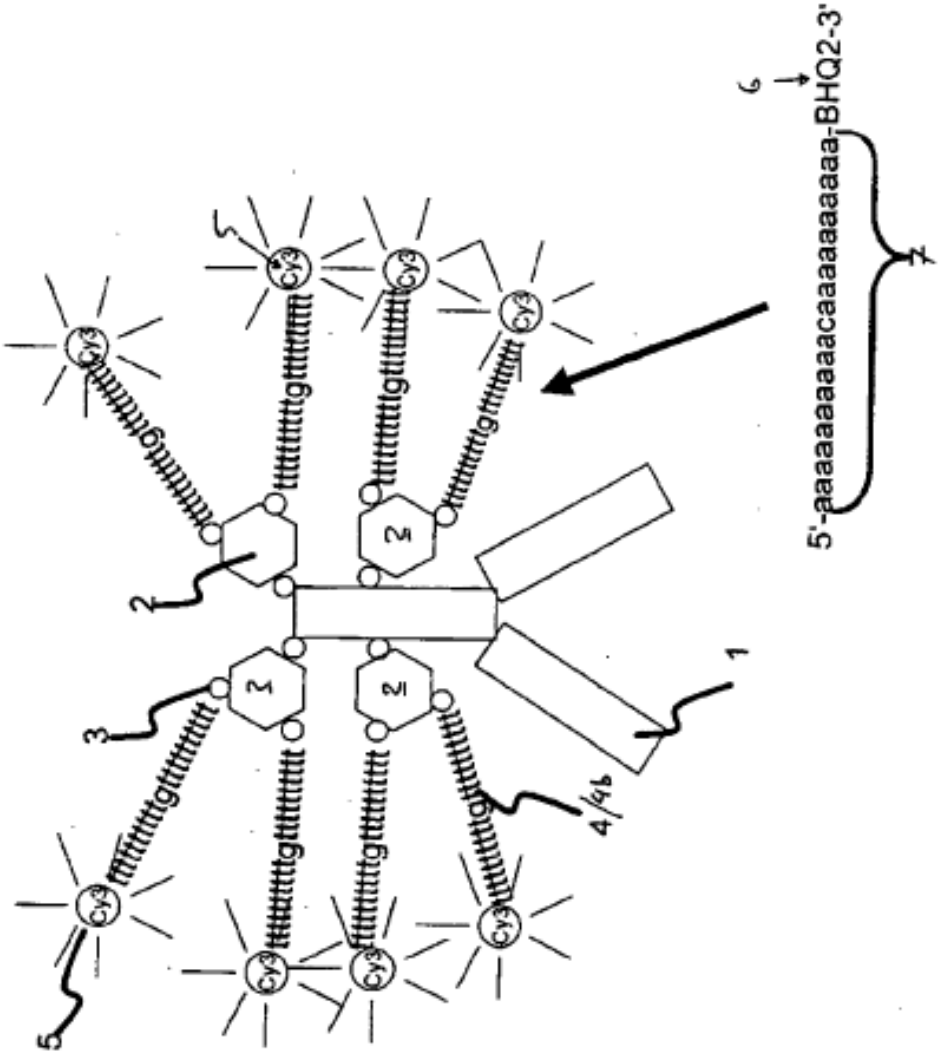

Fig. 1

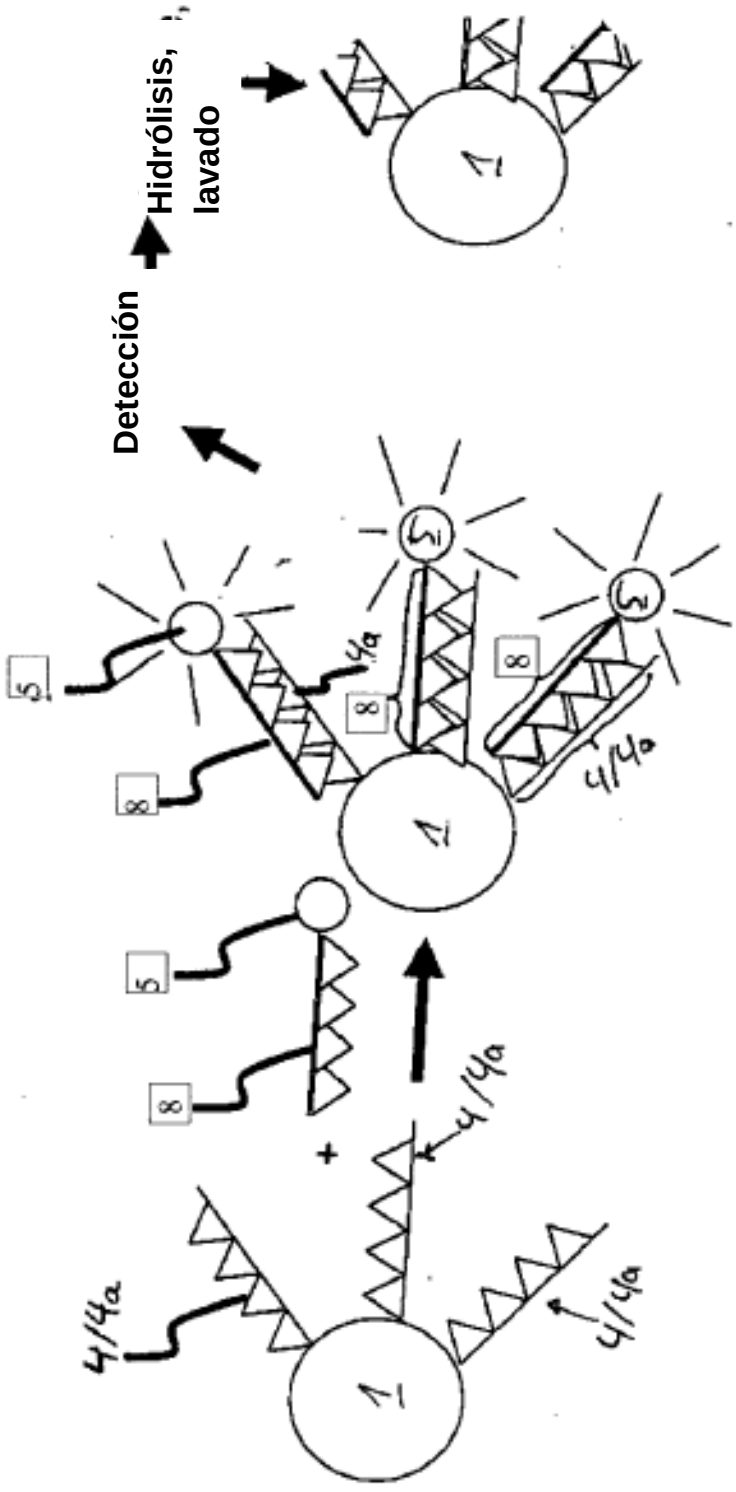

Fig. 2

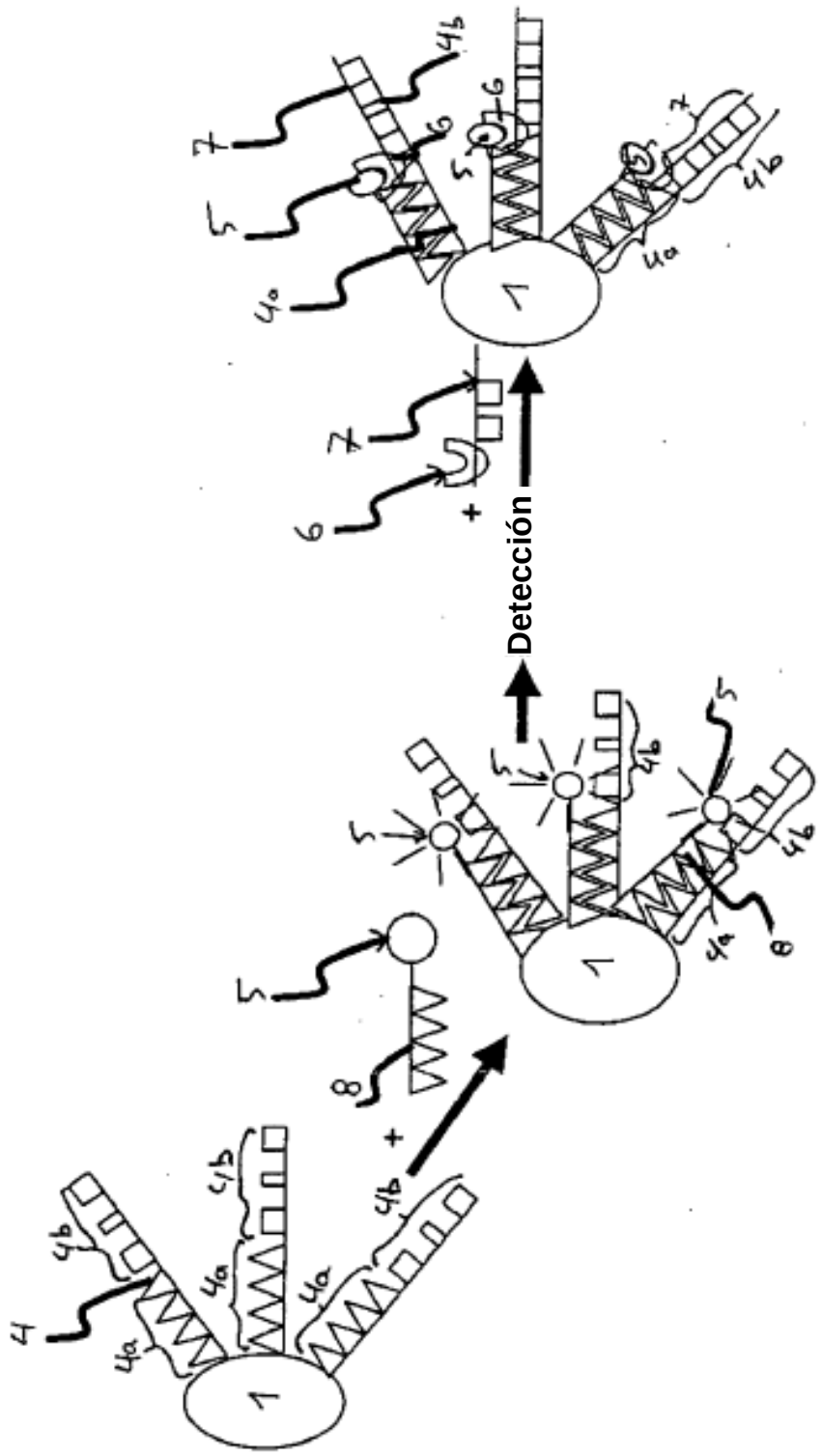

Fig. 3

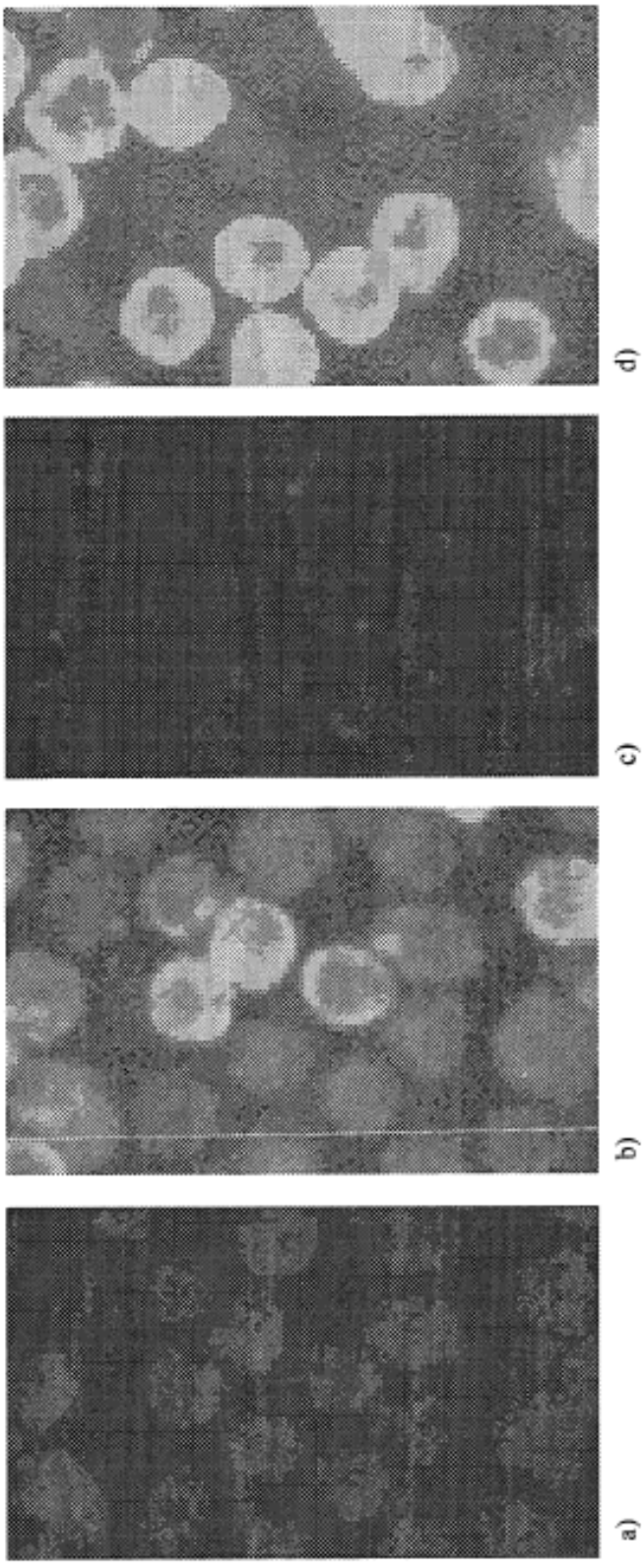

Fig. 4

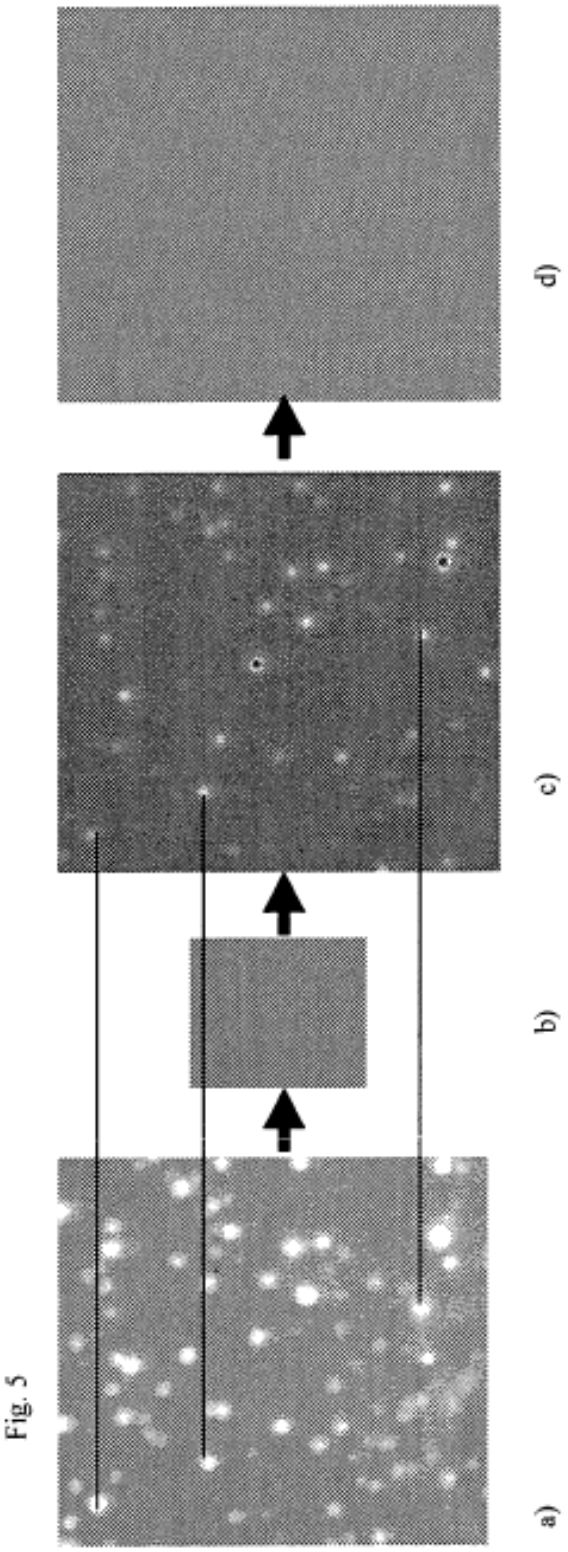

Fig. 5
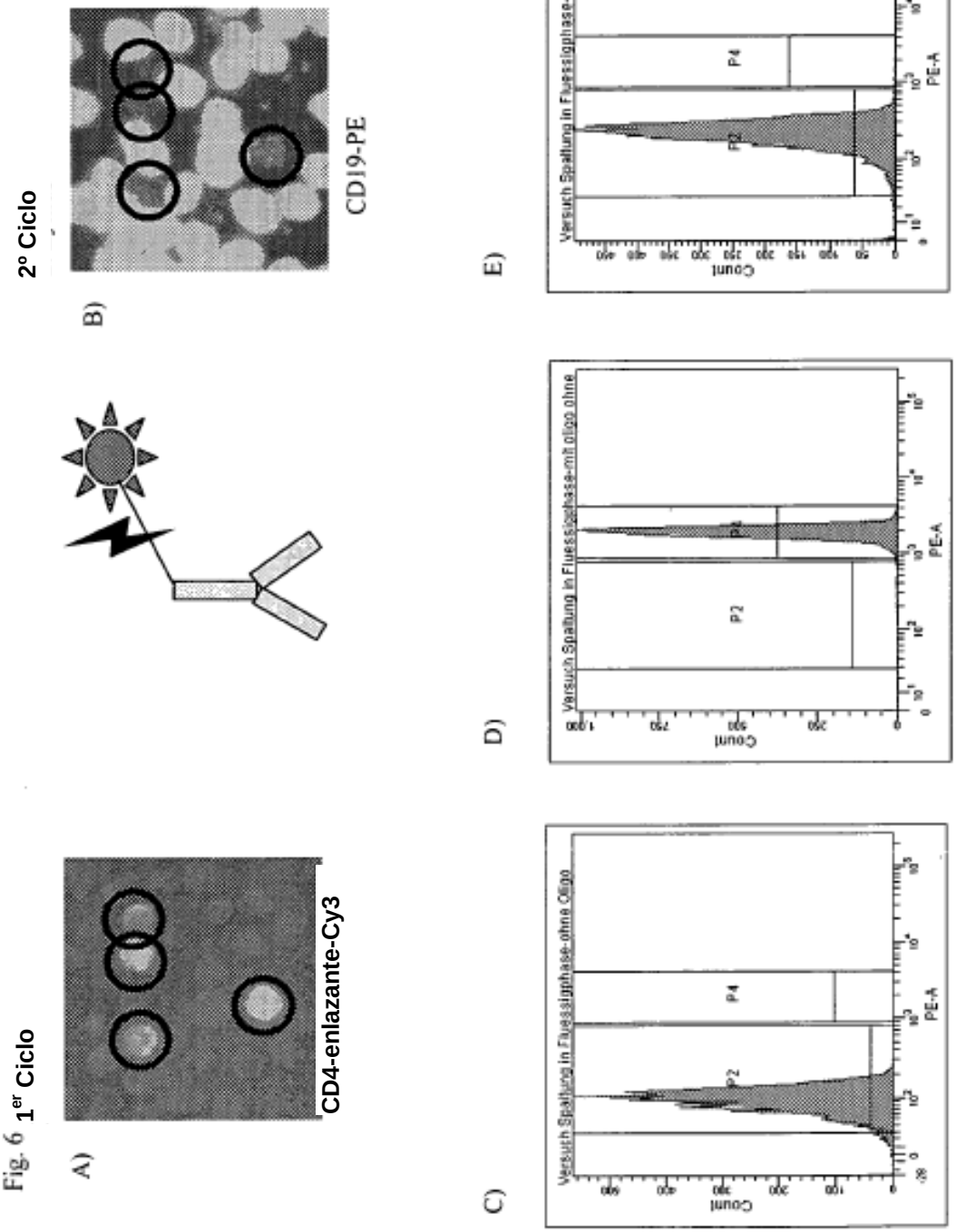
Fig. 6 1er Ciclo