

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 969**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008 E 08761286 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2167965**

54 Título: **Procedimiento para la detección de analitos**

30 Prioridad:

22.06.2007 DE 102007029766
04.08.2007 DE 102007037068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.08.2013

73 Titular/es:

B.R.A.H.M.S GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 25
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS y
STRUCK, JOACHIM

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 420 969 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

Procedimiento para la detección de analitos.

5 El objetivo de la presente invención es un procedimiento para la detección de analitos de muestras biológicas que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- 10 a) proporcionar una pareja de unión reversible 1 inmovilizada en una fase sólida, a la que está unida de manera reversible un ligando de analito a través de una pareja de unión reversible 2 unida al ligando de analito, inmovilizándose el ligando de analito mediante la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2,
- 15 b) añadir la muestra biológica y unir el analito al ligando de analito inmovilizado de manera reversible en el caso de que la muestra biológica contenga el analito,
- 20 c) separar la muestra biológica,
- d) añadir un tampón de separación, que rompe la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2, manteniéndose opcionalmente la unión del analito al ligando de analito, y conteniendo el tampón de separación un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich, y
- e) detectar el analito en el tampón de separación en el caso de que la muestra biológica contenga el analito o establecer la ausencia del analito en el caso de que la muestra biológica no contenga el analito.

25 Se han desarrollado procedimientos de prueba rápida o de *point-of-care* (POC, en el punto de atención) en diversas tecnologías (1). Sin embargo, muy pocos de éstos han conseguido establecerse en el mercado.

30 Los procedimientos de prueba rápida establecidos hoy en día, tal como por ejemplo el sistema TRIAGE (Biosite, San Diego, EE.UU.), pero en particular el procedimiento más extendido, la inmunocromatografía, presentan de manera desventajosa con respecto a los inmunoensayos clásicos (ya sean de operación manual o automatizada) una menor sensibilidad analítica así como una precisión reducida, pero de manera ventajosa pueden procesar, en todo caso en formas de realización adecuadas, muestras de sangre completa sin procesar (2)-(7).

35 Las desventajas se basan sobre todo en la dependencia de la matriz de la muestra de los procedimientos y la limitación del volumen de muestra que puede utilizarse.

40 Por tanto, el objetivo de la presente invención es desarrollar un procedimiento que puede realizarse entre otros como prueba rápida, que pueda procesar muestras de sangre completa sin procesar y que presente precisión y sensibilidad analítica, que sea comparable con las de los inmunoensayos clásicos.

El objetivo de la presente invención es en particular la utilización de un sistema de unión reversible según la invención para la inmovilización de un ligando específico para un analito, por ejemplo un anticuerpo anti-PCT.

45 Por consiguiente, el objetivo de la presente invención es un procedimiento para la detección de analitos de muestras biológicas que comprende las siguientes etapas de procedimiento:

- 50 a) proporcionar una pareja de unión reversible 1 inmovilizada en una fase sólida, a la que está unida de manera reversible un ligando de analito a través de una pareja de unión reversible 2 unida al ligando de analito, inmovilizándose el ligando de analito mediante la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2,
- b) añadir la muestra biológica y unir el analito al ligando de analito inmovilizado de manera reversible en el caso de que la muestra biológica contenga el analito,
- 55 c) separar la muestra biológica,
- d) añadir un tampón de separación, que rompe la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2, manteniéndose opcionalmente la unión del analito al ligando de analito, y conteniendo el tampón de separación un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich, y
- 60 e) detectar el analito en el tampón de separación en el caso de que la muestra biológica contenga el analito o establecer la ausencia del analito en el caso de que la muestra biológica no contenga el analito.

65 El experto en la materia tiene claro que entre la etapa b) y c) debe respetarse un cierto tiempo de incubación. El tiempo de incubación debe ascender a no menos de 30 s y no más de 24 h, en el contexto de un procedimiento de prueba rápida se prefiere especialmente un tiempo de incubación de entre 5 y 15 min. El proceso de separación

según la etapa d) puede ascender preferentemente a hasta 24 h, en el contexto de un procedimiento de prueba rápida el proceso de separación es preferentemente más largo de 15 s y más corto de 15 min., preferentemente de entre 5 y 15 min.

5 La unión del analito al ligando de analito se mantiene o no durante y/o tras la separación según d). Ambas opciones son concebibles según la invención. Preferentemente durante y/o tras la adición del tampón de separación según d) se mantiene la unión entre el analito y el ligando de analito. La unión se mantiene preferentemente en al menos el 90% de las moléculas de analito. En caso de que la unión no se mantenga, preferentemente se produce de nuevo en un momento posterior. Lo más preferentemente en el momento de la detección existe unión entre el analito y el
10 ligando de analito, es decir, que o bien se mantiene durante el proceso de separación o bien se produce de nuevo.

En una forma de realización preferida el ligando de analito es un anticuerpo anti-analito.

15 En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención el líquido biológico es una muestra de sangre completa sin procesar.

Según la invención la pareja de unión reversible inmovilizada 1 puede inmovilizarse directamente o por medio de una proteína portadora. Una proteína portadora a modo de ejemplo es BSA (albúmina sérica bovina). El experto en la materia conoce proteínas portadoras adecuadas.

20 Según la invención son adecuadas diferentes parejas de unión, que pueden formar uniones firmes, pero en ciertas condiciones pueden liberar esta unión y por consiguiente representan un "sistema de unión reversible". En este caso son de especial interés los sistemas de unión en los que la unión puede desestabilizarse mediante condiciones relativamente suaves, es decir condiciones que no afectan negativamente de manera esencial a la conformación de
25 proteínas, en especial anticuerpos, y su unión con un antígeno.

El empleo de tales sistemas de unión reversible se conoce en relación con las posibilidades de purificación de proteínas recombinantes a partir de mezclas complejas de proteínas tales como por ejemplo extractos celulares. Por medio de tecnología de ADN recombinante se añade en este contexto a la secuencia de ADNc que codifica para la
30 proteína de interés una secuencia, que codifica para una denominada etiqueta ("tag"), de modo que se expresa una proteína alargada en una "etiqueta". A través de una pareja de unión inmovilizada en una fase sólida para la "etiqueta" puede unirse entonces selectivamente la proteína con "etiqueta" de la mezcla de proteínas y a continuación separarse de nuevo de la fase sólida mediante una desestabilización específica de la unión de
35 "etiquetas". La proteína de interés se encuentra entonces enriquecida o pura en disolución. Revisiones con respecto a "etiquetas" comunes, parejas de unión inmovilizadas correspondientes y procedimientos de desestabilización específicos se encuentran por ejemplo en (8)-(10).

Tales sistemas de unión pueden utilizarse en el contexto de la presente invención como parejas de unión.

40 En el contexto del procedimiento según la invención el par de unión de parejas de unión reversible 1 y 2 puede seleccionarse en particular de uno de los siguientes pares de unión:

- a) oligómeros peptídicos cargados positiva y negativamente,
- 45 b) péptido/proteína de unión a Ca^{2+} y anticuerpo, que se une al péptido/la proteína con mayor afinidad cuando el péptido/la proteína se ha unido al Ca^{2+} ,
- c) oligohistidina (por ejemplo 6His) y Ni-NTA,
- 50 d) biotina y avidina o estreptavidina o neutravidina.

Ahora se presentan brevemente algunos sistemas de unión reversible, que se encuentran en el contexto de la presente invención:

55 Un ejemplo de un péptido/una proteína de unión a Ca^{2+} y un anticuerpo, que se une al péptido/la proteína con mayor afinidad cuando el péptido/la proteína se ha unido al Ca^{2+} , es el sistema FLAG/M1, siendo el péptido/la proteína de unión a Ca^{2+} un péptido FLAG y el anticuerpo un anticuerpo M1. En otro sistema el péptido/proteína de unión a Ca^{2+} es un péptido de la proteína C y el anticuerpo un anticuerpo HPC4.

60 a) FLAG/M1

Por consiguiente, un ejemplo es la unión entre el anticuerpo monoclonal M1 (también descrito como 4E11) y el denominado péptido FLAG. Este péptido puede unirse a calcio²⁺ y adopta de este modo una determinada conformación. Sólo esta conformación se une eficazmente a M1. Mediante la adición de agentes complejantes de calcio²⁺ tales como por ejemplo EDTA se extrae calcio²⁺ del péptido, el péptido adopta otra conformación, con lo que
65 el anticuerpo M1 reduce drásticamente su afinidad por el péptido; patente US 4.851.341 (11).

b) Proteína C/HPC4

5 Otro ejemplo análogo de un par de unión de este tipo es un péptido derivado de proteína C humana, que igualmente puede adoptar una conformación dependiente de calcio²⁺, y el anticuerpo monoclonal HPC4 (12).

c) Ni²⁺-NTA/ 6 His

10 Otro ejemplo es el sistema Ni²⁺-NTA/ 6 His, que puede desestabilizarse específicamente mediante la adición de imidazol (13).

d) Oligómeros peptídicos cargados

15 Otro ejemplo es un par de unión de oligómeros peptídicos cargados positiva o negativamente, tal como por ejemplo oligo-Lys u oligo-Asp, cuya unión entre sí puede desestabilizarse mediante el aumento de la fuerza iónica. Como par de unión se describe un oligómero peptídico cargado en relación con una matriz de intercambio iónico; esta unión también puede desestabilizarse mediante el aumento de la fuerza iónica (14)-(16).

20 Además de sistemas de unión reversible, en los que una de las parejas de unión está integrada en una proteína recombinante, también se conocen sistemas, en los que una de las parejas de unión se conjuga químicamente con la proteína que debe inmovilizarse. En este caso puede mencionarse, por ejemplo, el sistema biotina/avidina. La biotina puede conjugarse, por ejemplo, en forma de un éster de NHS con grupos amina primaria de una proteína (17). Este sistema de unión también puede desestabilizarse mediante la adición de un exceso de biotina, sin embargo sólo en condiciones drásticas tales como temperatura aumentada y tiempo de incubación largo (18). Sin embargo, se describe una variante de este sistema, que utiliza la denominada avidina monomérica; tras la saturación de sitios de unión "no reversibles" con biotina, los sitios de unión "reversibles" restantes son adecuados para unirse a una proteína biotinilada, que después puede liberarse en condiciones suaves por medio de biotina del sitio de unión (19).

30 Las "etiquetas" peptídicas, tal como se describió anteriormente para proteínas recombinantes, también deben poder conjugarse químicamente con una proteína, con lo que la proteína así derivatizada puede suministrarse después a una unión reversible. En el contexto de la presente invención debe considerarse la conjugación química como la variante preferida de la derivatización de proteínas, dado que el grado de derivatización puede controlarse y la conjugación química es comparativamente económica y ahorra tiempo.

35 Todos los ejemplos mencionados hasta el momento de sistemas de unión reversible se basan en una interacción no covalente de las parejas de unión. Sin embargo, en el contexto de la presente invención también deben considerarse sistemas de unión reversible aquellos sistemas en los que en primer lugar hay una unión covalente, que después puede romperse químicamente. En este caso puede mencionarse a modo de ejemplo la reticulación covalente por medio de un agente de reticulación heterobifuncional escindible tal como por ejemplo SPDP (20); mediante la adición de un agente reductor pueden escindirse el puente disulfuro y con ello romperse la unión.

45 Por consiguiente, el objetivo de la invención es también el procedimiento de prueba rápida según la invención, en el que el ligando de analito está unido covalentemente a la pareja de unión reversible 2.

Por consiguiente, el objetivo de la presente invención en una forma de realización preferida es el procedimiento según la invención, en el que el ligando de analito es un anticuerpo anti-procalcitonina.

50 Por consiguiente, un objetivo preferido de la invención es el empleo de un sistema de unión reversible para la inmovilización de un ligando específico para un analito, por ejemplo un anticuerpo anti-PCT.

55 El empleo se formula a continuación a modo de ejemplo para el sistema de unión reversible de los oligómeros peptídicos cargados (véase anteriormente), pero puede trasladarse de manera análoga a los otros sistemas. Se conjuga oligo-Asp con una proteína portadora tal como albúmina sérica bovina (BSA), y este conjugado se inmoviliza de manera estable sobre una fase sólida tal como por ejemplo placas de microtitulación de poliestireno de unión elevada. Se conjuga oligo-Lys con un anticuerpo anti-PCT. La incubación del oligo-Lys-anticuerpo anti-PCT con la fase sólida conduce a una inmovilización del anticuerpo mediante la unión entre las partes de oligo-Lys y oligo-Asp mediante interacción iónica.

60 En una forma de realización alternativa el anticuerpo anti-PCT también puede inmovilizarse indirectamente por medio de un anticuerpo derivatizado a partir de oligo-Lys frente al anticuerpo anti-PCT (por ejemplo un anticuerpo anti-IgG de ratón, cuando en el caso del anticuerpo anti-PCT se trata de un anticuerpo monoclonal de ratón).

65 A continuación se explica a modo de ejemplo el principio de la inmunoextracción para el análisis de PCT:

En primer lugar se inmoviliza un anticuerpo anti-PCT a través de un sistema de unión reversible sobre una fase sólida. Se añade una muestra de sangre completa que va a estudiarse (para el ejemplo oligómeros peptídicos cargados y EDTA-sangre) y se obtiene PCT de la muestra mediante inmunoeextracción. A este respecto puede utilizarse un volumen comparativamente grande de muestra, de modo que pueda extraerse una cantidad comparativamente grande de PCT, lo que conduce a continuación a una alta sensibilidad analítica de la prueba. Tras un tiempo de incubación breve se separa la muestra (mediante lavado u otros procedimientos de separación adecuados tales como por ejemplo aspiración o centrifugación adecuada). En la siguiente etapa se añade un tampón ("tampón de separación"), que contiene un agente (en el sistema oligo-Lys-/oligo-Asp por ejemplo la heparina muy cargada negativamente), que es adecuado para desestabilizar en su mayor parte la unión del anticuerpo a la fase sólida, pero no la unión entre la PCT y el anticuerpo. Por consiguiente, se dispone de una disolución que contiene el analito que debe determinarse (complejado en un anticuerpo específico) en una gran cantidad.

La disolución presenta siempre la misma naturaleza para cada muestra estudiada, dado que se separó previamente la matriz de la muestra. Por tanto, las ventajas de esta etapa consisten en:

- la posibilidad de utilizar sangre completa sin procesar,
- la posibilidad de utilizar volúmenes de muestra más grandes y con ello extraer una cantidad relativamente grande del analito y finalmente conseguir una alta sensibilidad analítica del ensayo en el procedimiento de determinación posterior,
- la independencia de la matriz para las etapas siguientes en el procedimiento de determinación, que tienen un efecto ventajoso sobre la precisión y exactitud del procedimiento de determinación.

El analito sometido a inmunoeextracción y llevado a disolución puede detectarse mediante diferentes procedimientos. Un ejemplo es la tecnología TRACE, otra (procedimiento explicado más adelante) la inmunocromatografía. La tecnología TRACE utiliza para un inmunoensayo de tipo sándwich dos anticuerpos, que están marcados con diferentes marcadores de fluorescencia (por ejemplo cianina o criptato). Con la formación del sándwich con el analito en disolución ambos marcadores alcanzan una cercanía espacial, que conduce a una emisión de luz específica tras una excitación luminosa correspondiente. En el contexto a modo de ejemplo durante el análisis de PCT se marca el anticuerpo anti-PCT conjugado con oligo-Lys antes de la inmovilización en primer lugar además con criptato. Con esto se realiza la inmunoeextracción. En el tampón de separación está contenido ahora, además del agente de separación, el segundo anticuerpo anti-PCT marcado con cianina, necesario para la formación de sándwich. Con ello, mediante la adición del tampón de separación se produce tanto la separación del complejo antígeno-anticuerpo de la fase sólida como la formación de sándwich, que puede detectarse tras una excitación luminosa adecuada. La separación y la adición del segundo anticuerpo para la formación de sándwich también pueden tener lugar secuencialmente.

En una variante descrita anteriormente el anticuerpo específico para el analito puede estar inmovilizado antes de la inmunoeextracción indirectamente a través de un anticuerpo derivatizado a partir de oligo-Lys, por ejemplo, anti-IgG de ratón. En esta forma de realización el marcador de fluorescencia puede estar conjugado entonces con uno u otro anticuerpo.

En el ejemplo de la inmunocromatografía el anticuerpo anti-PCT conjugado con oligo-Lys se marca antes de la inmovilización en primer lugar además con biotina. Con esto se realiza la inmunoeextracción. En el tampón de separación está contenido ahora, además del agente de separación, el segundo anticuerpo anti-PCT marcado con oro coloidal, necesario para la formación de sándwich. La separación y la adición del segundo anticuerpo para la formación de sándwich también pueden tener lugar secuencialmente. La mezcla de reacción se aplica a continuación sobre una tira de prueba inmunocromatográfica, sobre la que se ha pulverizado como capturador para el sándwich formado un ligando de biotina tal como por ejemplo avidina como una línea fina en la zona trasera de la tira de prueba en perpendicular a la dirección de avance de la disolución de reacción.

En una forma de realización especialmente preferida del procedimiento según la invención el ligando de analito está marcado y permanece marcado también tras la adición del tampón de separación con un marcador para la detección del analito.

En la realización de la inmunocromatografía pueden concebirse las siguientes variantes adicionales:

El anticuerpo de inmunoeextracción, además de la derivatización con la pareja de unión 2 está biotinilado adicionalmente. Un segundo anticuerpo para la formación de sándwich está marcado (por ejemplo con oro coloidal). El capturador sobre la tira de prueba sería entonces un ligando de biotina tal como avidina o estreptavidina o neutravidina.

El anticuerpo de inmunoeextracción (por ejemplo policlonal de oveja) sólo está derivatizado con la pareja de unión 2. Un segundo anticuerpo para la formación de sándwich debería proceder de otra especie animal (por ejemplo monoclonal de ratón) y estar marcado (por ejemplo con oro coloidal).

5 El captador sobre la tira de prueba sería entonces un anticuerpo anti-IgG de oveja. Ambas variantes pueden concebirse también en una forma tal, que el anticuerpo de inmunoeextracción porte el marcaje y estando entonces biotinilado el segundo anticuerpo en la primera variante (alternativamente en este caso el segundo anticuerpo también podría pulverizarse directamente sobre la tira).

10 En la formación de realización más preferida del procedimiento el tampón de separación contiene un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich.

15 De manera especialmente preferible la detección del analito marcado tiene lugar mediante un inmunoensayo utilizando la tecnología TRACE.

En otra forma de realización preferida la detección del analito marcado tiene lugar por medio de inmunocromatografía.

20 En una variante especialmente preferida según la invención la muestra biológica se utiliza sin diluir y en un volumen tal, que la parte recubierta de la fase sólida se pone completamente en contacto con la muestra biológica.

Se prefiere especialmente que la duración de la adición de la muestra hasta la detección no supere los 30 min. y por consiguiente el procedimiento se considera un procedimiento de prueba rápida.

25 Igualmente, el objetivo de la presente invención es un kit para la realización del procedimiento según la invención que comprende:

- una fase sólida con una pareja de unión reversible inmovilizada 1,
- un complejo que comprende ligando de analito unido a la pareja de unión reversible 2, pudiendo encontrarse este complejo opcionalmente inmovilizado sobre la fase sólida ya mediante la unión de las parejas de unión reversible 1 y 2,
- un tampón de separación, que rompe la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2, manteniéndose opcionalmente sin embargo la unión del analito al ligando de analito, y conteniendo el tampón de separación un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich.

40 En una forma de realización especialmente preferida el ligando de analito que se encuentra en el kit es un anticuerpo anti-PCT.

El kit más preferido contiene como par de unión seleccionado las parejas de unión reversible 1 y 2 seleccionadas de uno de los siguientes pares de unión:

- oligómeros peptídicos cargados positiva y negativamente,
- péptido/proteína de unión a Ca^{2+} y anticuerpo, que se une al péptido/la proteína con mayor afinidad cuando el péptido/la proteína se ha unido a Ca^{2+} ,
- oligohistidina (por ejemplo 6His) y Ni-NTA,
- biotina y avidina o estreptavidina o neutravidina.

55 Los siguientes ejemplos pretenden explicar más detalladamente la invención sin limitar el objeto de la invención:

Ejemplos

60 Inmunoextracción de PCT a partir de sangre completa

65 Como base para la realización de etapas adicionales se comprobó en primer lugar si, y con qué eficacia, puede extraerse un analito, estudiado en este caso con el ejemplo de PCT, de sangre completa con EDTA sin procesar por medio de un anticuerpo específico para el analito inmovilizado en una fase sólida. Tras una breve incubación (5 min.) y la separación de la muestra de sangre completa se determinó con un segundo anticuerpo anti-PCT marcado por quimioluminiscencia la PCT unida. Para la comparación se incubó suero que contenía PCT, diluido en tampón,

sobre la misma fase sólida, sin embargo durante más tiempo (2 h), y se determinó la PCT unida tras la separación de la muestra diluida tal como anteriormente.

En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

5 Para la determinación de la inmunoextracción se utilizaron los componentes del kit PCT sensitiv LIA de BRAHMS (BRAHMS Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Alemania). Se disolvió el anticuerpo trazador anti-PCT marcado por luminiscencia A en tampón de reconstitución trazador B según las instrucciones de trabajo. Se disolvió una serie de patrón en sangre completa con EDTA de un donante de sangre sano hasta las siguientes concentraciones: c = 10 0,007; 0,014; 0,036; 0,171; 0,383; 1,73; 7,99 ng/ml. En los tubos recubiertos con anticuerpo anti-PCT se pipetearon en cada caso 300 µl de patrón de sangre completa y se incubaron durante 5 min. a temperatura ambiente. Después se lavaron los tubos con 5x1 ml de disolución de lavado (Tris 8 mM, NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%, pH 7,5). A continuación se pipetearon 200 µl de anticuerpo anti-PCT marcado por luminiscencia y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente; se lavaron de nuevo los tubos con 5x1 ml de disolución de lavado. Se midió la quimioluminiscencia unida a los tubos en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG).

El procedimiento de referencia (determinación de PCT a partir de suero diluido) se realizó tal como sigue basándose en el kit PCT sensitiv LIA de BRAHMS (BRAHMS Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Alemania): Se disolvió una serie de patrón en suero basal del kit de prueba hasta las siguientes concentraciones:

25 c - 0; 0,008; 0,031; 0,042; 0,126; 0,251; 1,21; 5,61; 28,0 ng/ml. En los tubos recubiertos con anticuerpo anti-PCT se pipetearon en cada caso 50 µl de patrón de suero y 250 µl de tampón de reconstitución trazador B y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después se lavaron los tubos con 5x1 ml de disolución de lavado (Tris 8 mM, NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%, pH 7,5). A continuación se pipetearon 200 µl de anticuerpo anti-PCT marcado por luminiscencia y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente; se lavaron de nuevo los tubos con 5x1 ml de disolución de lavado. Se midió la quimioluminiscencia unida a los tubos recubiertos en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG) (figura 1).

30 Representación de anticuerpos que deben unirse a una fase sólida de manera reversible

Varios de los sistemas de unión reversible descritos anteriormente se estudiaron para determinar su idoneidad para unir un anticuerpo, en este caso en el ejemplo de un anticuerpo anti-PCT, de manera reversible a una fase sólida. Para ello se derivatizó de diferente manera el anticuerpo (véase la tabla 1) y se marcó con un marcador de quimioluminiscencia. Con ello se estudió cómo se unía este anticuerpo a y se separaba de nuevo de las fases sólidas correspondientes al respectivo derivado. El resumen de los resultados en la tabla 1 muestra que todos los sistemas de unión reversible estudiados con excepción del sistema biotina/avidina pueden desestabilizarse específica y rápidamente y (con limitaciones para el sistema 6His/Ni-NTA) no se ven afectados negativamente por la matriz de sangre.

Derivado en el anticuerpo (pareja de unión 1)	Fase sólida (pareja de unión 2)	Agente de separación	Porcentaje del anticuerpo separable de manera no específica mediante sangre (10 min. de incubación) con respecto a la cantidad unida previamente	Porcentaje del anticuerpo separable mediante agente de separación (10 min. de incubación) con respecto a la cantidad unida previamente	Porcentaje del anticuerpo separable mediante agente de separación (30 min. de incubación) con respecto a la cantidad unida previamente
biotina	avidina	biotina 25 mM	0,7%	1,9%	2,5%
anticuerpo M1	péptido FLAG-BSA	EDTA 10 mM	7,8%	58,7%	74,8%
6His	Ni-NTA	imidazol 250 mM	38,6%	89,4%	98,8%
anticuerpo HPC4	péptido de la proteína C-BSA	EDTA 10 mM	3,5%	38,3%	69,2%
oligo-Asp	oligo-Lys-BSA	heparina al 0,01%	5,3%	80,0%	93,2%

Tabla 1

Además se observó que puede influirse en la eficacia de la unión y la separación específica mediante el respectivo grado de derivatización (la razón molar de pareja de unión 1 por anticuerpo), la concentración de la pareja de unión 2 inmovilizada sobre la fase sólida, por medio de si la pareja de unión 1 estaba conjugada con el anticuerpo y la pareja de unión 2 estaba inmovilizada, o la pareja de unión 2 estaba conjugada con el anticuerpo y la pareja de

unión 1 estaba inmovilizada, y en el caso del sistema oligo-Asp/oligo-Lys la longitud de ambos oligómeros. Por tanto en el contexto de esta invención si bien las variantes de este tipo también se encuentran concretamente bajo el término de sistemas de unión reversible y las reivindicaciones incluyen tales variantes expresamente, sin embargo las variantes descritas a modo de ejemplo en este caso deben considerarse formas de realización preferidas. Como alternativa a oligo-Lys-BSA también demostraron ser adecuadas las fases sólidas de polilisina.

En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

Pareja de unión 1 (fase líquida)

1. Producción de anticuerpo marcado por quimioluminiscencia con MACN

Se trató un anticuerpo policlonal anti-calcitonina de oveja tal como sigue:

Se prepararon tres marcajes; éstos se tamponaron de diferente manera tras la incubación (ver más adelante).

Para el marcaje por quimioluminiscencia del anticuerpo se mezcló 1 ml de la disolución de anticuerpo (c=3,19 mg/ml) con 40 µl de fosfato de potasio 1 M, pH 7,8, y con 2,7 µl de éster de MACN-acridinio-NHS (c=1 mg/ml; empresa InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) (razón molar de marcaje de anticuerpo:MACN 10:1). Entonces se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. A continuación se tamponaron las mezclas básicas de marcaje a través de columnas de filtración en gel NAP-10 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) en 1,5 ml de eluyente y a este respecto se liberó de los componentes de bajo peso molecular:

Marcaje 1 PBS pH 7,4 para la biotilación véase 2.1.

Marcaje 2 fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9 para la activación con SPDP véase 2.2.

Marcaje 3 PBS, EDTA 10 mM, pH 8,0 para la activación con SMCC véase 2.3.

Se determinó fotométricamente el contenido en proteína, se almacenaron los anticuerpos marcados en partes a -20°C.

2. Derivatizaciones de los anticuerpos marcados por quimioluminiscencia con MACN

2.1. Biotilación

Se biotiniló el anticuerpo MACN con NHS-biotina cromogénica EZ-Link (empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21325) en una razón molar de 1:10.

Se mezcló 1 mg de anticuerpo MACN con 5,41 µl de disolución de biotina 1,233 mM (recién disuelta en DMSO) y se incubaron durante 60 min. a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 100 µl de glicina 50 mM durante 10 min. a temperatura ambiente y se purificó a través de una columna NAP5 (Pharmacia, Upsalla, Suecia).

Para la separación de los últimos restos de biotina no unida a anticuerpo se realizó una HPLC de filtración en gel (columna: Bio-Sil Sec 400, empresa Biorad, Múnich, Alemania). Se aplicó la muestra y se cromatografió a una velocidad de flujo de 0,8 ml/min. con PBS, pH 7,4. Con un fotómetro de flujo continuo se midieron las longitudes de onda 280 nm y 354 nm. El grado de marcaje de µM de biotina/µM de anticuerpo ascendió en el pico a 0,48. Se agruparon las fracciones que contenían anticuerpo (tiempo de retención de 11-12 min.).

Se determinó fotométricamente el contenido en proteína, se almacenó el conjugado en partes a -20°C.

2.2. Conjugación con anticuerpo M1 anti-FLAG-etiqueta o anticuerpo HPC4 anti-ProtC-etiqueta

Para la conjugación con anticuerpos M1 anti-FLAG-etiqueta (empresa Sigma, Deisenhofen, Alemania, n.º de art. F 3040) o HPC4 anti-ProtC-etiqueta (empresa Roche, Nutley, NJ, EE.UU., EE.UU., n.º de art. 11814516001) se activaron éstos y el anticuerpo MACN con SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21857) en una razón molar de 1:7 (véase "Instructions SPDP Reagents", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

Cada 2 mg de anticuerpo se mezclaron con en cada caso 4,67 µl de SPDP 20 mM (recién disuelto en etanol) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Sólo los anticuerpos M1 y HPC4 activados se ajustaron con DTT 200 mM (ditiotreitól, disuelto en fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9) hasta una concentración final de DTT 10 mM y se redujeron durante 15 min. a temperatura ambiente.

Se purificaron los anticuerpos M1 o HPC4 reducidos en cada caso a través de una columna NAP10 (eluyente: fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

Se conjugaron los productos reducidos en cada caso con el anticuerpo MACN activado con SPDP no reducido en una razón molar de 1:1 durante la noche a 4°C. A continuación se detuvo la reacción en cada caso con 50 µl de cisteína 100 mM durante 10 min.

5

Se determinó fotométricamente el contenido en proteína, se almacenaron los conjugados en partes a -20°C.

2.3. Conjugación con péptido con cola de His u oligo-Asp

10 Para acoplar el péptido con cola de His "PRG12" (secuencia de aminoácidos RGSHHHHHHGGC (SEQ ID NO. 1), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1359,8) o el péptido oligo-Asp "D14C" (secuencia de aminoácidos DDDDDDDDDDDDDDC (SEQ ID NO. 2), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1731,43) se activó el anticuerpo MACN con SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 22360) en una razón molar de 1:50 (véase "Instructions SMCC and SulfoSMCC", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

15

Se mezclaron 2 mg de anticuerpo MACN con 6,68 µl de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP10 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

20

A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido con cola de His u oligo-Asp (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 100 µl de cisteína 100 mM durante 10 min., se purificó de nuevo en cada caso a través de una columna NAP25 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

25

Se almacenaron ambos conjugados en alícuotas a -20°C.

Pareja de unión 2 (fase sólida)

30

1.1 Conjugación de BSA con FLAG-etiqueta / ProtC-etiqueta

35 Para acoplar el péptido Flag-etiqueta "PDC12" (secuencia de aminoácidos DYKDDDDKGGGC, (SEQ ID NO. 3), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1286,46) o el péptido ProtC-etiqueta PEG15 (secuencia de aminoácidos EDQVDPRLIDGKGGC, (SEQ ID NO. 4), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M= 1601,7) se activó albúmina sérica bovina libre de proteasa (empresa Sigma, Deisenhofen, Alemania) con SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 22360) en una razón molar de 1:2 (véase "Instructions SMCC and Sulfo-SMCC", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

40

Se mezclaron 2500 µl de BSA al 0,5% (disuelta en PBS, EDTA 10 mM, pH 8) con 3,78 µl de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP25 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

45

A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido FLAG-etiqueta o ProtC-etiqueta (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvieron los conjugados en cada caso con 100 µl de cisteína 100 mM durante 10 min. y se purificaron de nuevo en cada caso a través de una columna NAP25 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, pH 7,4); se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

50

Se almacenó el conjugado BSA+FLAG-etiqueta y BSA+ProtC-etiqueta en alícuotas a -20°C.

1.2 Conjugación de BSA con el péptido oligo-Lys

55 Para acoplar el péptido oligo-Lys "K14C" (secuencia de aminoácidos KKKKKKKKKKKKKKC, (SEQ ID NO. 5) empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1914,27) se activó albúmina sérica bovina libre de proteasa (empresa Sigma, Deisenhofen, Alemania) con SMCC en una razón molar de 1:25.

60 Se mezclaron 1000 µl de BSA al 0,5% (disuelta en PBS, EDTA 10 mM, pH 8) con 18,9 µl de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP10 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

60

65 A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido oligo-Lys (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 100 µl de

cisteína 100 mM durante 10 min., se purificó de nuevo a través de una columna NAP25 (Pharmacia, Upsalla, Suecia) (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

Se almacenó el conjugado BSA+oligo-Lys en alícuotas a -20°C.

2. Acoplamiento de los conjugados o de avidina

Se recubrieron tubos de estrella irradiados (empresa Greiner, Frickenhausen, Alemania) con los conjugados de 1.1. y 1.2., o con avidina (Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21121, disuelta en agua dest.) tal como sigue:

Se diluyeron los componentes en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,67 µg/ml. Por cada tubo se pipetearon en cada caso 300 µl de las disoluciones y se incubaron durante 20 h a 22°C. Se aspiraron las disoluciones. Después se saturó cada tubo con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo. A continuación se secaron los tubos en un secador de vacío y se almacenaron a 4°C.

3. Fase sólida de Ni-NTA

Se utilizaron placas de microtitulación de Ni-NTA (empresa Qiagen, Hilden, Alemania n.º de art. 1006387).

4. Ensayo para determinar anticuerpos unidos de manera reversible

4.1 Unión de los conjugados de anticuerpo MACN

Se ajustaron los conjugados de anticuerpo MACN hasta una concentración de 1,5 µg/ml con tampón de dilución (véase la tabla 2). En cada caso se pipetearon 300 µl en varias mezclas básicas paralelas sobre la fase sólida correspondiente y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Se lavaron los tubos con 5x1 ml, la placa de microtitulación de Ni-NTA con 5x 300 µl de tampón de lavado (véase la tabla 2).

En cada una de las mezclas básicas se determinó la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN unido:

Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN unida a los tubos en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG). Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN unida a la placa de microtitulación en un luminómetro de microplaca (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, MPL2; reactivos básicos BRAHMS AG).

4.2 Medición de la separación no específica de los conjugados de anticuerpo MACN con sangre completa

En mezclas básicas adicionales de los conjugados de anticuerpo MACN unidos se pipetearon en cada caso 300 µl de sangre completa (véase la tabla 2) y se incubaron durante 10 min. Se lavaron los tubos con 5x1 ml, la placa de microtitulación de Ni-NTA con 5x 300 µl de tampón de lavado (véase la tabla 2). Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN que quedó en los tubos en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG).

Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN que quedó en la placa de microtitulación en un luminómetro de microplacas (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, MPL2; reactivos básicos BRAHMS AG).

4.3 Medición de la separación específica de los conjugados de anticuerpo MACN con tampón de separación

En mezclas básicas adicionales de los conjugados de anticuerpo MACN unidos se pipetearon en cada caso 300 µl de tampón de separación (véase la tabla 2) y se incubaron durante 10 ó 30 min. Se lavaron los tubos con 5x1 ml, la placa de microtitulación de Ni-NTA con 5 x 300 µl de tampón de lavado (véase la tabla 2). Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN que quedó en los tubos en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG).

Se midió la cantidad de conjugado de anticuerpo MACN que quedó en la placa de microtitulación en un luminómetro de microplacas (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, MPL2; reactivos básicos BRAHMS AG).

Fase sólida	Anticuerpo MACN +	Tampón de dilución	Tampón de lavado	Sangre completa	Tampón de separación
avidina	biotina	PBS pH 7,4 BSA al 0,5%	Tris 8 mM pH 7,5 NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%	sangre completa con EDTA	PBS pH 7,4, BSA al 0,5%, biotina 25 mM
Ni-NTA	péptido con cola de His				PBS pH 7,4, BSA al 0,5%, imidazol 250 mM
oligo-Lys-BSA	péptido oligo-Asp				PBS pH 7,4, BSA al 0,5%, KF 0,6 M, heparina al 0,01%
FLAG-etiqueta-BSA	M1 anti-FLAG-etiqueta	HEPES 50 mM pH 7,2 NaCl 150 mM, Tween al 0,02%, BSA al 0,5%, CaCl ₂ 5 mM	HEPES 50 mM pH 7,2 NaCl 150 mM, Tween al 0,02%, CaCl ₂ 5 mM	sangre completa con heparina	HEPES 50 mM pH 7,2 NaCl 150 mM, Tween al 0,02%, BSA al 0,5%, EDTA 50 mM
ProtC-etiqueta-BSA	HPC4 anti-ProtC-etiqueta				

Tabla 2

5 Estudios extensos con respecto al sistema oligo-Asp/oligo-Lys

Agentes de separación

10 Tal como se describió anteriormente, se consiguió una separación eficaz de la unión mediante la adición de heparina al 0,01% (véase la tabla 1 y descripción asociada). Como agentes de separación alternativos se estudiaron también NaCl y KF. Se consiguió un efecto comparable con el de la heparina al 0,01% sobre la separación de la unión con concentraciones de NaCl o KF >0,8 M. Pueden concebirse otras numerosas variaciones en la composición de tampón, que conducen a la separación de la unión (otras sales de peso molecular reducido, otros polímeros u oligómeros cargados, otro valor de pH). Todas estas variaciones deben entenderse en el sentido de esta invención como agentes de separación. Sin embargo, deben considerarse como especialmente preferibles aquellas variaciones que por un lado desestabilizan eficazmente la unión del sistema oligo-Asp/oligo-Lys, pero por otro lado dejan la unión entre el anticuerpo y el analito lo más inalterada posible. La heparina en una concentración en torno al 0,01% representa una variante preferida de este tipo, dado que tal como es sabido muchos inmunoensayos pueden utilizar plasma con heparina como matriz de muestra y la concentración de heparina en este plasma se encuentra normalmente en el intervalo del 0,01%.

Especificidad de la unión del analito a la fase sólida

25 Si se añade una muestra biológica a una fase sólida, que está recubierta con oligo-Lys-BSA/oligo-Asp-ligando de analito, entonces podría temerse que el analito de interés de la muestra se uniera no sólo al anticuerpo específico para el analito, sino posiblemente también de manera no específica a través de una interacción iónica a partes de lisina eventualmente libres de la fase sólida. Si este fuera el caso, la exactitud en la detección analítica posterior (tras la etapa de separación) se vería perjudicada negativamente. Se estudió si podían tener lugar y en qué medida tales uniones de analito no específicas, marcando por quimioluminiscencia diferentes péptidos sintéticos, que son en su mayor parte idénticos a analitos naturales conocidos y por tanto los representan, diluyéndolos en una matriz de plasma e incubándolos en tubos que estaban recubiertos con oligo-Lys-BSA y a los que estaba unido un oligo-Asp-anticuerpo anti-PCT. El porcentaje detectado de péptidos unidos de manera no específica se encontraba siempre por debajo del 7% del péptido propuesto. Por consiguiente la unión de analito no específica a la fase sólida no representa ningún problema.

35 En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

1. Producción de péptidos marcados por quimioluminiscencia con MACN

40 Se marcaron los siguientes péptidos (todos de la empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania) con MACN: "PPL41" (secuencia de aminoácidos PEVPPWTGEVSPAQRDGGALGGGGRGPWDSSDRSALLKSKL, (SEQ ID NO. 6) derivado de NT-proANP), "PSW44" (secuencia de aminoácidos SSEEHLRQTRSETMRNSVKSSFHDPKLGKPSRERYVTHNRAHW, (SEQ ID NO. 7), derivado de proendotelina), "PAY33" (secuencia de aminoácidos ATQLDGP AGALLLRLVQLAGAPEPFEPAPDAY, (SEQ ID NO. 8) derivado de

copeptina), "péptido 45-92" (secuencia de aminoácidos ELRMSSSYPTGLADVKAGPAQTLIRPQDMKGASRPEDSSPDAARIRV, (SEQ ID NO. 9) derivado de proadrenomedulina).

5 Para el marcaje por quimioluminiscencia se marcaron los péptidos en una razón molar de 1:1 con éster de MACN-acridinio-NHS (empresa InVent GmbH, Hennigsdorf, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se detuvo la reacción con Tris 1 M pH 7,8 durante 10 min.

10 Para la separación de MACN no incorporado se purificaron las mezclas básicas de marcaje a través de una columna C18 de fase inversa (μ Bondapak, Waters WAT027342, n.º 0202352581). Se aplicaron las muestras y se cromatografiaron a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. por medio de un gradiente creciente de agua/acetonitrilo (+TFA al 0,1%). Con un fotómetro de flujo continuo se midieron las longitudes de onda de 214 nm, 280 nm y 368 nm y se detectaron los picos.

15 Se almacenaron los péptidos marcados en partes a -20°C.

1.1. Producción de conjugado BSA+oligo-Lys: véase anteriormente

20 1.2. Producción de conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja+oligo-Asp

Para acoplar el péptido oligo-Asp "D14C" (secuencia de aminoácidos DDDDDDDDDDDDDDC, (SEQ ID NO. 2), (empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1731,43) se activó un anticuerpo policlonal anti-calcitonina de oveja ("anticuerpo anti-PCT 1") con SMCC en una razón de 1:25 (véase "Instructions SMCC and Sulfo-SMCC", Pierce).

25 Se mezclaron 3 mg de anticuerpo (en 4,5 ml de PBS, EDTA 10 mM, pH 8) con 5,0 μ l de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de dos columnas NAP25 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

30 A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido oligo-Asp (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 100 μ l de cisteína 100 mM durante 10 min., se separó el péptido no conjugado a través de columnas NAP25 (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

35 Se almacenó el conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja+oligo-Asp en alícuotas a -20°C.

2. Acoplamiento de los conjugados en tubos

2.1. Acoplamiento: conjugado BSA+oligo-Lys

40 Se recubrieron tubos de estrella irradiados (empresa Greiner, Frickenhausen, Alemania) con el conjugado BSA-oligo-Lys tal como sigue:

45 Se diluyó el conjugado en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,67 μ g/ml. En cada tubo se pipetearon 300 μ l de esta disolución y se incubaron durante 20 h a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó de nuevo cada tubo con 300 μ l de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo. A continuación tuvo lugar la unión del conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja+oligo-Asp:

2.2. Unión: conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja+oligo-Asp

50 Se diluyó el conjugado en PBS, BSA libre de proteasa al 0,5% pH 7,4 hasta una concentración de 667 ng/ml. En cada tubo se pipetearon 300 μ l de esta disolución y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó de nuevo cada tubo con 300 μ l de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y después se aspiró.

55 A continuación se secaron los tubos en un secador de vacío y se almacenaron a 4°C.

3. Determinación de la unión no específica:

60 Se diluyeron los péptidos MACN en una matriz de plasma. En cada caso se pipetearon 300 μ l en los tubos recubiertos con el oligo-Lys-BSA y el oligo-Asp-anticuerpo anti-PCT y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se lavaron los tubos con 3x1 ml de PBS pH 7,4, BSA libre de proteasa al 0,5%. Se midieron la cantidad unida a los tubos así como la actividad total utilizada de péptido MACN en un luminómetro (empresa BERTHOLD, BAD WILDBAD, ALEMANIA, LB952T; reactivos básicos BRAHMS AG). La unión no específica porcentual con respecto a la actividad total ascendía a:

65

PSW44	3,0%
PPL41	3,1%
PAY33	6,5%
Péptido 45-92	2,9%

5 Comparación con el ejemplo de la PCT: inmunocromatografía clásica a partir de sangre completa frente a inmunoeextracción de PCT a partir de sangre completa, separación y detección de analito por medio de inmunocromatografía o de la tecnología TRACE

10 Se seleccionó PCT (procalcitonina) como analito modelo relevante. Se trata de un marcador para infecciones bacterianas, en particular infecciones graves, que producen una reacción inflamatoria sistémica del huésped (septicemia) (21). Los inmunoensayos de tipo sándwich para la detección de PCT utilizan anticuerpos frente a la parte de calcitonina o catacalcina del péptido (22), (23).

15 La inmunocromatografía representa en la aplicación de rutina actual la metodología de prueba rápida más común para la detección inmunológica de analitos a partir de sangre completa y por tanto puede denominarse "inmunocromatografía clásica". Por tanto, en este caso se seleccionó esta metodología como procedimiento de referencia para exponer las ventajas del principio según la invención de la inmunoeextracción y separación ("inmunotransferencia") con detección de analito posterior. Se estudiaron dos procedimientos de detección diferentes: por un lado la inmunocromatografía, por otro lado la tecnología TRACE (*Time resolved amplified cryptate emission*, emisión amplificada de criptato resuelta en el tiempo). Con los tres procedimientos se determinaron concentraciones de PCT a partir de las muestras de sangre completa que contenían PCT en una determinación de 20 10 veces en cada caso. En la figura 2 se comparan los perfiles de precisión resultantes de los procedimientos. Puede observarse claramente que ambos procedimientos que son el objeto de esta invención, es decir la inmunotransferencia en relación con un procedimiento de detección (ya sea inmunocromatografía o tecnología TRACE), proporcionan resultados de medición considerablemente más precisos y sensibles que el procedimiento de referencia (inmunocromatografía clásica directamente a partir de sangre completa). A continuación se explican los detalles para la realización de los experimentos. En A se describe como procedimiento según la invención la inmunotransferencia con detección de analito posterior por medio de tecnología TRACE; en B se describe como procedimiento según la invención la inmunotransferencia con detección de analito posterior por medio de inmunocromatografía; en C se describe como procedimiento de referencia la inmunocromatografía clásica. En la 25 30 figura 2 se representa una comparación de los perfiles de precisión de las variantes A, B y C.

A. Inmunoeextracción de PCT a partir de sangre completa y detección de analito por medio de la tecnología TRACE

35 Como fase sólida se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno de unión elevada, que estaban recubiertas con oligo-Lys-BSA, a las que estaba unido un primer anticuerpo anti-PCT que se había derivatizado previamente con oligo-Asp y criptato. Sobre éstas se incubó brevemente la muestra de sangre completa que contenía PCT y se sometió a inmunoeextracción la PCT de la muestra sobre la fase sólida. Tras lavar la fase sólida se añadió el tampón de separación y se incubó brevemente. Se pasó una alícuota a otra placa de microtitulación negra de unión reducida y se mezcló con una disolución, que contenía un segundo anticuerpo anti-PCT marcado con cianina. Tras una breve 40 incubación se detectó la formación de sándwich tras la excitación con luz láser por medio de tecnología TRACE.

En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

45 A.1. Producción de los conjugados para la fase sólida

A.1.1. Producción de conjugado BSA+oligo-Lys: véase anteriormente

A.1.2. Producción de conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja marcado con -criptato MonoMP+oligo-Asp

50 Para el marcaje con criptato monofosfato ("KMonoMP", empresa Cezanne, Nimes, Francia) se activó un anticuerpo policlonal anti-calcitonina de oveja ("anticuerpo anti-PCT 1") con SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo, empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21857) en una razón molar de 1:4 (véase "Instructions SPDP Reagents", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

55 Se mezclaron 5 mg de anticuerpo (disuelto en 1,5 ml de fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9) con 41,6 µl de SPDP 3,2 mM (recién disuelto en etanol) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente.

60 Se redujo el anticuerpo activado con 81,2 µl de DTT 200 mM (ditiotreitól, disuelto en fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9) durante 15 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de dos columnas NAP10 (eluyente: fosfato de sodio 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,9) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación del eluato con KMonoMP liofilizado en una razón molar de 1:8. Tras una incubación de 20 h a 4°C se purificó el producto de nuevo a través de tres columnas NAP10 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

5 Para acoplar el péptido oligo-Asp "D14C" (secuencia de aminoácidos DDDDDDDDDDDDDDC, (SEQ ID NO. 2), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1731,43) se activó el producto con SMCC en una razón de 1:25 (véase "Instructions SMCC and Sulfo-SMCC", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.): se mezclaron 3 mg de producto (eluido con 4,5 ml de PBS, EDTA 10 mM, pH 8) con 5,0 µl de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de dos columnas NAP25 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

10 A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido oligo-Asp (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 100 µl de cisteína 100 mM durante 10 min., se separó el péptido no conjugado a través de columnas NAP25 (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

15 Se almacenó el conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja marcado con K MonoMP+oligo-Asp en alícuotas a -20°C.

20 A.2. Acoplamiento de los conjugados sobre placas de microtitulación

A.2.1. Acoplamiento: conjugado BSA+oligo-Lys

25 Se recubrieron placas de microtitulación irradiadas (empresa Greiner, Frickenhausen, Alemania) con conjugado BSA-oligo-Lys tal como sigue:

30 Se diluyó el conjugado en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,67 µg/ml. En cada cavidad se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 20 h a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó cada cavidad con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo. A continuación tuvo lugar la unión del conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja marcado con criptato MonoMP+oligo-Asp:

A.2.2. Unión: conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja marcado con criptato MonoMP+oligo-Asp

35 Se diluyó el conjugado en PBS, BSA libre de proteasa al 0,5% pH 7,4 hasta una concentración de 667 ng/ml. En cada cavidad se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó cada cavidad con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo.

40 A continuación se secaron las placas de microtitulación en un secador de vacío y se almacenaron a 4°C.

A.3. Producción de un conjugado de anticuerpo anti-catacalcina de ratón marcado con Cy5 para la fase líquida

45 Se marcó un anticuerpo monoclonal anti-catacalcina ("anticuerpo anti-PCT 2") en presencia de (2-hidroxil-propil)-β-ciclodextrina al 45% (empresa Aldrich, Seelze, Alemania, n.º de art. 33.260-7) con Cy5-NHS (empresa Amersham, n.º de art. PA15100) en una razón molar de 1:20 (véase el folleto de producto "Amersham CyDye mono-reactive NHS Esters").

50 Se mezclaron 213 µl de anticuerpo (c=10 mg/ml en PBS pH 7,4) con 750 µl de ciclodextrina al 60% (disuelta en tampón carbonato 100 mM pH 9) y se mezclaron con 37,3 µl de Cy5-NHS 7,7 mM (disuelta en DMSO). Tras una incubación de una hora a temperatura ambiente se detuvo la mezcla básica con 50 µl de glicina 50 mM durante 10 min. y se purificó previamente a través de una columna NAP10 (eluyente: PBS, pH 7,4).

55 Para la separación de los últimos restos de Cy5-NHS no unida a anticuerpo se realizó una HPLC de filtración en gel (columna: Bio-Sil Sec 125, empresa Biorad, Múnich, Alemania). Se aplicó la muestra y se cromatografió a una velocidad de flujo de 1 ml/min. con PBS, pH 7,4. Con un fotómetro de flujo continuo se midieron las longitudes de onda de 280 nm y 648 nm. La razón de absorción 648 nm/280 nm como medida para el grado de marcaje del anticuerpo ascendió en el pico a 1,48. Se agruparon las fracciones que contenían anticuerpo (tiempo de retención de 8-10 min.).

60 Se almacenó el conjugado anticuerpo anti-catacalcina de ratón marcado con Cy5 en partes y a -20°C.

A.4. Inmunotransferencia y ensayo TRACE

65 Se realizó el ensayo descrito a continuación para cada muestra en una determinación de 10 veces. En las cavidades de las placas de microtitulación recubiertas con BSA+oligo-Lys y conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja

5 marcado con criptato MonoMP+D14C se pipetearon muestras de 300 μ l de sangre completa con EDTA, reconstituidas con PCX recombinante (InVivo GmbH, Hennigsdorf, Alemania), y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente (las concentraciones de PCT de las muestras se determinaron mediante medición con el ensayo PCT LIA sensitiv de BRAHMS (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) a partir de plasma). Después se lavó
 10 2x con 300 μ l de PBS, pH 7,4, después 2x con 300 μ l de disolución de lavado (Tris 8 mM, NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%, pH 7,5). A continuación se incubó con 300 μ l de tampón de separación (PBS pH 7,4, KF 0,6 M, BSA al 0,5%, heparina al 0,01%) durante 10 min. Del inmunocomplejo separado se transfirieron 100 μ l a placas de microtitulación adecuadas para la medición TRACE (Costar Half Area Plates, 96 pocillos, negras, poliestireno, empresa Sigma/Aldrich, Seelze, Alemania, n.º de cat. CLS 3694-100EA) y se incubaron con 50 μ l de conjugado de anticuerpo anti-catacalcina de ratón marcado con Cy5-NHS (c=20 μ g/ml en PBS pH 7,4, KF 0,6 M, BSA al 0,5%, heparina al 0,01%) durante 19 min. a temperatura ambiente. La medición de las señales TRACE (620 nm y 665 nm) tuvo lugar por medio del lector de placas de microtitulación de fluorescencia resuelta en el tiempo de alto rendimiento RUBYstar (empresa BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

15 A este respecto se realizaron los siguientes ajustes de aparato en el aparato RUBYstar:

Número de flashes	20
Retardo de integración [μ s]	50
Tiempo de integración [μ s]	400
Tiempo de intervalo [μ s]	10
Número de intervalos	45
Multiplicador de relación	10000

Para cada muestra se calculó a partir de la relación DO_{665nm}/DO_{620nm} Delta F tal como sigue:

20 $Delta F = (Relación_{pos} - Relación_{neg}) / Relación_{neg}$

A este respecto $Relación_{neg}$ se refiere a la relación de una muestra negativa para PCT (es decir una muestra que no contiene o en la que no puede detectarse PCT) y $Relación_{pos}$ se refiere a la relación de una muestra que debe someterse a prueba (es decir una prueba que contiene potencialmente PCT). A partir de las determinaciones de 10
 25 veces de las muestras individuales se formó el respectivo valor medio. Estos valores servían como concentraciones patrón, a partir de las cuales se determinaron las concentraciones de todas las muestras individuales utilizando el software MultiCalc (Spline Fit). Para cada determinación de 10 veces se determinó el coeficiente de variación.

30 B. Inmunoextracción de PCT a partir de sangre completa y detección de analito por medio de inmunocromatografía

Como fase sólida se utilizaron tubos de poliestireno, que estaban recubiertos con oligo-Lys-BSA, a los que se había unido un primer anticuerpo anti-PCT, que se había derivatizado previamente con oligo-Asp y biotina. En éstos se incubó brevemente una muestra de sangre completa que contenía PCT y a este respecto se sometió a inmunoextracción la PCT de la muestra sobre la fase sólida. Tras lavar la fase sólida se añadió tampón de
 35 separación, que contenía un segundo anticuerpo anti-PCT marcado con oro coloidal, y se incubó brevemente. Finalmente se sometió la disolución a inmunocromatografía sobre una tira de prueba, sobre la que se había pulverizado estreptavidina como banda de prueba. Se une a la estreptavidina el primer anticuerpo anti-PCT biotinilado y con ello también la PCT unida al mismo y el segundo anticuerpo anti-PCT marcado con oro unido a la misma. La detección del marcador tuvo lugar reflectométricamente.

40 En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

B.1. Producción de los conjugados para la fase sólida

45 B.1.1. Producción de conjugado BSA+oligo-Lys: véase anteriormente

B.1.2. Producción de conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+oligo-Asp

Se mezcló un anticuerpo policlonal anti-calcitonina de oveja ("anticuerpo anti-PCT 1") con sulfo-NHS-LC-LC-biotina EZ-Link (empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21338) en una razón molar de 1:10 (véase "Instructions EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.): se mezclaron 1,6 mg de anticuerpo (en PBS pH 7,4) con 10 μ l de sulfo-NHS-LC-LC-biotina EZ-Link 10 mM (recién disuelta en agua dest.) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP5 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM pH 8,0) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

55 Para acoplar el péptido oligo-Asp "D14C" (secuencia de aminoácidos DDDDDDDDDDDDDDC, (SEQ ID NO. 2), (empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1731,43) se activó el producto con SMCC en una razón de 1:50 (véase "Instructions SMCC and Sulfo-SMCC", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

Se mezclaron 1,3 mg de producto (eluido con 1,0 ml de PBS, EDTA 10 mM, pH 8) con 4,33 µl de SMCC 100 mM (recién disuelto en DMSO) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP10 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

5 A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido oligo-Asp (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 100 µl de cisteína 100 mM durante 10 min., se separó el péptido no conjugado a través de una columna NAP25 (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

10 Se almacenó el conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+oligo-Asp en alícuotas a -20°C.

B.2. Acoplamiento del conjugado sobre tubos

15 B.2.1. Acoplamiento: conjugado BSA+oligo-Lys

Se recubrieron tubos de estrella irradiados (empresa Greiner, Frickenhausen, Alemania) con conjugado BSA-oligo-Lys tal como sigue:

20 Se diluyó el conjugado en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,67 µg/ml. En cada tubo se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 20 h a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó cada tubo con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo: A continuación tuvo lugar la unión del conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+oligo-Asp.

25 B.2.2. Unión: conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+oligo-Asp

30 Se diluyó el conjugado en PBS, BSA libre de proteasa al 0,5% pH 7,4 hasta una concentración de 667 ng/ml. En cada tubo se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó de nuevo cada tubo con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y después se aspiró.

A continuación se secaron los tubos en un secador de vacío y se almacenaron a 4°C.

35 B.3. Producción de anticuerpo anti-catacalcina marcado con oro:

Se adquirió este componente de la empresa 8sens.biognostic GmbH, Berlín, Alemania. Se acopló anticuerpo monoclonal anti-catacalcina a oro coloidal (empresa 8sens.biognostic GmbH, Berlín, Alemania; según Frens: Frens, G., Nature Physical Science, 1973, 241 20-22) tal como se describió en Hermanson (<http://www.amazon.de/Bioconjugate-TechniquesGreg-T-Hermanson/dp/0123423368>).

40 B.4. Producción de las tiras de prueba:

45 Se adquirió este componente de la empresa 8sens.biognostic GmbH, Berlín, Alemania. Se recubrieron membranas de nitrocelulosa de MDI (Advanced Microdevices, Ambala, La India) con estreptavidina 4 µg/cm (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) (línea de prueba) así como con anticuerpo anti-IgG de ratón 2,5 µg/cm (Scantibodies, Santee, CA, EE.UU.) (línea de control). Para aplicar las moléculas captadoras se utilizó un microdispensador de la empresa Biodot, Irvine, CA, EE.UU. A continuación tuvo lugar el secado de la membrana durante la noche a 50°C. Como almohadilla de succión se utilizó AP22 de la empresa Millipore, Billerica, MA, EE.UU.

50 B.5. Inmunotransferencia e inmunocromatografía:

55 El ensayo descrito a continuación se realizó para cada muestra en una determinación de 10 veces. En los tubos recubiertos con BSA+oligo-Lys y conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+D14C se pipetearon 300 µl de sangre completa con muestras con EDTA, reconstituidas con PCT recombinante (InVivo GmbH, Hennigsdorf, Alemania) y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente (las concentraciones de PCT de las muestras se determinaron mediante medición con el ensayo PCT LIA sensitiv de BRAHMS (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) a partir de plasma). Después se lavó 2x con 300 µl de PBS, pH 7,4, después 2x con 300 µl de disolución de lavado (Tris 8 mM, NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%, pH 7,5). A continuación se incubó con 150 µl de tampón de separación (PBS pH 7,4, BSA al 5%, Tween 20 al 0,5%, heparina al 0,01%), que también contenía el anticuerpo monoclonal anti-catacalcina marcado con oro, con agitación durante 10 min. Del inmunocomplejo separado se transfirieron 150 µl a cavidades de placas de microtitulación de unión reducida. A continuación tuvo lugar inmediatamente la inmunocromatografía con las tiras de prueba, introduciendo las mismas en las cavidades. Tras 30 min. se determinó el color de la banda de prueba con un reflectómetro de la empresa LRE Medical GmbH, Múnich, Alemania.

65

A partir de las determinaciones de 10 veces de las muestras individuales se formó el respectivo valor medio. Estos valores sirvieron como concentraciones patrón, a partir de las cuales se determinaron las concentraciones de todas las muestras individuales utilizando el software MultiCalc (Spline Fit). Para cada determinación de 10 veces se determinó el coeficiente de variación.

5

C. Detección de PCT a partir de sangre completa por medio de inmunocromatografía clásica

Se produjeron tiras de prueba, que en la zona de aplicación de muestra estaban dotadas de una membrana que era adecuada para retener células sanguíneas de una muestra de sangre completa que iba a aplicarse. Entre esta membrana y la tira de prueba estaba dispuesta una almohadilla porosa ("almohadilla de muestra"), que secada contenía por un lado un primer anticuerpo anti-PCT biotilado, por otro lado un segundo anticuerpo anti-PCT marcado con oro coloidal. Como banda de prueba se había pulverizado estreptavidina sobre la tira. Las tiras de prueba se habían insertado en casetes de plástico. Se sometió a inmunocromatografía la muestra de sangre completa que contenía PCT. Se une a la estreptavidina el primer anticuerpo anti-PCT biotilado y con ello también la PCT unida al mismo y el segundo anticuerpo anti-PCT marcado con oro unido a su vez a la misma. La detección del marcador tuvo lugar reflectométricamente.

10

15

En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

20

C.1. Producción de los conjugados para la fase sólida

C.1.1. Producción de conjugado BSA+oligo-Lys: véase anteriormente

C.1.2. Producción de conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotilado+oligo-Asp: véase anteriormente

25

C.2. Producción de anticuerpo anti-catacalcina marcado con oro: véase anteriormente

C.3. Producción de las tiras de prueba:

30

Se adquirió este componente de la empresa 8sens.biognotic GmbH, Berlín, Alemania. Se recubrieron membranas de nitrocelulosa de MDI (Advanced Microdevices, Ambala, La India) con estreptavidina 4 µg/cm (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) (línea de prueba) así como con anticuerpo anti-IgG de ratón 2,5 µg/cm (Scantibodies, Santee, CA, EE.UU.) (línea de control). Para aplicar las moléculas captadoras se utilizó un microdispensador de la empresa Biodot, Irvine, CA, EE.UU. A continuación tuvo lugar el secado de la membrana durante la noche a 50°C. Como almohadilla de succión se utilizó AP22 de la empresa Millipore, Billerica, MA, EE.UU. Para la producción de las pruebas de sangre completa se utilizó una preparación de sangre completa de la empresa 8sens.biognotic. En la zona de aplicación de muestra se inmovilizaron sobre 2 almohadillas independientes por un lado el anticuerpo anti-catacalcina acoplado a oro coloidal y por otro lado el anticuerpo anti-calcitonina derivado a partir de oligo-Asp biotilado. Como casete se aprovechó una carcasa convencional de la empresa 8sens.biognotic.

35

40

C.4. Inmunocromatografía clásica

La inmunocromatografía descrita a continuación se realizó para cada muestra en una determinación de 10 veces. Sobre las tiras de prueba se pipetearon muestras de 120 µl de sangre completa con EDTA, reconstituidas con PCT recombinante (InVivo GmbH, Hennigsdorf, Alemania) (las concentraciones de PCT de las muestras se determinaron mediante medición con el ensayo PCT LIA sensitiv de BRAHMS (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) a partir de plasma). Tras 30 min. se determinó el color de la banda de prueba con un reflectómetro de la empresa LRE Medical GmbH, Múnich, Alemania.

45

50

A partir de las determinaciones de 10 veces de las muestras individuales se formó el respectivo valor medio. Estos valores sirvieron como concentraciones patrón, a partir de las cuales se determinaron las concentraciones de todas las muestras individuales utilizando el software MultiCalc (Spline Fit). Para cada determinación de 10 veces se determinó el coeficiente de variación.

55

D. Inmunoextracción de MR-proADM a partir de sangre completa y detección de analito por medio de inmunocromatografía

Como ejemplo adicional para el procedimiento de inmunoextracción a partir de sangre completa y detección de analito por medio de inmunocromatografía se desarrolló un sistema de prueba para el analito MR-proADM (proadrenomedulina de región media). MR-proADM es un péptido estable que circula en la sangre, que resulta del procesamiento proteolítico del precursor de adrenomedulina (Struck J *et al.*: Peptides, agosto de 2004; 25(8): 1369-72.). La adrenomedulina es uno de los vasodilatadores endógenos más conocidos, que participa en la regulación de numerosos procesos biológicos, en particular en la regulación del sistema cardiovascular (Beltowski J *et al.*: Pol J Pharmacol. enero-febrero de 2004; 56(1):5-27.). La medición de MR-proADM ha resultado ser útil como marcador sucedáneo para la adrenomedulina madura que no puede medirse de manera fiable en el contexto de la realización de diagnósticos y pronósticos de diferentes estados patológicos. A éstos pertenecen entre otros: COPD (Stolz D *et*

60

65

al.: Chest. 19 de mayo de 2008. [publicación electrónica previa a la impreza], neumonía (Christ-Crain M *et al.*: Crit Care. 2006;10(3):R96.), septicemia (Christ-Crain M *et al.*: Crit Care. 2005;9(6):R816-24.), infarto de miocardio (Khan SQ *et al.*: J Am Coli Cardiol. 10 de abril de 2007; 49(14): 1525-32.), insuficiencia cardiaca (Gegenhuber A *et al.*: J Card Fail. 13 de febrero de 2007; 13(1):42- 9.).

5 El procedimiento según la invención muestra para MR-proADM una alta precisión tanto en el intervalo normal (Morgenthaler NG *et al.*: Clin Chem. octubre de 2005; 51(10):1823-9.) como en el intervalo de concentraciones elevadas, que están asociadas con diferentes cuadros patológicos (véase anteriormente) (figura 3).

10 En detalle, el ensayo se realizó tal como sigue:

D.1. Producción de los conjugados para la fase sólida

D.1.1. Producción de conjugado BSA+oligo-Lys: véase anteriormente

15 D.1.2. Producción de conjugado anticuerpo anti-"SPCD19" de oveja biotinilado+oligo-Asp

Para acoplar el péptido oligo-Asp "D14C" (secuencia de aminoácidos DDDDDDDDDDDDDDC, (SEQ ID NO. 2), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M = 1731,43) se activó un anticuerpo policlonal anti-"SPCD19" de oveja (secuencia de aminoácidos CRPQDMKGASRSPEDSSPD, (SEQ ID NO. 10) empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M = 2063) con SMCC en una razón de 1:25 (véase "Instructions SMCC and Sulfo-SMCC", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.).

25 Se mezclaron 1,0 mg de anticuerpo con 16,67 µl de SMCC 10 mM (recién disuelto en DMSO) y 103 µl de PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente. Se purificó el producto a través de una columna NAP5 (eluyente: PBS, EDTA 10 mM, pH 8) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

30 A continuación tuvo lugar inmediatamente la conjugación con el péptido oligo-Asp (disuelto en agua dest.) en una razón molar de 1:100. Tras una incubación de 60 min. a temperatura ambiente se separó el péptido no conjugado a través de una columna NAP10 (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

35 Se mezcló el producto con Sulfo-NHS-LC-LC-biotina EZ-Link (empresa Pierce, Rockford, IL, EE.UU., n.º de art. 21338) en una razón molar de 1:20 (véase "Instructions EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin", Pierce, Rockford, IL, EE.UU.): se mezclaron 900 µg de anticuerpo (en PBS pH 7,4) con 12 µl de Sulfo-NHS-LC-LC-biotina EZ-Link 10 mM (recién disuelta en agua dest.). Tras una incubación de 30 min. a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 50 µl de Tris 1 M durante 10 min. Se purificó el producto a través de una columna NAP25 (eluyente: PBS, pH 7,4) y se determinó fotométricamente el contenido en proteína.

40 Se almacenó el conjugado anticuerpo anti-"SPCD19" de oveja biotinilado+oligo-Asp en alícuotas a -20°C.

D.2. Acoplamiento del conjugado sobre tubos

D.2.1. Acoplamiento: conjugado BSA+oligo-Lys

45 Se recubrieron tubos de estrella irradiados (empresa Greiner, Frickenhausen, Alemania) con conjugado BSA-oligo-Lys tal como sigue:

50 Se diluyó el conjugado en Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,8 hasta una concentración de 6,67 µg/ml. En cada tubo se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 20 h a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó cada tubo con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y se aspiró de nuevo. A continuación tuvo lugar la unión del conjugado anticuerpo anti-calcitonina de oveja biotinilado+oligo-Asp:

D.2.2. Unión: conjugado anticuerpo anti-"SPCD19" de oveja biotinilado+oligo-Asp

55 Se diluyó el conjugado en PBS, BSA libre de proteasa al 0,5% pH 7,4 hasta una concentración de 667 ng/ml. En cada tubo se pipetearon 300 µl de esta disolución y se incubaron durante 1 hora a 22°C. Se aspiró la disolución. Después se saturó de nuevo cada tubo con 300 µl de albúmina sérica bovina al 0,5%, Karion FP al 2% durante 2 h y después se aspiró.

60 A continuación se secaron los tubos en un secador de vacío y se almacenaron a 4°C.

D.3. Producción de anticuerpo anti-"PSV11" marcado con oro

65 Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-"PSV11" (PSV11 representa una secuencia parcial de MR-proADM; secuencia de aminoácidos CSSPDAARIRV, (SEQ ID NO. 11), empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=1174). Se

acopló el anticuerpo a oro coloidal (empresa BBI International, EM. CG 60 nm) tal como se describió en Hermanson (<http://www.amazon.de/Bioconjugate-Techniques-Greg-T-Hermanson/dp/0123423368>).

D.4. Producción de las tiras de prueba:

Se adquirió este componente de 8sens.biognostic GmbH, Berlín, Alemania. Se recubrieron membranas de nitrocelulosa de MDI (Advanced Microdevices, Ambala, La India) con estreptavidina 4 µg/cm (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) (línea de prueba). Para aplicar las moléculas captadoras se utilizó un microdispensador de la empresa Biodot, Irvine, CA, EE.UU. A continuación tuvo lugar el secado de la membrana durante la noche a 50°C. Como almohadilla de succión se utilizó AP22 de la empresa Millipore, Billerica, MA, EE.UU.

D.5. Inmunotransferencia e inmunocromatografía:

El ensayo descrito a continuación se realizó para cada muestra en una determinación de 10 veces. En los tubos recubiertos con BSA+oligo-Lys y conjugado anticuerpo anti-"SPCD19" de oveja biotilado+"D14C" se pipetearon muestras de 300 µl de sangre completa con EDTA, reconstituidas con 45-92 proadrenomedulina sintética (secuencia de aminoácidos ELRMSSSYPTGLADVKAGPAQTLIRPQDMKGASRSPEDSSPDAARIRV, (SEQ ID NO. 9) empresa JPT GmbH, Berlín, Alemania, M=5115) y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente (las concentraciones de proADM de las muestras se determinaron mediante medición con el ensayo proADM LIA de BRAHMS (BRAHMS AG, Hennigsdorf, Alemania) a partir de plasma). Después se lavó 5x con 1 ml de disolución de lavado (Tris 8 mM, NaCl 60 mM, Tween 20 al 0,2%, pH 7,5).

A continuación se incubó con 150 µl de tampón de separación (PBS pH 7,8, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%, heparina al 0,1%, NaN₃ al 0,08%), que también contenía en anticuerpo monoclonal anti-"PSV11" marcado con oro, con agitación durante 10 min. Del inmunocomplejo separado se transfirieron 100 µl a cavidades de placas de microtitulación de unión reducida. A continuación tuvo lugar inmediatamente la inmunocromatografía con las tiras de prueba, introduciendo las mismas en las cavidades. Tras 30 min. se determinó el color de la banda de prueba con un reflectómetro de la empresa LRE Medical GmbH, Múnich, Alemania.

A partir de las determinaciones de 10 veces de las muestras individuales se formó el respectivo valor medio. Estos valores sirvieron como concentraciones patrón, a partir de las cuales se determinaron las concentraciones de todas las muestras individuales utilizando el software MultiCalc (Spline Fit). Para cada determinación de 10 veces se determinó el coeficiente de variación.

Descripción de las figuras

Figura 1: muestra que el analito (PCT) puede someterse a inmuoextracción a partir de sangre completa, y concretamente ya tras sólo 5 min. de incubación con una eficacia similar a la del procedimiento de referencia tras 2 h de incubación.

Figura 2: se representan los coeficientes de variación para la determinación múltiple de muestras de sangre completa con diferentes concentraciones de PCT, tal como se determinaron con los tres procedimientos indicados a continuación (A: inmunotransferencia con tecnología TRACE, B: inmunotransferencia con inmunocromatografía, C: inmunocromatografía clásica de referencia). Ambos procedimientos, que comprenden inmunotransferencia, representan procedimientos según la invención; la inmunocromatografía clásica es el procedimiento de referencia.

Figura 3: se representan los coeficientes de variación para la determinación múltiple de muestras de sangre completa con diferentes concentraciones de MR-proADM, tal como se determinaron con el procedimiento según la invención de inmunotransferencia con inmunocromatografía.

Lista de bibliografía

(1)

M.J. Pugia, C.P. Price: Point-of-Care Testing, 2ª ed., editado por Price, John, Hicks, American Association for Clinical Chemistry, ISBN 1-59425-012-X, 2004; páginas 13-30

(2)

Saadeddin S *et al.*: Reliability of the rapid bedside whole-blood quantitative cardiac troponin T assay in the diagnosis of myocardial injury in patients with acute coronary Syndrome, Med Sci Monit. Marzo de 2004; 10(3):MT43-6. publicación electrónica 1 de marzo de 2004

(3)

- o. V. - Evaluation of a bedside whole-blood rapid troponin T assay in the emergency department. Rapid Evaluation by Assay of Cardiac Troponin T (REACTT) Investigators Study Group, Acad Emerg Med. Noviembre de 1997; 4(11):1018-24
- 5 (4)
- Zugck C *et al.*: Multicentre evaluation of a new point-of-care test for the determination of NT-proBNP in whole blood, Clin Chem Lab Med. 2006; 44(10): 1269-77
- 10 (5)
- Alan H. B.: A Platform for Quantitative Point-of-Care Cardiac Marker Determinations from Roche Diagnostics
- (6)
- 15 Yeo KT *et al.*: Multicenter evaluation of the Roche NT-proBNP assay and comparison to the Biosite Triage BNP assay, Clin Chim Acta. Diciembre de 2003; 338(1 -2): 107- 15
- (7)
- 20 Meisner M *et al.*: Clinical experiences with a new semi-quantitative solid phase immunoassay for rapid measurement of procalcitonin, Clin Chem Lab Med. Octubre de 2000; 38(10):989-95
- (8)
- 25 Terpe K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial Systems, Appl Microbiol Biotechnol. Enero de 2003; 60(5):523-33. Publicación electrónica 7 de noviembre de 2002
- (9)
- 30 R.C. Stevens: Fusion tags used in recombinant protein expression and purification - Design of high-throughput methods of protein production for structural biology, Structure, 8, R177-R185 (2000).
- (10)
- 35 Stevens RC: Design of high-throughput methods of protein production for structural biology Structure. 15 de septiembre de 2000; 8(9):R177-85
- (11)
- 40 Hopp TP, Gallis B, Prickett KS: Metal-binding properties of a calcium-dependent monoclonal antibody., Mol Immunol. Mayo-junio 1996; 33(7-8):601-8
- (12)
- 45 Steams DJ *et al.*: The interaction of a Ca²⁺-dependent monoclonal antibody with the protein C activation peptide region. Evidence for obligatory Ca²⁺ binding to both antigen and antibody, J Biol Chem. 15 de enero de 1988; 263(2):826-32
- 50 (13)
- QIAexpress Detection and Assay Handbook 10/2002, QIAGEN, HILDEN, ALEMANIA
- (14)
- 55 Sassenfeld, H.M. y Brewer, S J. (1984) Bio/Technology, 2, 76-80.
- (15)
- 60 Dalboge, H., Dahl, H.-H.M., Pedersen, J., Hansen, J.W. y Christensen, T. (1987), Bio/Technology, 5, 161-164
- (16)
- 65 Zhao, J.Y., Ford, C.F., Glatz, C.E., Rougvie, M.A. y Gendel, S.M. (1990) J. Biotechnol., 14, 273-283
- (17)

Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook

(18)

5

Invitrogen (biblioteca)

(19)

10

Pierce: Immobilized Monomeric Avidin Kit, www.piercenet.com

(20)

15

Pierce: Two thiol cleavable, heterobifunctional, amine- and sulfhydryl-reactive crosslinking agents, www.piercenet.com

(21)

20

Meisner M.: Pathobiochemistry and clinical use of procalcitonin, Clin Chim Acta. Septiembre de 2002;323(1-2): 17-29

(22)

25

Meisner M *et al.*: Clinical experiences with a new semi-quantitative solid phase immunoassay for rapid measurement of procalcitonin, Clin Chem Lab Med. Octubre de 2000; 38(10):989-95

(23)

30

Morgenthaler NG *et al.*: Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin, Clin Chem. Mayo de 2002; 48(5):788-90

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de analitos de muestras biológicas, que comprende las siguientes etapas de procedimiento:
- 5
- a) proporcionar una pareja de unión reversible 1 inmovilizada en una fase sólida, a la que está unida de manera reversible un ligando de analito a través de una pareja de unión reversible 2 unida al ligando de analito, inmovilizándose el ligando de analito mediante la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2,
 - 10 b) añadir la muestra biológica y unir el analito al ligando de analito inmovilizado de manera reversible en el caso de que la muestra biológica contenga el analito,
 - c) separar la muestra biológica,
 - 15 d) añadir un tampón de separación, que rompe la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2, manteniéndose opcionalmente la unión del analito al ligando de analito, y conteniendo el tampón de separación un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich, y
 - 20 e) detectar el analito en el tampón de separación en el caso de que la muestra biológica contenga el analito o establecer la ausencia del analito, en el caso de que la muestra biológica no contenga el analito.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el líquido biológico es una muestra de sangre completa sin procesar.
- 25
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la pareja de unión reversible inmovilizada 1 está inmovilizada directamente o por medio de una proteína portadora.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ligando de analito está unido covalentemente a la pareja de unión reversible 2.
- 30
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligando de analito es un anticuerpo anti-procalcitonina.
- 35
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el par de unión de parejas de unión reversible 1 y 2 se selecciona de entre uno de los siguientes pares de unión:
- a) oligómeros peptídicos cargados positiva y negativamente,
 - 40 b) péptido/proteína de unión a Ca^{2+} y anticuerpo, que se une al péptido/la proteína con mayor afinidad cuando el péptido/la proteína se ha unido al Ca^{2+} ,
 - c) oligohistidina (por ejemplo 6His) y Ni-NTA,
 - 45 d) biotina y avidina o estreptavidina o neutravidina.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el péptido/la proteína de unión a Ca^{2+} es un péptido FLAG y el anticuerpo es un anticuerpo M1 o el péptido/la proteína de unión a Ca^{2+} es un péptido de la proteína C y el anticuerpo es un anticuerpo HPC4.
- 50
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ligando de analito está marcado y también tras la adición del tampón de separación permanece marcado con un marcador para la detección del analito.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección del analito marcado tiene lugar mediante un inmunoensayo utilizando la tecnología TRACE.
- 55
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la detección del analito marcado tiene lugar por medio de inmunocromatografía.
- 60
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra biológica se utiliza sin diluir y en un volumen tal, que la parte recubierta de la fase sólida se pone completamente en contacto con la muestra biológica.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la duración de la adición de la muestra hasta la detección no supera los 30 min. y el procedimiento se considera un procedimiento de prueba rápida.
- 65
13. Kit para la realización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:

- 5 a) una fase sólida con una pareja de unión reversible inmovilizada 1,
- b) un complejo que comprende un ligando de analito unido a la pareja de unión reversible 2, pudiendo encontrarse este complejo opcionalmente inmovilizado sobre la fase sólida ya mediante la unión de las parejas de unión reversible 1 y 2,
- 10 c) un tampón de separación, que rompe la unión entre las parejas de unión reversible 1 y 2, manteniéndose opcionalmente sin embargo la unión del analito al ligando de analito, y conteniendo el tampón de separación un componente marcado adicional necesario para la detección, que es un segundo ligando de analito para la realización de un inmunoensayo de tipo sándwich.
14. Kit según la reivindicación 13, en el que el ligando de analito es un anticuerpo anti-PCT.
- 15 15. Kit según la reivindicación 13 ó 14, en el que el par de unión de parejas de unión reversible 1 y 2 se selecciona de entre uno de los siguientes pares de unión:
- 20 a) oligómeros peptídicos cargados positiva y negativamente,
- b) péptido/proteína de unión a Ca^{2+} y anticuerpo, que se une al péptido/la proteína con mayor afinidad cuando el péptido/la proteína se ha unido al Ca^{2+} ,
- c) oligohistidina (por ejemplo 6His) y Ni-NTA,
- 25 d) biotina y avidina o estreptavidina o neutravidina.

Fig. 1

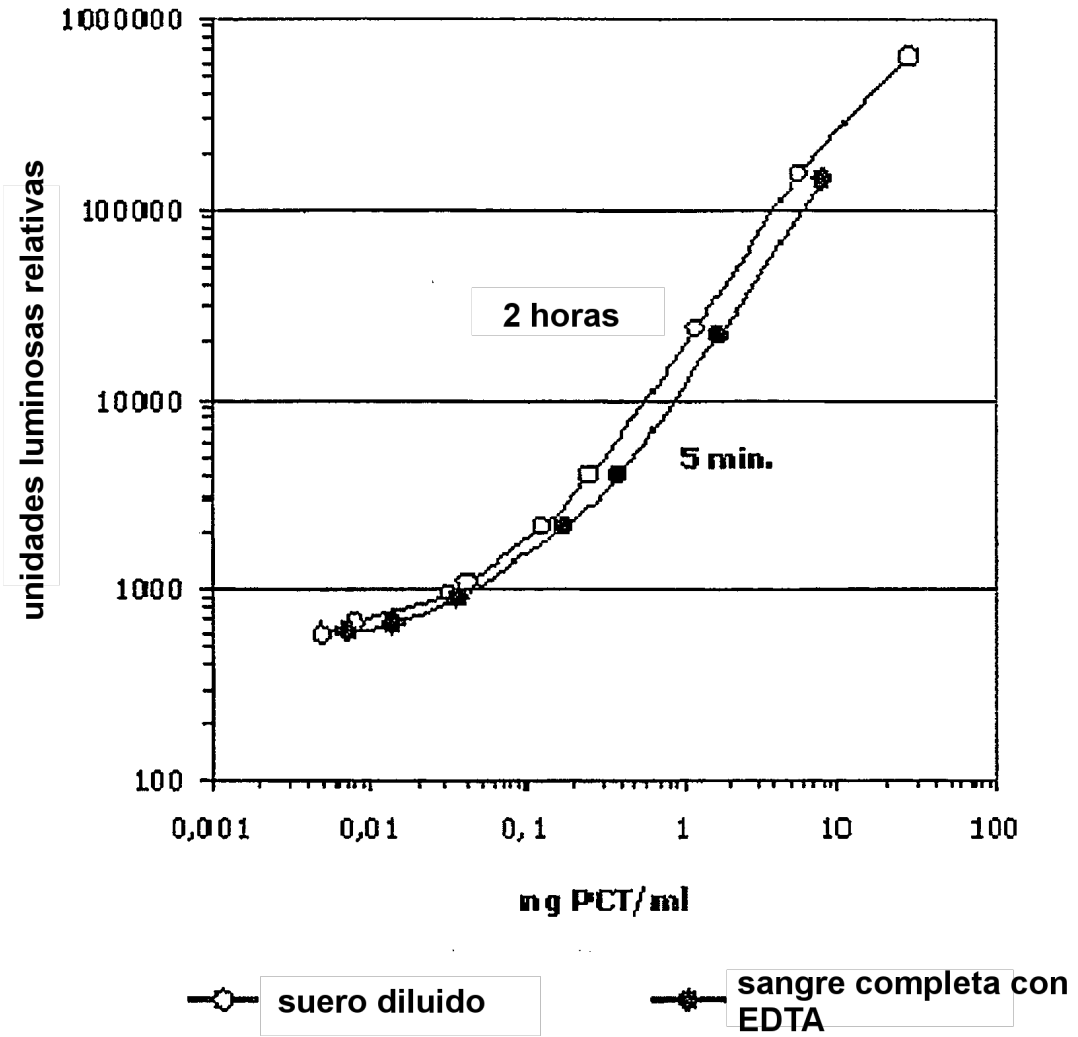


Fig. 2

Perfiles de precisión (CV de la dosis)

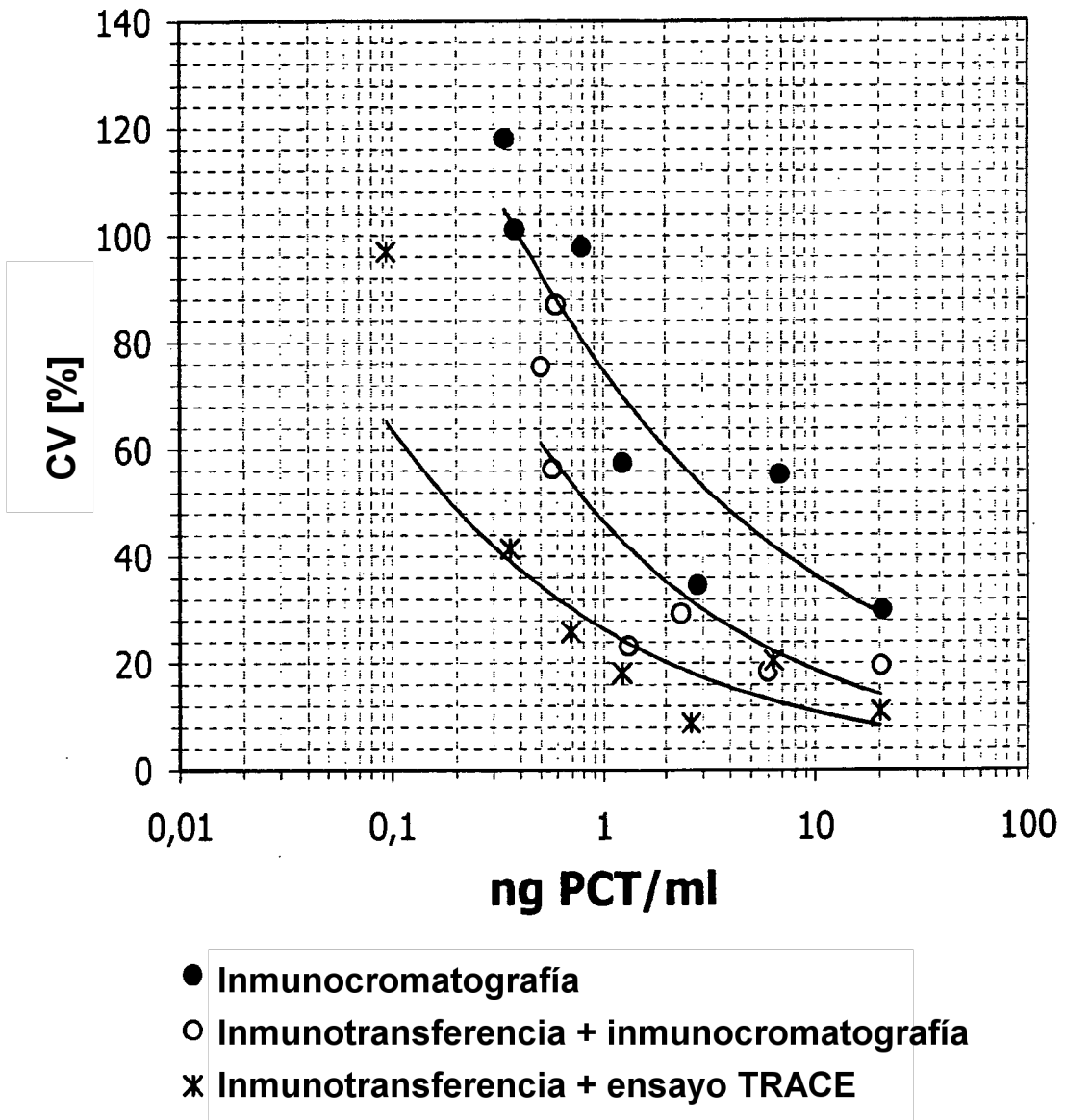


Fig. 3

