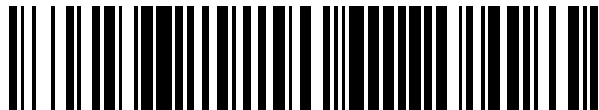


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 597**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2007 E 07863577 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 2092333**

54 Título: **Membrana de ensayo y método de uso de la misma**

30 Prioridad:

28.11.2006 US 861771 P

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

12.09.2013

73 Titular/es:

**PICTOR LIMITED (100.0%)
63 MOUNT TAYLOR DRIVE GLENDOWIE
AUCKLAND, NZ**

72 Inventor/es:

KUMBLE, SARITA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 422 597 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

Membrana de ensayo y método de uso de la misma.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la detección colorimétrica de al menos un analito en una muestra, preferiblemente múltiples analitos en una muestra, y a membranas para uso en el método.

Información general

10 Los biomarcadores pueden identificar una enfermedad antes de mostrarse los síntomas clínicos en un sujeto y, por lo tanto, proporcionan la capacidad de tratar la base molecular de la enfermedad mediante terapias dirigidas. Por ello, los biomarcadores permiten que los efectos farmacodinámicos de terapias dirigidas se evalúen antes de que sean evidentes los signos y los síntomas clínicos.

15 Se están descubriendo nuevos biomarcadores por medio de una gran variedad de estudios proteómicos y genómicos, utilizando, tecnologías muy laboriosas de bajo rendimiento, tales como espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento. Estas tecnologías son una gran herramienta de detección para identificar nuevos biomarcadores en un pequeño número de muestras procedentes de sujetos. Sin embargo, los biomarcadores deben estar capacitados para someter a ensayo un gran número de muestras procedentes de sujetos, antes de ser aceptados como un biomarcador clínicamente válido. Actualmente, las tecnologías disponibles para el escrutinio de un gran número de muestras de sujetos son costosas y complicadas.

20 Los inmunoensayos colorimétricos se consideran frecuentemente el patrón aceptado para la medición de una sola proteína. Estos ensayos implican típicamente un anticuerpo principal específico de un antígeno que se une al antígeno diana de la muestra, detectando la unión del antígeno utilizando un anticuerpo secundario ligado a un sistema de detección colorimétrica. El formato más utilizado son los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), que tienen protocolos bien establecidos para la medición de proteínas individuales en soluciones.

25 Existe una necesidad de pruebas de diagnóstico sencillas, rápidas y rentables que se puedan usar para detectar biomarcadores en muestras biológicas. El interés cada vez mayor en la medición simultánea de múltiples proteínas en muestras, ha conducido al desarrollo de inmunoensayos multiplexados en un formato de micromatriz. Las micromatrices basadas en proteínas se emplean en la actualidad para una variedad de aplicaciones. Sin embargo, esta tecnología todavía no se ha adoptado como un método de rutina para pruebas de diagnóstico, debido a dificultades técnicas en el área de la sensibilidad, la especificidad y la reactividad cruzada de los reactivos del ensayo y la necesidad de una instrumentación costosa. En consecuencia, se necesitan tecnologías que puedan desarrollarse rápidamente y poner en práctica métodos de ensayo adaptados a un alto rendimiento, un escrutinio ajustado y rentable para validar la utilidad de los biomarcadores en grandes segmentos de la población.

30 Compendio de la invención

La invención solo está limitada por sus reivindicaciones.

35 Un aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de al menos un analito diana en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz que comprende al menos un elemento de captura y, opcionalmente, una pluralidad de elementos de control esparcidos, impresos o similares, sobre la superficie de la membrana, en donde el elemento de captura, al menos uno, se corresponde con un analito diana y es capaz de unirse al mismo. La pluralidad de elementos de control, cuando se incluyen opcionalmente, puede comprender:

- 40 i) al menos un marcador de confianza,
- ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
- iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
- iv) al menos un testigo colorimétrico positivo,
- v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo o cualquiera de sus combinaciones.

45 Aunque la presente invención se describe haciendo referencia al uso de colorimetría y testigos colorimétricos, se debe entender que se pueden emplear otros sistemas de detección. Por ejemplo, se pueden usar colorantes fluorescentes tales como Texas Red y sustratos enzimáticos que generan una señal quimioluminiscente.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para detectar una pluralidad de analitos diana en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz de elementos de captura impresos en la superficie de la membrana, en donde cada elemento de captura se corresponde con un analito diana y es capaz de unirse al mismo. Opcionalmente, la matriz puede incluir además una pluralidad de elementos de control que comprenden:

- i) al menos un marcador de confianza,
- ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
- iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
- iv) al menos uno testigo colorimétrico positivo,
- 5 v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización, la matriz de elementos de captura comprende una pluralidad de grupos de elementos de captura, en donde cada elemento de captura dentro de un grupo es capaz de unirse al mismo analito diana, y en donde cada grupo de elementos de captura es capaz de unirse a un analito diana diferente de cualquier otro grupo de elementos de captura. En una realización alternativa, la matriz de elementos de captura comprende una pluralidad de parejas de elementos de captura, en donde cada elemento de captura en una pareja es capaz de unirse al mismo analito diana, en donde cada pareja de elementos de captura es capaz de unirse a un analito diana diferente de cualquier otra pareja de elementos de captura.

En una realización, la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana indicativos de una o varias enfermedades o trastornos humanos, tal y como se expone en la Tabla 1. En una realización alternativa, la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana y determina la eficacia de uno o varios tratamientos, tal y como se expone en la Tabla 2. En otra realización alternativa, la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana para someter a ensayo animales, tal y como se expone en la Tabla 3. En otra realización alternativa, la pluralidad de analitos diana representa una combinación de dos paneles cualquiera o más, tal y como se expone en las Tablas 1-3.

En una realización el analito diana se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, un péptido, un polipéptido, un fragmento de polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un fragmento de antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un ión metálico, una molécula revestida con iones metálicos, biotina, avidina, estreptavidina, un inhibidor, un cofactor, un sustrato, una enzima, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un ligando de receptor, un agonista de receptor, un antagonista de receptor, una molécula de señalización, una proteína de señalización, un fragmento de proteína de señalización, un factor de crecimiento, un fragmento de factor de crecimiento, un factor de transcripción, un fragmento de factor de transcripción, un inhibidor, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido, una glicoproteína, un lípido, una célula, una proteína de la superficie celular, un lípido de la superficie celular, un carbohidrato de la superficie celular, una glicoproteína de la superficie celular, un extracto celular, un virus, una proteína de la cubierta vírica, una hormona, una proteína sérica, una proteína de la leche, un oligonucleótido, una macromolécula, una droga, o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

En una realización el elemento de captura se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, una proteína de unión (BP, del inglés "binding protein"), un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio único (un VHH, por ejemplo), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un dominio de unión; un ión metálico, una molécula revestida con iones metálicos; biotina, avidina, estreptavidina; un sustrato, una enzima, una abzima, un cofactor, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un inhibidor, una hormona, un sitio de unión, una lectina, una polihistidina, un dominio de acoplamiento, un oligonucleótido, o una combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

En una realización, el elemento de captura es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y el analito diana es un antígeno. En otra realización, el elemento de captura es un antígeno y el analito diana es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En una realización, el analito diana es un antígeno asociado con una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad infecciosa, una enfermedad alérgica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad cardíaca, un cáncer o una enfermedad del injerto contra el hospedador.

En otra realización, el analito diana es un contaminante de la sangre para someter a ensayo muestras de bancos de sangre, un factor determinante de la compatibilidad para determinar un rechazo de trasplante, un analito indicativo del embarazo (tal como gonadotropina coriónica humana, hCG) o la fertilidad, un fármaco o una hormona presente en un fluido corporal, un marcador de la activación celular tal como un factor de crecimiento, una citocina o una quimiocina.

En otra realización, el analito diana es un anticuerpo asociado con una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad infecciosa, una enfermedad alérgica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad cardíaca, un cáncer, una enfermedad del injerto contra el hospedador o un rechazo de trasplante de órganos.

5 En una realización, la membrana es una membrana de nitrocelulosa, nailon, poli(difluoruro de vinilideno), poliéster, poliestireno, polietersulfona, acetato de celulosa, éster de celulosa mixta o de policarbonato.

En una realización, la membrana está fijada de forma movable a una placa de microtitulación sin fondo.

10 En una realización, el marcador de confianza es un colorante, una proteína conjugada con colorante o una proteína cromogénica, una proteína conjugada con hapteno o una proteína conjugada con enzima; por ejemplo, azul de Coomassie, oro coloidal, Ponceau S, una enzima peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) o un marcador del peso molecular teñido. Preferiblemente, el marcador de confianza permite una orientación y un reticulado de la matriz.

15 La matriz contenida sobre la membrana de la invención, ya sea a través de moteado, impresión u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, comprende típicamente una pluralidad de testigos que incluyen, por ejemplo, al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo, al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo, al menos un testigo colorimétrico positivo, y al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.

En una realización, el testigo negativo para supervisar la señal de fondo es el tampón de impresión.

20 En una realización, el testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo comprende uno o varios isotipos de anticuerpos, un anticuerpo correspondiente o un isotipo de anticuerpo de una especie animal diferente o un ligando estrechamente relacionado.

En una realización el testigo colorimétrico positivo es una enzima capaz de reaccionar con un sustrato para generar un resultado detectable. En una realización el marcador enzimático comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa o glucosa oxidasa. En una realización, el testigo colorimétrico comprende el mismo sistema de colorimetría utilizado para determinar una unión del analito diana-elemento de captura positivo.

25 En una realización, el testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo comprende un ligando de una pareja de unión complementaria, en donde el otro ligando es un componente de la muestra o un reactivo del ensayo. El testigo de la eficiencia del ensayo se selecciona preferiblemente a partir de un analito diana, un ligando correspondiente y capaz de unirse a un analito no diana que estará presente en la muestra, un ligando correspondiente y capaz de unirse a un reactivo del ensayo y un marcador enzimático colorimétrico, o cualquier combinación entre dos cualquiera o más de los mismos.

30 En otra realización, la matriz comprende 1, 2, 3 o 4 testigos positivos para supervisar la eficiencia del ensayo. En una realización preferida, la matriz comprende al menos 3 testigos positivos para supervisar la eficiencia del ensayo.

En una realización, cada elemento de la matriz se imprime como una zona discreta con un diámetro entre 100 μm a 500 μm . Preferiblemente, cada zona discreta tiene un diámetro entre 350 μm a 400 μm .

35 En una realización, las áreas discretas de la matriz están impresas en una cuadrícula de 5x5 pero cualquier formato de matriz es útil dentro del alcance de la invención. No es necesario que la matriz sea simétrica.

En una realización, cuatro o más elementos de captura diferentes se imprimen en la matriz. En otra realización, al menos dos réplicas de cada elemento de captura se imprimen en la matriz.

40 Otro aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de una pluralidad de antígenos diana o ligandos de anticuerpos en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz de elementos de captura impresa sobre la superficie de la membrana, en donde cada elemento de captura se corresponde y es capaz de unirse a un antígeno diana o a un ligando de anticuerpo, en donde los elementos de captura comprenden un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. La matriz puede comprender además una pluralidad de elementos de control que incluyen:

- 45
- i) al menos un marcador de confianza,
 - ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
 - iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
 - iv) al menos uno testigo colorimétrico positivo,
 - v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo, o cualquiera de sus combinaciones.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de una pluralidad de

anticuerpos diana en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz de elementos de captura impresa en la superficie de la membrana, en donde cada elemento de captura se corresponde y es capaz de unirse a un anticuerpo diana, en donde los elementos de captura comprenden un antígeno o un ligando de anticuerpo. Opcionalmente, la matriz puede incluir además una pluralidad de elementos de control que incluyen:

- 5
- i) al menos un marcador de confianza,
 - ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
 - iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
 - iv) al menos uno testigo colorimétrico positivo,
 - v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo, o cualquiera de sus combinaciones.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de una pluralidad de ligandos diana en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz de elementos de captura impresa en la superficie de la membrana, en donde cada elemento de captura se corresponde y es capaz de unirse a un ligando diana, en donde los elementos de captura comprenden un receptor o una subunidad del receptor. La matriz incluye además opcionalmente una pluralidad de elementos de control que incluyen

- 15
- i) al menos un marcador de confianza,
 - ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
 - iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
 - iv) al menos uno testigo colorimétrico positivo,
 - v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo, o cualquiera de sus combinaciones.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de una pluralidad de receptores diana o subunidades de receptores en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz de elementos de captura impresa en la superficie de la membrana, en donde cada elemento de captura es capaz de unirse a un receptor diana o una subunidad del receptor, en donde los elementos de captura comprenden un ligando del receptor o un ligando de la subunidad del receptor. La matriz incluye además opcionalmente una pluralidad de

25 elementos de control que incluyen:

- i) al menos un marcador de confianza,
 - ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
 - iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
 - iv) al menos uno testigo colorimétrico positivo,
 - v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo, o cualquiera de sus combinaciones.
- 30

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección de una pluralidad de analitos diana en una muestra que incluye

- (a) al menos una membrana tal y como se ha descrito anteriormente, y opcionalmente uno o más de los siguientes elementos:
- 35 (b) un reactivo reductor del ruido de fondo (conocido también como solución de bloqueo),
- (c) una solución de lavado,
- (d) uno o varios anticuerpos (incluidos los conjugados de anticuerpo-proteína de unión (BP) o los conjugados de anticuerpo-marcador enzimático, o ambos) para la detección de antígenos, ligandos o anticuerpos unidos a los elementos de captura o para la detección de los testigos positivos,
- 40 (e) un sistema de detección colorimétrico,
- (f) un programa informático para la determinación de la intensidad de la señal en cada punto y el análisis de los resultados, y
- (g) un protocolo para medir la presencia de analitos en muestras y cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el agente reductor del ruido de fondo es un agente de bloqueo proteico seleccionado entre el

grupo que comprende leche descremada, caseína, albúmina de suero bovino, gelatinas de pescado, cerdos u otras especies y dextrano. El agente de bloqueo puede estar suplementado con un detergente tal como Tween 20, Triton X-100 y CHAPS.

5 En una realización, el sistema de detección colorimétrica comprende un marcador enzimático seleccionado entre el grupo que comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa o glucosa oxidasa y un sustrato seleccionado a partir de la lista que comprende 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, diaminobencidina, diaminobencidina potenciada con metal, 4-cloro-1-naftol, oro coloidal, cloruro de tetrazolio nitro-azul, sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato y fosfato de naftol AS-MX + sal Fast Red TR.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un método de procesamiento de una micromatriz, o de detección de un analito en una muestra que comprende

(a) proporcionar una membrana descrita anteriormente,

(b) añadir al menos una muestra a la membrana, y

(c) procesar la membrana de tal manera que se proporcione un resultado detectable mediante dos o más de los siguientes elementos:

15 i) al menos un marcador de confianza,

ii) al menos un testigo colorimétrico positivo, y

iii) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.

20 En una realización, la etapa de procesado de la membrana comprende una etapa de bloqueo durante la cual se bloquean sitios de unión a proteínas disponibles en la membrana, una etapa de lavado opcional, poner en contacto la membrana con la muestra que contiene uno o varios analitos que se van a medir, una etapa de lavado para eliminar el material no unido de la membrana, poner en contacto la membrana con uno o varios anticuerpos secundarios que se corresponden y se unirán a uno o varios analitos diana y a un analito no diana que está unido a un testigo de la eficiencia del ensayo, una etapa de lavado opcional, y poner en contacto la membrana con uno o ambos entre un conjugado enzimático o un sustrato enzimático para generar un resultado detectable.

25 Se pretende que la referencia a una serie de números descritos en este documento (por ejemplo, 1 a 10) también incorpore como referencia todos los números racionales dentro de esa serie (por ejemplo, 1, 1,1, 2, 3, 3,9, 4, 5, 6, 6,5, 7, 8, 9 y 10) y también cualquier serie de números racionales dentro de esa serie (por ejemplo, 2 a 8, 1,5 a 5,5 y 3,1 a 4,7) y, por lo tanto, todas las subseries de todas las series expresamente descritas en este documento, se describen por ello expresamente. Estos son solo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las combinaciones posibles de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados, han de considerarse que se indican expresamente en esta solicitud de una manera similar.

30 La invención también se puede decir en términos generales que consiste en las partes, elementos y características referidas o indicadas en la memoria descriptiva de la solicitud, de forma individual o colectivamente, en alguna o en todas las combinaciones de dos o más de dichas partes, elementos o características, y cuando se mencionan números enteros específicos en este documento que tienen equivalentes conocidos en la técnica a la que se refiere la invención, dichos equivalentes conocidos se estimarán incorporados en esta memoria como si se describieran individualmente. En Biomaterials 26(10), 2005, páginas 1081-1085, se describen matrices proteicas que contienen tres testigos diferentes.

Breve descripción de los Dibujos

40 Las Figuras 1A-1C son representaciones gráficas que resumen (1A) el procesamiento de una matriz de anticuerpos de la invención para la detección de antígenos, (1B) una matriz de antígenos de la invención para la detección de anticuerpos y (1C) las etapas para el procesamiento de una matriz impresa de la invención.

La Figura 2 es una representación gráfica que resume la función y el procesamiento de los puntos de testigos presentes en una matriz impresa sobre una membrana de ensayo de la invención.

45 La Figura 3 es un diagrama gráfico que resume los resultados del Ejemplo 5 obtenidos a partir del procesamiento de suero humano enriquecido con citocinas. La línea discontinua representa la señal umbral por encima de la cual el resultado se considera positivo. El umbral se fija multiplicando por dos la intensidad de la señal del punto del testigo negativo (el punto del tampón).

50 La Figura 4 es un diagrama gráfico que resume los resultados del Ejemplo 6 obtenidos a partir del procesamiento de una muestra de suero humano enriquecida con anticuerpos para antígenos de superficie de la hepatitis B. La línea discontinua representa la señal umbral por encima de la cual el resultado se considera positivo. El umbral se fija multiplicando por dos la intensidad de la señal del punto del testigo negativo (el punto del tampón).

La Figura 5 es un diagrama gráfico que resume los resultados del Ejemplo 7 que determina la eficacia de un marcador de confianza de una realización de la invención. Las unidades del eje x identifican el número de tubo y por lo tanto el factor de dilución.

5 La Figura 6 es un diagrama gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 10 que muestra matrices de agentes patógenos víricos de las vías respiratorias superiores para la detección de anticuerpos en muestras de suero. Seis muestras de suero humano se sometieron a ensayo con una dilución de 1 a 800 para estudiar la presencia de anticuerpos para cada uno de los seis antígenos víricos en las matrices. Un umbral de intensidad de la señal de 100000 se fijó para una prueba positiva. En base a este umbral se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 20.

10 La Figura 7 es un diagrama gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 1 en donde se muestran los resultados procedentes de diez muestras de suero humano que se sometieron a ensayo con una dilución de 1 a 4000 para estudiar la presencia de anticuerpos para cada uno de los cuatro antígenos de la hepatitis B en las matrices.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a una membrana de ensayo para la detección de al menos un analito diana o una pluralidad de analitos diana en una muestra, así como a kits para detectar dichos analitos diana y a un método de procesamiento de la membrana del ensayo.

20 Los biomarcadores pueden identificar una enfermedad antes de que un sujeto muestre los síntomas clínicos y, por lo tanto, proporcionan la capacidad de tratar la base molecular de una enfermedad mediante terapias dirigidas. La base para la estratificación de un sujeto está en correlación con la heterogeneidad molecular de la enfermedad con una heterogeneidad de la respuesta a la terapia. Como tal, la diana del fármaco debe estar presente y tener una función en el mantenimiento o el empeoramiento del estado de la enfermedad del sujeto, con el fin de que el fármaco sea eficaz. Esta diana, por lo tanto, servirá como un biomarcador para determinar si el sujeto es un candidato para el tratamiento con esa terapia en particular. Por ejemplo, se requiere la presencia de Her2/neu en tumores para un tratamiento eficaz con anticuerpos anti-Her2, tales como Herceptina. Los biomarcadores también se pueden utilizar para un análisis retrospectivo de las muestras, después de que se hayan completado los ensayos clínicos o después de un análisis posterior a la comercialización de nuevos fármacos, para llevar a cabo un análisis en subgrupos para identificar covariables que se esperaban para justificar diferencias en la respuesta.

30 En consecuencia, la presente invención contempla una pluralidad de agentes de captura dispuestos para detectar uno o varios (es decir, un panel) analitos diana (es decir, biomarcadores) que pueden ser utilizados para una variedad de ensayos. Por ejemplo, durante los ensayos clínicos se puede supervisar un panel de biomarcadores para determinar la eficacia de la terapia, al mismo tiempo que se garantiza la falta de efectos secundarios o cualquier otro evento adverso. Por lo tanto, un panel de biomarcadores se puede utilizar para analizar una variedad de afecciones y/o para validar adicionalmente uno o varios biomarcadores potenciales. Ejemplos de trastornos incluyen, pero no se limitan a enfermedades o alergias humanas, detección de embarazo, enfermedades de animales y pruebas en animales realizadas antes de la exportación. Se debe entender que el panel de biomarcadores se puede utilizar durante todas las fases de los ensayos clínicos para obtener una mayor comprensión del mecanismo del fármaco en una población, antes de la aprobación y la administración general del fármaco. Además, los biomarcadores pueden respaldar un resultado clínico que procede de estudios de la eficacia y ayudar a medir el beneficio clínico real para el sujeto.

40 Los biomarcadores también se pueden utilizar para determinar qué sujetos es probable que respondan a una terapia particular. Los biomarcadores también se pueden usar para supervisar la progresión de una enfermedad y la eficacia de un tratamiento, midiendo simultáneamente los niveles de diversos parámetros de una enfermedad, aumentando de este modo el beneficio del tratamiento para el sujeto. Estos paneles de biomarcadores tienen como objetivo identificar el fármaco adecuado para el sujeto adecuado en el momento adecuado.

45 La validación de biomarcadores para la predicción de una enfermedad, un trastorno o una afección se refiere a la confirmación de la exactitud, la reproducibilidad y la eficacia de los biomarcadores en la detección de la enfermedad, el trastorno o la afección. El principal desafío para la validación de biomarcadores es el alto nivel de variabilidad de los niveles de biomarcadores entre la población humana y la considerable heterogeneidad molecular de enfermedades específicas, incluso procedentes de un solo tejido. Ya que un biomarcador recién descubierto marca la transición entre el nivel de investigación y el laboratorio de diagnóstico clínico, se tiene que controlar a través de estadios definidos de confirmación. La primera tarea en la validación de un biomarcador es la evaluación de la tecnología de la investigación, la eficiencia y las especificaciones (validación analítica). Sin embargo, el objetivo final es la validación inicial del biomarcador para identificar enfermedades, trastornos o afecciones en el primer estadio (validación clínica). Después de la confirmación técnica y clínica, los ensayos que implican el biomarcador se trasladan sistemáticamente hacia un formato reproducible, estandarizado y de alto rendimiento para la aplicación del diagnóstico clínico. Con una eficiencia a nivel de laboratorio rigurosamente establecida, las variables clínicas se pueden analizar posteriormente para definir las limitaciones, las aplicaciones y la utilidad clínica.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que normalmente entiende un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento, se pueden utilizar en la práctica o en los ensayos de la invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

Tal y como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o varios métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento, que serán evidentes para los expertos en la técnica, después de leer esta descripción y así sucesivamente.

El término "biomarcador" se refiere a cualquier sustancia utilizada como un indicador de un estado biológico. Por lo tanto, un biomarcador puede ser cualquier sustancia cuya detección indica un estado de enfermedad particular (por ejemplo, la presencia de un anticuerpo puede indicar una infección). Por otra parte, un biomarcador puede ser indicativo de un cambio en la expresión o el estado de una proteína que se correlaciona con el riesgo o la progresión de una enfermedad, o con la susceptibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado. Una vez que un biomarcador propuesto ha sido validado, se puede utilizar para diagnosticar el riesgo de enfermedad, la presencia de una enfermedad en un individuo o para adaptar tratamientos a la enfermedad en un individuo (por ejemplo, opciones de tratamiento con fármacos o regímenes de administración). En la evaluación de terapias potenciales con fármacos, un biomarcador puede ser utilizado como un sustituto para un criterio de valoración natural, tal como la supervivencia o la morbilidad irreversible. Si un tratamiento altera el biomarcador, que tiene una conexión directa con una mejora de la salud, el biomarcador sirve como un "criterio de valoración sustituto" para la evaluación del beneficio clínico.

Tal y como se usa en este documento, la expresión "elemento del ensayo" se refiere a cualquiera entre una variedad de elementos diferentes, para uso en una matriz de la invención. Elementos del ensayo ejemplares incluyen, pero no se limitan a, elementos de captura y elementos de control.

La expresión "elemento de captura" se refiere a una molécula que es capaz de unirse a un analito diana. Ejemplos de elementos de captura útiles incluyen proteínas, fragmentos de proteínas, proteínas de unión, fragmentos de proteínas de unión, anticuerpos (policlonal, monoclonal o quimérico), fragmentos de anticuerpos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio sencillo (un VHH por ejemplo), fragmentos de anticuerpos Fab, fragmentos de anticuerpo Fc, fragmentos de anticuerpos Fv, fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, fragmentos de anticuerpos Fab', fragmentos de anticuerpos Fv de una sola cadena (scFv), dominios que se unen a anticuerpos, antígenos, determinantes antigénicos, epítopos, haptenos, inmunógenos, fragmentos de inmunógeno, dominios de unión; un ión metálico, una molécula revestida con ion metálico, biotina, avidinas, estreptavidinas; sustratos, enzimas, abzymas, cofactores, receptores, fragmentos de receptores, subunidades de receptores, fragmentos de subunidades de receptores, ligandos, inhibidores, hormonas, sitios de unión, lectinas, polihistidinas, dominios de acoplamiento y oligonucleótidos. Los elementos de captura útiles se corresponden y son capaces de unirse a un analito diana específico, tal como una molécula o una clase de moléculas que están presentes en una muestra que se va a someter a ensayo.

Igualmente, la expresión "elemento de captura de control" se refiere a un elemento de captura que funciona como un testigo, ya sea un testigo negativo que no se debe unir a ningún analito o un testigo positivo que se unirá a un analito no diana.

La expresión "elemento de control" se refiere a un elemento que se utiliza para proporcionar información sobre la función del ensayo, por ejemplo, la especificidad de la unión, el nivel de unión no específica de la señal de fondo, el grado de reactividad cruzada en la unión y la eficiencia de los reactivos del ensayo y el sistema de detección. Los testigos preferidos útiles en esta memoria, incluyen al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo, al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo, al menos un testigo colorimétrico positivo, y al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.

La expresión "testigo para supervisar la eficiencia del ensayo" se refiere a un elemento que forma una parte de una interacción con unión complementaria durante un ensayo y está destinado a proporcionar información sobre la precisión del resultado del ensayo. En una realización, el testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo comprende un ligando de una pareja de unión complementaria, en donde el otro miembro de la pareja de unión es un componente de la muestra o un reactivo del ensayo. El testigo de la eficiencia del ensayo se selecciona preferiblemente a partir de un analito diana, un ligando correspondiente y capaz de unirse a un analito no diana que estará presente en la muestra, un ligando correspondiente y capaz de unirse a un reactivo del ensayo, y un marcador colorimétrico enzimático o cualquiera de las combinaciones de dos cualquiera o más de los mismos. Un ejemplo de un ligando correspondiente y capaz de unirse a un analito no diana que estará presente en la muestra, es un anticuerpo anti-Ig que se unirá a una inmunoglobulina presente en una muestra sérica, confirmando por lo tanto que se ha añadido una muestra. Un ejemplo de ligando correspondiente y capaz de unirse a un reactivo del ensayo, es un anticuerpo anti-Ig que se unirá a una inmunoglobulina secundaria que se utiliza para procesar el

ensayo, tal como un anticuerpo anti-analito diana biotinilado. Otro ejemplo de un ligando correspondiente y capaz de unirse a un reactivo del ensayo, es un anticuerpo biotinilado que se unirá a un conjugado de estreptavidina-peroxidasa que se utiliza para procesar el ensayo.

5 La expresión "testigo para supervisar la especificidad del ensayo" se refiere a un elemento que está estrechamente relacionado con al menos un ligando de una pareja de unión complementaria, presente en el ensayo y está destinado a proporcionar información sobre la especificidad de la unión complementaria. Este testigo es un testigo negativo que no se espera que genere un resultado detectable durante el procesamiento normal del ensayo. Por ejemplo, en una matriz de anticuerpos para la detección de antígenos, el testigo de la especificidad del ensayo comprendería un anticuerpo que no se debe unir a ningún antígeno en la muestra. Alternativamente, en una matriz de antígenos para la detección de anticuerpos, el testigo de la especificidad del ensayo comprendería un antígeno que no debe unirse a ningún anticuerpo en la muestra.

La expresión "marcador de confianza" se refiere a un marcador o a una etiqueta con color que siempre va a ser detectable sobre la membrana, preferiblemente con independencia de la realización del ensayo o del procesamiento de la membrana. El marcador de confianza actúa por lo tanto como un testigo positivo "verdadero".

15 La expresión "membrana microporosa" se refiere a una membrana con características de unión a proteínas y una estrecha distribución del tamaño de poro. En una realización, la porosidad de la membrana puede determinar el tiempo de exposición de los reactivos con componentes que se unen a la membrana, mediante el control del caudal a través de la membrana. Las membranas microporosas para uso en la presente invención comprenden nitrocelulosa, nailon, poli(difluoruro de vinilideno), poliéster, poliestireno, polietersulfona, acetato de celulosa, ésteres de celulosa mixtos y policarbonato.

La expresión "testigo negativo" se refiere a un elemento que comprende el tampón de impresión o una proteína no relacionada para la cual no hay ningún ligando complementario en el ensayo. Cualquier señal detectable procedente del testigo negativo se puede utilizar para determinar el umbral del ruido de fondo del ensayo y la exactitud de cualquier resultado positivo. En una realización, el testigo negativo para supervisar la señal de fondo es el tampón de impresión. El tampón de impresión es una solución utilizada para transportar e imprimir los elementos de captura y los elementos de control sobre la membrana, y puede comprender solución salina tamponada, glicerol y un tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo de polisorbato, tal como Tween 20. La solución de bloqueo se utiliza para reducir la unión de proteína no específica a la superficie de la membrana y comprende preferiblemente leche descremada, caseína, albúmina de suero bovino, gelatinas de pescado, cerdos u otras especies, dextrano o cualquier mezcla de dos cualesquiera o más de los mismos, preferiblemente en una solución salina tamponada con fosfato y un tensioactivo tal como Tween 20.

La expresión "testigo colorimétrico positivo" tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a una enzima o a un conjugado enzimático que proporciona una señal detectable después de la adición del sustrato enzimático.

35 El término "impresión" tal y como se utiliza en esta memoria, se refiere a la colocación de los elementos del ensayo (elementos de captura y de control) sobre la superficie de la membrana, con o sin una molécula adaptadora entre la membrana y el elemento. Preferiblemente, los elementos del ensayo se unen a la membrana por interacción covalente o no covalente. Un experto en la técnica reconocerá que los métodos de colocación de elementos del ensayo sobre la membrana incluyen la impresión, el depósito de microgotitas u otros métodos conocidos en la técnica. Para los fines de la presente solicitud, el término "impresión" se puede utilizar para incluir cualquiera de los métodos para colocar los elementos del ensayo sobre la membrana.

Los términos "muestra" y "espécimen" tal y como se usan en la presente memoria, se utilizan en su sentido más amplio para incluir cualquier composición que se obtiene y/o se deriva de una fuente biológica o ambiental, así como dispositivos de toma de muestras (por ejemplo, hisopos) que se ponen en contacto con muestras biológicas o ambientales. Las "muestras biológicas" incluyen las obtenidas a partir de un animal (incluidos los seres humanos, los animales domésticos, así como los animales salvajes o silvestres, como ungulados, oso, peces, lagomorfos, roedores, etc.), fluidos corporales como orina, sangre, plasma, materia fecal, leche, exudado del pezón, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen, esputo y saliva, así como tejido sólido. Las muestras biológicas también incluyen una célula (por ejemplo, líneas celulares, células aisladas de tejido tanto si las células aisladas se cultivan después del aislamiento a partir del tejido como si no, células fijadas, tales como células fijadas para análisis histológico y/o inmunohistoquímico), tejido (tal como material de biopsia), extracto celular, extracto tisular y ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN) aislado a partir de una célula y/o tejido, y similares. También se incluyen materiales obtenidos a partir de productos alimenticios y de ingredientes alimenticios, tales como productos lácteos, verduras, carne, subproductos cárnicos y residuos. "Las muestras ambientales" incluyen material ambiental tal como materia de la superficie, suelo, agua y materiales industriales, así como material obtenido a partir de alimentos y de instrumentos, aparatos, equipamiento, artículos desechables y no desechables para el procesamiento de lácteos. En una realización, la muestra biológica es una célula, un tejido y/o un fluido obtenido a partir de un mamífero, incluyendo a partir de los tejidos del tracto respiratorio superior (por ejemplo, un lavado nasofaríngeo, un aspirado nasofaríngeo, un hisopo nasofaríngeo y un hisopo orofaríngeo), a partir de los tejidos de las vías respiratorias inferiores (tales como un lavado bronquiolar, un aspirado traqueal, una punción pleural, un esputo), sangre, plasma, suero, heces, leche, exudado del pezón y tejido de cualquier órgano, tal como, sin limitación, pulmón, corazón, bazo, hígado,

cerebro, riñón y glándulas suprarrenales. Estos ejemplos son ilustrativos, y no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

El término "anticuerpo" tal y como se utiliza en este documento, incluye anticuerpos presentes en la naturaleza, así como anticuerpos de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, quiméricos, bifuncionales y humanizados, así como fragmentos de los mismos que se unen a antígeno. Tales anticuerpos que no se encuentran en la naturaleza pueden construirse usando la síntesis de péptidos en fase sólida, pueden producirse de manera recombinante o pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el escrutinio de bancos combinatorios que consisten en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables (véase, Huse et al., Science 246: 1275-1281, 1989, que se incorpora en esta memoria como referencia). Estos y otros métodos de preparación, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados a CDR, de cadena sencilla y bifuncionales, son bien conocidos (Winter y Harris, Immunol. Today 14:243-246, 1993; Ward et al., Nature 341:544-546, 1989; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Hilyard et al., Protein Engineering: A practical approach (IRL Press 1992); Borrabeck, Antibody Engineering, 2ª ed. (Oxford University Press 1995); cada una de las cuales se incorpora en este documento como referencia). Además, los anticuerpos modificados o derivatizados, o los fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, tales como anticuerpos pegilados (modificados con polietilenglicol), pueden ser útiles para los presentes métodos. Como tal, los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd y Fv de un anticuerpo que conservan la actividad de unión específica, están incluidos dentro de la definición de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo secundario" se refiere a un anticuerpo que se unirá a un analito diana y que se conjuga, ya sea con una molécula adaptadora tal como biotina o con un marcador enzimático como la peroxidasa de rábano picante (HRP). Los conjugados de anticuerpo-adaptador se procesan para proporcionar un resultado detectable poniendo en contacto el conjugado de anticuerpo-adaptador con un conjugado de enzima-adaptador y, a continuación el sustrato enzimático, por ejemplo, los conjugados de anticuerpo-biotina se unirán a conjugados de estreptavidina-HRP. Los conjugados de anticuerpo-marcador enzimático incluyen conjugados de anticuerpo-HRP. El uso de anticuerpos secundarios se describe y ejemplifica a continuación.

La expresión "se une específicamente" o "actividad de unión específica" o similares, significa que dos moléculas forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La expresión es también aplicable cuando, p. ej., un dominio que se une a antígeno es específico de un epítipo particular, el cual es portado por una serie de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo portador del dominio que se une al antígeno será capaz de unirse a los diversos antígenos que son portadores del epítipo. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad de baja a moderada. Típicamente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad es de aproximadamente 1×10^{-6} M, generalmente al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, usualmente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, y particularmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M o 1×10^{-10} M o menos.

Diseño de la matriz

Como se ha descrito anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a una membrana microporosa para la detección de una pluralidad (es decir, un panel) de analitos diana (por ejemplo, biomarcadores) en una muestra, en donde la membrana comprende una matriz que comprende al menos un elemento de captura y una pluralidad de elementos de control impresos en la superficie de la membrana, en donde al menos un elemento de captura se corresponde y es capaz de unirse a un analito diana. Cuando se incluye opcionalmente, la pluralidad de elementos de control incluye

- i) al menos un marcador de confianza,
- ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
- iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
- iv) al menos un testigo colorimétrico positivo,
- v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo o cualquiera de sus combinaciones.

La elección de la membrana depende de tres características principales de la membrana: la capacidad de unión a proteínas, la porosidad y la solidez. La capacidad de la membrana para inmovilizar macromoléculas, en particular proteínas es crucial, ya que la membrana sirve como la fase sólida utilizada en el ensayo. Sin embargo, esta capacidad se debe equilibrar con la disponibilidad de reactivos apropiados (es decir, bloqueantes) para el bloqueo de interacciones no específicas sobre la membrana. Del mismo modo, en una configuración de flujo a través, la porosidad de la membrana puede determinar el tiempo de exposición de los reactivos a componentes unidos a la membrana, controlando su caudal a través de la membrana. Sin embargo, la porosidad debe estar equilibrada con el grado de difusión de los puntos en la matriz durante la preparación de la matriz, lo que puede dar lugar a una disminución de la intensidad de la señal o a una contaminación cruzada entre puntos adyacentes. La solidez de la membrana es importante para la preparación y el uso eventual de un dispositivo. Están disponibles una amplia gama de membranas con características diferentes, lo que permite que una membrana particular se escoja en función de los requisitos de un ensayo.

En realizaciones preferidas, las membranas microporosas para uso en la presente invención comprenden nitrocelulosa, nailon, poli(difluoruro de vinilideno), poliéster, poliestireno, polietersulfona, acetato de celulosa, ésteres de celulosa mixtos y policarbonato.

5 Aunque algunas membranas tales como las de acetato de celulosa pueden tener capacidades de unión insuficientes para inmunoensayos de diagnóstico, las características de tales membranas pueden ser aplicables a ensayos en los que son suficientes niveles inferiores de exactitud o sensibilidad.

10 La membrana microporosa se puede fijar preferentemente de forma movable a una placa de microtitulación sin fondo. En consecuencia, la membrana se puede dividir en pocillos de microtitulación individuales que están separados entre sí por una barrera física, para evitar que se mezclen las muestras entre los pocillos. Por otra parte, se pueden realizar diferentes ensayos en pocillos separados, lo que requiere menores volúmenes de reactivos del ensayo.

Los elementos de captura específicos de un analito diana se usan para detectar la presencia o ausencia del analito en una muestra. Se conoce una amplia gama de ligandos o parejas acoplamiento complementarios, determinando la elección de los elementos de captura a través de los analitos que se van a detectar, los requerimientos de moléculas adaptadoras y el nivel de especificidad requerido para el ensayo.

15 En una realización, el analito diana se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, un péptido, un polipéptido, un fragmento de polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un fragmento de antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un ión metálico, una molécula revestida con iones metálicos, biotina, avidina, estreptavidina, un inhibidor, un cofactor, un sustrato, una enzima, un receptor, un fragmento de receptor, 20 una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un ligando de receptor, un agonista de receptor, un antagonista de receptor, una molécula de señalización, una proteína de señalización, un fragmento de proteína de señalización, un factor de crecimiento, un fragmento de factor de crecimiento, un factor de transcripción, un fragmento de factor de transcripción, un inhibidor, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido, una glicoproteína, un lípido, una célula, una proteína de la superficie celular, un lípido de la superficie celular, un hidrato de carbono de la superficie celular, una glicoproteína de la superficie celular, un extracto celular, 25 un virus, una proteína de la cubierta del virus, una hormona, una proteína sérica, una proteína de la leche, un oligonucleótido, una macromolécula, una droga o cualquier combinación de dos cualquiera o más de los mismos.

30 En una realización, el elemento de captura se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, una proteína de unión, un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio único (un VHH, por ejemplo), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un determinante antigénico, un epítipo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un dominio de unión; un ión metálico, una molécula 35 revestida con iones metálicos; biotina, avidina, estreptavidina; un sustrato, una enzima, un abzima, un cofactor, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un inhibidor, una hormona, un sitio de unión, una lectina, una polihistidina, un dominio de acoplamiento, un oligonucleótido, o una combinación de dos cualesquiera o más de los mismos

40 En otra realización, las parejas de la unión complementarias comprenden interacciones anticuerpo-antígeno o interacciones anticuerpo-ligando.

En otra realización, los elementos de captura pueden comprender anticuerpos o fragmentos de los mismos que están inmovilizados sobre la superficie de la membrana y son específicos para diferentes antígenos o ligandos que pueden estar presentes en una muestra.

45 En otra realización, los elementos de captura pueden comprender antígenos o ligandos y el ensayo implica la detección de anticuerpos específicos que pueden estar presentes en una muestra.

En otras realizaciones, los elementos de captura pueden comprender un receptor o una subunidad de un receptor que se une a un ligando específico.

En una realización, el analito diana está asociado con una enfermedad infecciosa, una enfermedad alérgica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad cardíaca, cáncer o una enfermedad de injerto contra hospedador.

50 En una realización, el analito diana se selecciona a partir de la lista que comprende factores angiogénicos tales como Ang-2, FGF básico, HB-EGF, HGF, KGF, PDGF-BB, TIMP-1, TIMP-2, TPO y VEGF; biomarcadores tales como A-SAA, Acrp-30 (adiponectina), AR (anfirregulina), Apo A-1, Apo B-100, péptido C, sCD14, sCD30 (TNFRSF8), CD40L, CRP (proteína C reactiva), ErbB2, FasL, fibrinógeno, fibronectina, IGFBP-1, IGFBP-3, leptina, LIF, MPO (mieloperoxidasa), NT-proBNP, OPG (osteoprotegrina), OPN (osteopontina), PAI-I activo, PAI-1 Total, PAPP-A, P1GF (factor de crecimiento placentario), prolactina, RANK, RANKL, resistina, factor tisular y TRAIL; 55 moléculas de adhesión celular tales como E-cadherina, E-selectina, ICAM-1, L-selectina, P-selectina y VCAM-1, quimiocinas tales como ENA-78, eotaxina, eotaxina-2, exodus-2, GRO α , GRO γ , HCC-4 (CCL-16), I-309, IP-10,

ITAC, linfotactina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, MIF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 δ , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4 (PARC), MPIF-1, NAP-2, RANTES, SDF-1 β y TARC; citocinas tales como GM-CSF, G-CSF, IFN α , IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 y TNF α ; receptores de citocinas, tales como IL-2R, IL-2R γ , IL-6R, TNF-RI y TNF-RII; factores de crecimiento tales como EGF, HGH, TGF α y TGF β ; inmunoglobulinas tales como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; metaloproteinasas de la matriz tales como MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10 y MMP-13; y factores neurotróficos tales como β -NGF, BDNF, CNTF y NT3, o cualquier combinación entre dos cualquiera o más de los mismos.

En otra realización, el analito diana es un antígeno procedente de una familia, género, especie, subtipo o un microorganismo individual. Los microorganismos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Mycobacterium, Brucella, Bacillus, Treponema, Clostridium, Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus, Haemolyticus, Pseudomonas, Campylobacter, Enterobacter, Neisseria, Proteus, Salmonella, Simonsiella, Riemerella, Escherichia, Neisseria, Meningococcus, Moraxella, Kingella, Chromobacterium y Branhamella, o procedente de un virus tal como adenovirus, virus de la gripe, citomegalovirus, virus de la hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la gripe aviar, virus respiratorio sincitial, virus de herpes simple, virus de la parainfluenza, virus de la peste, parvovirus porcino, virus de la seudorrabia, rotavirus, calcivirus, virus del moquillo canino, o procedente de otros microorganismos tales como Leptospira, Toxoplasma, Trypanosoma o Plasmodium, o cualquier combinación entre dos cualquiera o más de los mismos.

Otros análisis diana ejemplares incluyen, pero no se limitan a, gonadotropina coriónica humana, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de la tiroides, a-fetoproteína, lactógeno de la placenta humana, leptina, inhibina A, activina A, proteína plasmática A asociada al embarazo, factor de crecimiento placentario, glicoproteína beta-1 específica del embarazo; esteroides tales como testosterona, estríol, cortisol, progesterona, corticosterona, aldosterona; hormonas tiroideas tales como tiroxina, triyodotironina; globulina tiroidea ligada a tiroides (TBG); péptidos activos tales como bradiquinina, gastrina, angiotensina, hormona liberadora de la hormona tiroidea, hormona liberadora de la hormona luteinizante; aminas fisiológicamente activas tales como epinefrina, norepinefrina, histamina, serotonina; prostaglandinas, tales como PGF2a, PGE, tromboxanos y prostaciclina, o cualquier combinación entre dos cualquiera o más de los mismos.

En otra realización, el analito diana es un alérgeno. Alérgenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, alérgenos de interior tales como ácaros, Tyr. put, Lep. dest. o mayrei, Felis, Bos, Albúmina, Pen. cit, Pen. not., Asp. fumigatus, Alt. alt., Malassezia furfur, Látex, Plodia, Blatella; alérgenos de exterior tales como Betula, Juniperus, Phleum, Parietaria y judicea; alérgenos representativos de gatos, perros, ratón, rata, cerdo, oveja, pollo, conejo, hámster, caballo y paloma, alérgenos alimentarios tales como apio, zanahoria, cacahuete, manzana, gambas y pescado; alérgenos venenosos tales como de abeja o avispa, autoalérgenos tales como antígenos de la membrana del hígado, antígenos de ssADN y antígenos en o sobre células del músculo esquelético, y cualquier combinación entre dos cualesquiera o más de los mismos.

En otra realización, uno o varios agentes de captura están dispuestos para detectar uno o varios (es decir, un panel) análisis diana (es decir, biomarcadores) que serían indicativos de afecciones o enfermedades humanas particulares. Tales pruebas podrían consistir en cualquier combinación de los paneles que figuran en la Tabla 1, dependiendo de los requisitos locales.

Tabla 1: Paneles de afecciones/enfermedades humanas

Escrutinio de enfermedades infecciosas para estudios epidemiológicos en naciones en desarrollo	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1, VIH2, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes simple (VHS)-1, VHS-2, <i>Treponema pallidum</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Plasmodium</i> .
Infecciones víricas del tracto respiratorio superior	Adenovirus, Citomegalovirus (CMV), Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 2, Parainfluenza 3 y Virus Respiratorio Sincitial (VRS), Estreptococos del grupo A.
Infecciones agudas del tracto respiratorio inferior	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , proteína C-reactiva, procalcitonina.
Panel de patógenos gastrointestinales	Salmonella, Shigella, Campylobacter, Vibrio.
Panel para someter a ensayo enfermedades víricas hepáticas	Antígenos de la superficie y del núcleo del virus de la hepatitis A, B, C, D, E y G, anticuerpos séricos anti-hepatitis A, B, C, D, E y G.
Panel de enfermedades de transmisión sexual	Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1, VIH2, <i>Treponema pallidum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> .
Panel de enfermedades transmitidas por la sangre	<i>Plasmodium falciparum</i> (malaria), <i>Trypanosoma cruzi</i> (enfermedad de Chagas), <i>Brucella</i> spp (Brucelosis), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)-1, VIH2,

	virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B.
Panel ToRCH	<i>Toxoplasma gondii</i> , virus de la rubéola, citomegalovirus y virus del herpes simple 1 y VHS2.
Panel de bioseguridad	<i>Bacillus anthracis</i> (ántrax), <i>Clostridium botulinum</i> (botulismo), <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Yersinia pestis</i> (peste), <i>Coxiella burnetii</i> (fiebre Q), enterotoxina B de estafilococo, <i>Vibrio cholerae</i> (cólera).
Panel de fertilidad	Estradiol, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica humana, hormona luteinizante, progesterona, prolactina, testosterona, hormona paratiroidea.
Panel de drogas	Acetaminofén, anfetaminas, barbitúricos, cannabis, metabolitos de cocaína, metadona, opiáceos, salicilato y antidepresivos tricíclicos.
Panel para someter a ensayo la enfermedad cardiovascular	Péptido natriurético cerebral (BNP), proBNP N-terminal (Nt-proBNP), cinasa de creatina (CK)-MB, mioglobina, troponina cardíaca I, troponina cardíaca T, proteína C-reactiva de alta sensibilidad.
Panel para someter a ensayo enfermedades autoinmunes	Factor reumatoide, proteína C-reactiva, antígeno de leucocitos (HLA)-DR humano soluble, anticuerpos contra ADN de cadena doble, péptidos citrulinados, ribonucleoproteínas nucleares pequeñas, citoplasma neutrófilo (ANCA) y antígenos nucleares (ANA).
Panel para medir los niveles de hormonas	Insulina, leptina, tiroxina 3 y 4, hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona del crecimiento, testosterona, estrógeno, hormona luteinizante.
Panel para someter a ensayo el cáncer en general	Antígeno prostático específico total y libre (PSA), antígeno carcinoembrionario (CEA), CA125, CA15-3, CA19-9, CA24-2, CA72-4, alfa fetoproteína (AFP).
Marcadores de la inflamación	Interleucina (IL)-1 α y β , antagonista del receptor de IL1, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13, IFN γ , TNF α , MIP1 α y β , MCP1, RANTES, VCAM soluble, proteína C-reactiva, receptor de TNF α soluble I y II.
Panel de alérgenos para la detección de la unión de IgE sérica	Alérgenos obtenidos por métodos recombinantes o derivados de ácaros del polvo, polen de la hierba y los árboles, caspa animal, mohos, venenos de insectos y alimentos tales como proteína de soja, proteínas de la leche, proteínas derivadas de variedades de frutos secos, cereales y legumbres, proteínas de mariscos, como camarón, abulón y langosta.

En otra realización, uno o varios agentes de captura están dispuestos para detectar uno o varios (es decir, un panel) analitos diana (es decir, biomarcadores) que serían útiles para determinar la eficacia del tratamiento de las enfermedades indicadas. Tales pruebas podrían consistir en cualquier combinación de los paneles que figuran en la Tabla 2, dependiendo de los requisitos locales

5

Tabla 2: Paneles para determinar la eficacia de los tratamientos

Enfermedades autoinmunes	Citocinas y quimiocinas, que incluyen CTLA4, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), bLyS (BAFF), interferón gamma (IFN γ), eotaxina, CXCL10 o IP10, osteopontina, osteoprotegerina y RANKL.
	Otras biomoléculas tales como piridinolina, deoxipiridinolina, proteína de la matriz oligomérica del cartílago.
	Anticuerpos anti-ADN de doble cadena, pequeñas ribonucleoproteínas nucleares, proteínas nucleares tales como el antígeno del Síndrome de Sjogren (SS)-A y SS-B, el antígeno nuclear, el antígeno Sm, proteínas P ribosómicas, cardiolipina y topoisomerasa I.
	Anticuerpos contra proteínas terapéuticas, tales como abatacept (una inmunoglobulina fusionada con el ectodominio de CTLA4), rituximab (un anticuerpo quimérico anti-CD20), tocilizumab (un anticuerpo anti-receptor de IL6), etanercept (TNF α humano soluble recombinante, fusionado a IgG), infliximab (un anticuerpo anti-TNF α quimérico), adalimumab (un anti-cuerpo anti-TNF α humanizado), anakinra (una proteína humana antagonista del receptor de IL-6) y otros.
Cáncer	Gonadotropina coriónica humana, tirosinasa, HMGB1; S100-beta, actividad inhibidora de melanoma (MIA), HLA-DR soluble, metaloproteinasas matriciales (MMP) tales como MMP-1 y MMP-9, citocinas que incluyen interleucina (IL)-6, IL8 e IL10, antígeno asociado

	a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), haptoglobina, osteopontina, moiesina, transferrina, FK506, proteína precursora de la haptoglobina, receptor de progesterona, receptor de estrógeno, serina proteasa, activador del plasminógeno de tipo urocinasa, inhibidor del activador del plasminógeno de tipo I, virus del papiloma humano, virus de Epstein-Barr, PI S-transferasa de glutatión.
	Anticuerpos contra proteínas terapéuticas, tales como rituximab (un anticuerpo quimérico anti-CD20), cetuximab (un anticuerpo anti-EGF quimérico), trastuzumab (anticuerpo humanizado anti-Her2/neu), tositumomab (anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD20), gemtuzumab (anticuerpo humanizado anti-CD33), bevacimumab (un anticuerpo humanizado anti-VEGF), alemtuzumab (un anticuerpo humanizado anti-CD52) y ibritumomab tiuxetan (anticuerpo de ratón anti-CD20).
Enfermedades cardiovasculares y determinación del riesgo de ictus	Interleucina (IL)-1, IL-6, IL-10, albúmina modificada por isquemia, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, activador del plasminógeno-1, TNF α , factor de von Willebrand, ligando de CD40 soluble, mieloperoxidasa, factor de crecimiento placentario, fibrinógeno y proteína que se une a ácidos grasos de tipo cardiaco (H-FABP), metaloproteinasa matricial (MMP)-9, factor de crecimiento neurotrófico de tipo B (BNGF), amiloide A sérico, fibrinógeno, sICAM y S-100b.

En otra realización, uno o varios agentes de captura están dispuestos para detectar uno o más (es decir, un panel) analitos diana (es decir, biomarcadores) lo que podría ser útil en ensayos con animales. Tales pruebas podrían consistir en cualquier combinación de los paneles que figuran en la Tabla 3, dependiendo de los requisitos locales.

5

Tabla 3: Paneles de ensayos en animales

Aviar	Virus de la influenza aviar, neumovirus aviar, reovirus aviar, virus de la rinotraqueítis aviar, virus de la anemia del pollo.
Bovino	Adenovirus bovino, Coronavirus bovino, Leptospira spp, virus de la leucosis bovina, virus respiratorio sincitial bovino, encefalopatía espongiiforme bovina, virus de la diarrea vírica bovina, <i>Brucella abortus</i> , <i>Neospora caninum</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> , babesiosis bovina, Rotavirus, perineumonía contagiosa bovina, virus del herpes tipo I y II bovino, parainfluenza 3 bovina.
Canino	Virus del moquillo canino, coronavirus canino, virus del herpes canino, parvovirus canino, <i>Borrelia burgdorferii</i> , <i>Rickettsia rickettsii</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Rickettsia conorii</i> , factor reumatoide canino, antígeno de eritrocito del perro, virus de la hepatitis canina 1 y 2, parainfluenza 1 canina, <i>Borrelia afzelii</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Ehrlichia equi</i> , <i>Rickettsia conorii</i> .
Equino	Virus de la arteritis equina, virus de la anemia infecciosa equina, virus del herpes equino de tipo I, adenovirus equino, virus de la influenza equina, <i>Babesia equi</i> , <i>Babesia caballi</i> , <i>Borrelia burgdorferii</i> , <i>Borrelia afzelii</i> , <i>Ehrlichia equi</i> , <i>Leishmania donovani</i> .
Felino	Coronavirus felino, calicivirus felino, virus de la leucemia felina, virus del herpes felino, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la panleucopenia felina, virus de la rinotraqueítis vírica felina, coronavirus entérico felino.
Patógenos porcinos	Virus de la influenza A porcina, parvovirus porcino, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus de la seudorrabia, rotavirus porcino, <i>Brucella suis</i> porcina, virus de la gastroenteritis transmisible (TGE), virus de la peste porcina clásica, coronavirus respiratorio porcino.
Patógenos ovinos	Virus del herpes ovino, <i>Brucella ovis</i> , virus de la seudorrabia (de Aujeszky).
Panel endocrino y proteico para todas las especies	Sulfato de estrona, progesterona, hormona del crecimiento, cortisol sérico, testosterona, tiroxina (T)-3, T-4, albúmina sérica, globulina sérica, insulina, hormona paratiroidea, hormona estimulante de la tiroides, hormona luteinizante.
Panel de agentes patógenos para análisis de exportación	Virus de la diarrea vírica bovina, virus de la leucosis bovina enzoótica, herpes virus bovino de tipo I, virus de Maedi visna, <i>Brucella ovis</i> , <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> (enfermedad de Johne), <i>Campylobacter fetus</i> , <i>Trichomonas foetus</i> , Leptospira spp, <i>Streptococcus equi</i> , virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina.
Panel para analizar la mastitis en vacuno	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Mycoplasma spp, <i>Escherichia coli</i> , Klebsiella spp, Pseudomonas spp, Prototheca spp., haptoglobina, amiloide A sérico, inmunoglobulinas, lactoferrina, albúmina sérica.
Marcadores de la	Interleucina (IL)-1 α y β , antagonista del receptor de IL1, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL13,

inflamación	IFN γ , TNF α , MIP1 α y β , MCP1, RANTES, VCAM soluble, proteína C-reactiva, receptor de TNF α soluble I y II.
-------------	---

Después de la preparación de la matriz y antes de la adición de la muestra, todos los sitios de unión a proteínas disponibles en la superficie de la membrana se bloquean mediante la adición y la incubación con un reactivo o una combinación de reactivos. Estos reactivos se denominan "bloqueadores" y sirven para disminuir o mejor eliminar la unión no específica a proteínas de la muestra sobre la superficie de la membrana, disminuyendo de ese modo la señal de ruido de fondo total. Esto aumenta la proporción de señal a ruido, aumentando de este modo la sensibilidad global del ensayo. Los bloqueadores no tienen ningún papel activo en las reacciones posteriores entre la muestra y otros reactivos del ensayo, y las proteínas inmovilizadas sobre la membrana. Bloqueadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino, caseína, leche en polvo descremada, gelatina obtenida a partir de peces, cerdos y otras fuentes, dextrano, suero obtenido a partir de fuentes distintas de la muestra que se va a analizar tal como de trucha arcoiris, cobayas, hámsteres, conejos y otras fuentes, polietilenglicol, polivinil pirrolidona y preparaciones comerciales que incluyen HeteroBlock (Omega Biologicals, Bozeman, MT), SuperBlock, StartingBlock, SEA BLOCK (Pierce, Rockford, IL). Típicamente, los bloqueadores se preparan en soluciones tampón tales como, por ejemplo, tampón fosfato, solución salina tamponada con fosfato, tampón Tris, tampón de acetato y otros. Los bloqueadores también pueden complementarse con detergentes tales como, por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Nonidet P40, dodecil sulfato sódico y otros.

La membrana de la invención comprende al menos un marcador de confianza que siempre va a ser detectable sobre la membrana, preferiblemente con independencia de la realización del ensayo o del procesamiento de la membrana.

En realizaciones preferidas, el marcador de confianza es un colorante, una proteína conjugada con colorante o una proteína cromogénica, tal como la hemoglobina.

El uso de al menos un marcador de confianza obviará la necesidad de detectar este elemento basándose en un procesado con éxito de las matrices, en comparación con los testigos colorimétricos positivos. Por consiguiente, el marcador de confianza es un testigo positivo "verdadero" que siempre será detectable, independientemente del procesamiento de la matriz, y se puede utilizar para orientar y ayudar a cuadrar la matriz.

La membrana de la invención también comprende al menos un testigo para supervisar la especificidad del ensayo. El testigo está destinado a proporcionar información sobre la especificidad de la unión entre el elemento de captura y el analito diana, o entre las parejas de unión de las etapas de detección del ensayo.

En una realización, el testigo de la especificidad del ensayo comprende uno o varios isotipos de anticuerpos, un anticuerpo correspondiente o un isotipo de anticuerpo procedente de una especie animal diferente o un ligando estrechamente relacionado. Por ejemplo, en las matrices de anticuerpos humanos, IgM humana e IgM anti-humana se pueden utilizar como testigos para supervisar la especificidad del ensayo.

La membrana de la invención también comprende al menos un testigo para supervisar la eficiencia del ensayo. El testigo está destinado a proporcionar información sobre la eficacia de las interacciones de la unión complementaria o la calidad o la eficiencia de los reactivos utilizados.

En una realización, el testigo de la eficiencia del ensayo comprende un ligando de una pareja de unión complementaria, en donde el otro ligando es un reactivo del ensayo. El testigo de la eficiencia del ensayo se selecciona preferiblemente a partir de la lista que comprende el analito diana, un ligando no específico o un marcador enzimático colorimétrico.

En una realización, el testigo colorimétrico positivo es un conjugado de marcador enzimático capaz de reaccionar con un sustrato colorimétrico, que comprende una enzima seleccionada entre la lista que comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalinas, β -D-galactosidasa o glucosa oxidasa.

La identidad de los testigos del ensayo dependerá del tipo de matriz, de la identidad del analito diana y del tipo de muestra que se va a analizar.

Por ejemplo, se puede utilizar IgG anti-humana-HRP o IgG anti-ratón-HRP en matrices impresas con antígenos y anticuerpos, respectivamente. El anticuerpo de detección final en matrices de antígenos será frecuentemente IgG anti-humana-HRP, mientras que para las matrices de anticuerpos, frecuentemente será una IgG de ratón biotinilada. Estos testigos pueden proporcionar un testigo positivo, además de proporcionar información sobre la eficiencia o la calidad del sustrato de HRP.

IgG de ratón, IgG humana e IgG anti-humana presentes sobre matrices de antígenos o anticuerpos, pueden actuar ya sea como testigos positivos o negativos dependiendo del formato de la matriz, además de proporcionar información sobre la especificidad del ensayo. Por ejemplo, una IgG de ratón debe proporcionar la señal positiva en matrices de anticuerpos, mientras que las dos últimas deben proporcionar una señal positiva en matrices de antígenos. En las matrices de alérgenos, IgM humana e IgM anti-humana se pueden reemplazar como testigos por

IgE humana e IgE anti-humana. Estos testigos también pueden servir como testigos de la eficiencia general del ensayo.

En realizaciones preferidas, los elementos de la matriz se imprimen en zonas discretas de entre 100 μm a 500 μm de diámetro. Más preferiblemente, las zonas discretas tienen entre 350 μm a 400 μm de diámetro.

- 5 En realizaciones preferidas, las zonas discretas de la matriz se imprimen en una cuadrícula de 5 x 5. Preferiblemente, la matriz comprende hasta nueve elementos de control y dos réplicas de cada uno de los ocho elementos de captura diferentes.

En realizaciones preferidas, los elementos de captura se imprimen en dos o más réplicas de los cuatro elementos de captura diferentes y múltiplos de los mismos.

10 Detección de analitos diana

Las técnicas de ensayo utilizadas junto con las membranas de la presente invención, incluyen cualquiera entre una variedad de ensayos colorimétricos ligados a enzimas bien conocidos. Ejemplos de tales sistemas son bien conocidos en la técnica. Las técnicas de los ensayos se basan en la formación de un complejo entre una pareja de unión complementaria, seguido de detección con un sistema de detección colorimétrico que comprende un marcador conjugado con enzima y un sustrato colorimétrico. En la presente invención, el soporte en fase sólida o el sustrato es una membrana microporosa. El sistema de detección se describirá haciendo referencia a ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), aunque un experto en la técnica apreciará que tales técnicas no se limitan al uso de anticuerpos, sino que son igualmente aplicables a cualquier ensayo colorimétrico.

- 15 La figura 1 muestra una representación esquemática de formatos de ensayo y el flujo del procesamiento de muestras. El panel (A) muestra las etapas del procesamiento de una matriz de anticuerpos para la detección de antígenos o ligandos a partir de muestras biológicas para la prueba. El panel (B) muestra el procesamiento de una matriz de antígenos o ligandos para la detección de anticuerpos en muestras biológicas para la prueba. El panel (C) muestra el flujo del procesamiento general de la muestra en donde cada uno de los reactivos que se describen a continuación y en los Ejemplos, se añaden a la matriz impresa de acuerdo con el Ejemplo 1.

- 20 La figura 2 muestra una representación esquemática de la función de los elementos de control y su unión a diversos reactivos añadidos durante el procesamiento de un ensayo con anticuerpos para la detección de antígenos. La adición de diversos reactivos se muestra en el lado izquierdo de la figura en donde se realizan adiciones secuenciales desde la parte inferior a la parte superior. El color se manifiesta solo si el reactivo funcional apropiado se une al elemento de control.

- 25 En una realización, el ELISA está en el formato de ensayo "sándwich". En este formato, el analito diana que se va a medir se une entre dos anticuerpos - el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección. En otra realización, el ELISA es un ensayo no competitivo, en el que un anticuerpo se une al antígeno de captura y la cantidad de anticuerpo unido se determina mediante un anticuerpo de detección secundario.

- 30 En otra realización, el ELISA es un ensayo competitivo, en donde un antígeno marcado se utiliza en lugar de un anticuerpo marcado. El antígeno sin marcar y el antígeno marcado compiten por la unión al anticuerpo de captura y la cantidad de analito diana unido se puede determinar por la proporción de antígeno marcado detectado.

- 35 Los anticuerpos monoclonales o policlonales se pueden usar como anticuerpos de captura y detección en sistemas de ELISA de tipo sándwich. Los anticuerpos monoclonales tienen una monoespecificidad inherente hacia un único epítipo, lo que permite una detección y cuantificación precisas de pequeñas diferencias en el antígeno. Un anticuerpo policlonal también se puede utilizar como el anticuerpo de captura para unirse a tantos antígenos como sea posible, seguido por el uso de un anticuerpo monoclonal como anticuerpo de detección en el ensayo de tipo sándwich, para proporcionar una especificidad mejorada. Un anticuerpo monoclonal también se puede utilizar como el anticuerpo de captura para proporcionar una captura específica del analito, seguida por el uso de un anticuerpo policlonal como anticuerpo de detección en el ensayo de tipo sándwich.

- 40 Una consideración importante en el diseño de una matriz es que los anticuerpos de captura y detección de cada pareja de unión deben reconocer dos epítopos que no se solapen, de manera que cuando el antígeno se une al anticuerpo de captura, el epítipo reconocido por el anticuerpo de detección no debe estar oculto o alterado. Ya se ha desarrollado un gran número de parejas de unión complementarias para ELISA y se pueden utilizar en la presente invención.

- 45 Para los ensayos multiplexados también es importante que no haya solapamiento entre cada una de las parejas de unión para eliminar la reactividad cruzada. Se ha desarrollado una variedad de pruebas de ELISA multiplexada y se prevé que se podrán configurar otras combinaciones de parejas de unión a través de las pruebas.

En una realización, el marcador conjugado con la enzima comprende una enzima seleccionada entre la lista que comprende peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa o glucosa oxidasa.

En una realización, el marcador enzimático puede conjugarse directamente con un anticuerpo primario o introducirse a través de un anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario. También puede estar conjugado con una proteína tal como estreptavidina, si el anticuerpo primario está marcado con biotina.

5 En una realización, el sistema de detección del ensayo comprende un sustrato colorimétrico de detección seleccionado entre la lista que comprende 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, diaminobencidina, diaminobencidina potenciada con metal, 4-cloro-1-naftol, oro coloidal, cloruro de tetrazolio nitro-azul, sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato y naftol AS-MX fosfato + sal Fast Red TR.

10 En realizaciones preferidas, la reacción colorimétrica se puede detectar y opcionalmente cuantificar y analizar utilizando un dispositivo de captura de imagen, tal como una cámara digital o un escáner de mesa conectado a un ordenador. Se pueden usar métodos conocidos para el análisis de imágenes. Por ejemplo, los valores de la densidad de elementos estándar conocidos, se pueden utilizar para generar curvas estándar. Los valores de la densidad para analitos desconocidos se pueden analizar usando la curva estándar para cada analito, para calcular las concentraciones reales. Los valores para cada analito se pueden identificar basándose en la posición del punto de cada elemento de captura dentro de la matriz.

15 Las membranas de la presente invención son particularmente susceptibles para utilizar en kits para la detección de analitos diana. Tales kits pueden comprender las membranas junto con instrucciones y cualquier consumible del ensayo requerido. Se prevén distintos kits para diferentes analitos diana y tipos de matriz. En consecuencia, en un aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una membrana de la invención y, opcionalmente, uno o varios reactivos de procesamiento. Por ejemplo, un kit de la invención incluye opcionalmente uno o varios, o
20 cualquier combinación, entre dos cualquiera o más de los siguientes elementos

(a) un reactivo reductor del ruido de fondo (conocido de otra manera como solución de bloqueo),

(b) una solución de lavado,

25 (c) uno o varios anticuerpos (que incluyen conjugados de anticuerpo-proteína de unión o conjugados de anticuerpo-marcador enzimático o ambos) para la detección de antígenos, ligandos o anticuerpos unidos a los elementos de captura o para la detección de los testigos positivos,

(d) un sistema de detección colorimétrico,

(e) un programa informático para determinar la intensidad de la señal en cada punto y el análisis de los resultados, y

(f) un protocolo para medir la presencia de analitos en muestras.

30 En otro aspecto, la invención se refiere también a un método para procesar una membrana de la invención. Tal método comprende

(a) proporcionar una membrana de la invención tal y como se ha descrito anteriormente,

(b) añadir al menos una muestra a la membrana, y

35 (c) procesar la membrana de tal manera que se proporcione un resultado detectable mediante dos o más de los siguientes elementos

i) al menos un marcador de confianza,

ii) al menos un testigo colorimétrico positivo, y

iii) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.

40 En una realización, la etapa de procesamiento de la membrana comprende una etapa de bloqueo durante la cual se bloquean sitios de unión a proteínas disponibles en la membrana con un bloqueador, una etapa de lavado opcional, poner en contacto la membrana con la muestra que contiene uno o varios analitos que se van a medir, una etapa de lavado para eliminar el material no unido desde la membrana, poner en contacto la membrana con uno o varios anticuerpos secundarios que se corresponden con y se unirán a uno o varios analitos diana y un analito no diana que está unido a un testigo de la eficiencia del ensayo, una etapa de lavado, y poner en contacto la membrana con
45 uno o ambos de un conjugado enzimático o un sustrato enzimático, para generar un resultado detectable. A continuación se describen Ejemplos de procesamiento de una membrana de la invención.

En otra realización, las membranas microporosas de la invención se pueden utilizar para la detección simultánea de al menos un analito diana en una muestra, y preferiblemente una pluralidad de diferentes analitos diana en una muestra, y tienen utilidad en ensayos de diagnóstico y escrutinio.

50 Por lo tanto, las membranas microporosas de la invención proporcionan la ventaja de que se pueden adaptar a un

análisis de alto rendimiento (o de rendimiento ultra elevado) y, por lo tanto, cualquier número de muestras (por ejemplo, 96, 1024, 10000, 100000 o más) se puede examinar en paralelo, dependiendo del soporte concreto que se utilice. Una ventaja particular de la adaptación de las membranas microporosas a análisis de alto rendimiento, es que se puede utilizar un sistema automatizado para añadir o eliminar reactivos de una o varias de las muestras en distintos momentos, para añadir diferentes reactivos a muestras particulares, o para someter las muestras a varios ciclos de calentamiento.

Por ejemplo, el sistema automatizado puede consistir en una o varias cámaras con temperatura controlada y uno o varios brazos robotizados montados sobre una cubierta que tiene plataformas configuradas para sujetar placas de 96 pocillos. El movimiento de los brazos robotizados y la temperatura en las cámaras son controlados por una unidad de ordenador central. Las placas con la matriz se apilan sobre la cubierta del instrumento. En una realización, las placas que contienen las muestras que se van a analizar se apilan en una cámara con temperatura de 4°C. A continuación, un brazo robótico transfiere secuencialmente cada placa con matrices individuales sobre una sola plataforma, mientras que el otro brazo transfiere secuencialmente cada placa de muestras individuales sobre la segunda plataforma. Una boquilla que contiene 96 puntas desechables aspira a continuación un volumen predeterminado de muestra de cada pocillo de la placa de las muestras y transfiere la muestra a los pocillos correspondientes de la placa con matrices. La placa con la matriz que contiene la muestra se transfiere a continuación a una cámara con una temperatura de 37°C. Este proceso se repite hasta que la muestra ha sido añadida a todas las placas con matrices apiladas en la cubierta. Las placas con matriz se incuban durante un tiempo predeterminado seguido de la transferencia de cada placa a la plataforma para añadir el tampón de lavado con la boquilla que contiene 96 puntas desechables. El tampón de lavado se aspira después de un tiempo predeterminado y este proceso de lavado se repite varias veces (es decir, dos o más). Cada placa con matriz recibe a continuación, el anticuerpo secundario seguido de transferencia a una cámara con una temperatura de 37°C. Las placas con matriz se incuban durante un tiempo predeterminado seguido de transferencia de cada placa a la plataforma para la adición del tampón de lavado con la boquilla que contiene 96 puntas desechables. El tampón de lavado se aspira después de un tiempo predeterminado y este proceso de lavado se repite varias veces (es decir, dos o más). A continuación, cada placa con matriz recibe el reactivo de detección seguido de incubación durante un tiempo predeterminado, seguido de la transferencia de cada placa a la plataforma para la adición del tampón de lavado, con la boquilla que contiene 96 puntas desechables. El tampón de lavado se aspira después de un tiempo predeterminado, y la placa transferido a la cámara a 37°C para el secado. Las placas se transfieren de nuevo a la cubierta después de un período predeterminado y se procesan manualmente para el análisis de datos.

Además de la conveniencia de examinar múltiples agentes y/o muestras de la prueba al mismo tiempo, tales ensayos de alto rendimiento proporcionan un medio para examinar partes alícuotas por duplicado, triplicado o más, de una sola muestra, aumentando así la validez de los resultados obtenidos, y para examinar muestras de testigo en las mismas condiciones que las muestras de la prueba, proporcionando de este modo un patrón interno para comparar los resultados procedentes de diferentes ensayos.

Varios aspectos de la invención se ilustrarán ahora en formas no limitativas haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Procedimientos generales para la preparación de matrices

Las membranas o películas fijadas a una placa de poliestireno de 96 pocillos sin fondo (tal como nailon, Nalge Nunc International, EE.UU.) se utilizaron para la impresión de micromatrices. Se pueden utilizar varios métodos para fijar las membranas a las placas de 96 pocillos sin fondo. En este ejemplo, se utilizó una lámina de caucho con unas dimensiones de 128 mm de largo y 86 mm de ancho y 1 mm de espesor. Se estamparon 96 agujeros redondos sobre la lámina con un diámetro de 6,35 mm y una distancia de centro a centro de 9 mm. A continuación, la lámina se recubrió con adhesivo en ambos lados y se pegó por un lado de la placa de 96 pocillos sin fondo, de tal manera que la segunda capa de adhesivo aún estaba disponible para unirse a una membrana. Una membrana de nailon se cortó a continuación con las dimensiones de 128 mm de largo y 86 mm de ancho, y se fijó al otro lado de la lámina de caucho para crear una junta que crea pocillos a prueba de fugas.

Otro método para fijar las membranas a las placas de 96 pocillos sin fondo implica el uso de un adhesivo que se aplica a un lado de la placa. Después, una membrana de nailon cortada con las dimensiones de 128 mm largo y 86 mm de ancho se fija empleando presión de tal manera que no haya fugas entre los pocillos.

Las micromatrices se imprimieron mezclando proteínas en una solución de tampón de impresión que contenía solución salina tamponada con fosfato, glicerol y Tween 20, para proporcionar una concentración final de 10% de glicerol y 0,005% de Tween 20.

Las matrices se imprimieron empleando un robot que genera micromatrices de contacto de mesa (LabNext Inc, EE.UU.), empleando agujas de impacto diseñadas para proporcionar puntos uniformes con un diámetro promedio de

350 µm (ChipMaker II, Telechem International Inc, EE.UU.). Las matrices se imprimieron a temperatura ambiental y una humedad del 60% (±10%).

5 Se imprimieron hasta noventa y seis matrices copiadas sobre la membrana. Cada matriz tenía hasta 25 puntos impresos en cuadrículas de 5X5 (número de columnas x número de filas). Las matrices con menos de 25 puntos se imprimieron de tal manera que contenían 5, 10, 15 o 20 puntos en plantillas de 5X1, 5X2, 5X3 y 5X4 puntos.

10 Cada matriz tiene una serie de puntos de testigos que se imprimieron en la columna I y fila 5. Estos puntos de testigos incluían un marcador de confianza (una proteína conjugada con colorante, tal como el marcador de peso molecular teñido previamente con BlueRanger, Prestained Protein Molecular Weight Marker, Pierce Biotechnology Inc, EE.UU., número de catálogo 26681), un testigo negativo (solución salina tamponada con fosfato que contenía 20% de glicerol y 0,005% de Tween 20 y un anticuerpo no específico), testigos positivos (proteína conjugada con enzima, tal como estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante, Pierce, número de catálogo 21126) y testigos específicos de la muestra para supervisar la eficiencia global del ensayo.

15 Las proteínas de la prueba se imprimieron en concentraciones que iban desde 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml, por lo general 0,5 mg/ml, determinadas por la afinidad de la unión de la proteína específica al analito que se estaba midiendo.

Después de imprimir las matrices, se mantuvieron a 4°C durante al menos 8 horas antes de su uso.

Ejemplo 2

Procedimiento general para el procesamiento y el análisis de matrices

20 Las matrices fueron incubadas a 37°C durante 60 min después de la adición de 100 µl de Bloqueador [1% de caseína (Vector Labs, EE.UU.) en solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1% de Tween 20 (PBS-T)] a cada pocillo. A continuación, el Bloqueador se aspiró.

Las muestras que contenían analitos se añadieron mediante dilución en el Bloqueador con un volumen de 50 µl en cada pocillo y la membrana se incubó a 37°C durante 60 min. La membrana se lavó 3x con PBS-T para eliminar el exceso de analitos no unidos.

25 Para las matrices de anticuerpos (para la detección de antígenos), se añadieron anticuerpos de detección conjugados con adaptador, a los pocillos a las concentraciones recomendadas, ya sea por el fabricante o determinadas empíricamente mediante experimentación. Ejemplos de anticuerpos conjugados con adaptador incluyen anticuerpos conjugados con hapteno, tales como anticuerpos conjugados con biotina. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min y se lavó 3x con PBS-T. A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo anti-adaptador (tal como un anticuerpo anti-biotina) conjugado con una enzima o una enzima conjugada con un adaptador (tal como una enzima conjugada con estreptavidina) a 37°C durante 60 min. Un ejemplo de una enzima es peroxidasa de rábano picante. La membrana se lavó 3x con PBS-T.

30 Alternativamente, para las matrices de antígenos (para la detección de anticuerpos), después de lavar el exceso de analitos, la membrana se incubó con anticuerpos anti-inmunoglobulina conjugados con una enzima tal como peroxidasa de rábano picante. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min. La membrana se lavó 3x con PBS-T.

35 En cualquiera de los casos, se detectó la enzima unida y se midió usando un sustrato enzimático que da como resultado un precipitado de color depositado sobre el punto de la proteína. Un ejemplo de un sustrato utilizado es diaminobencidina potenciada con metal (Pierce, EE.UU.) que proporciona un precipitado de color marrón con peroxidasa de rábano picante. Alternativamente, los anticuerpos anti-analito unidos se pueden detectar usando un segundo anticuerpo o adaptador tal como estreptavidina conjugada con oro coloidal.

40 La membrana se secó durante 60 min a temperatura ambiente y se escaneó con una resolución de 600 dpi o se fotografió con una cámara digital con una resolución de al menos 4 megapixels y la imagen se guardó en formato TIFF.

45 La intensidad del color en cada punto se determinó utilizando el programa informático de reticulación que coloca cuadrículas sobre todas las matrices, utilizando el marcador de confianza para alinear la cuadrícula en la posición apropiada. Los valores de la intensidad se obtuvieron en un archivo de hoja de cálculo de Microsoft Excel™, que luego se puede utilizar para el análisis de los resultados.

Ejemplo 3

Matrices de anticuerpos

50 Las matrices para la detección de antígenos tales como marcadores proteicos de enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y agentes infecciosos, o ligandos tales como factores de crecimiento, hormonas, citocinas y quimiocinas se crean mediante la impresión de paneles de anticuerpos como elementos de captura para la captura específica del antígeno. También se imprime una serie de anticuerpos de control y proteínas

de control. Estos testigos sirven para una variedad de funciones, que incluyen testigos para supervisar la eficiencia del análisis incluyendo la eficiencia de reactivos individuales, testigos para supervisar la especificidad de los anticuerpos de captura y marcadores de confianza para reticular las matrices después del procesamiento de la muestra, para la determinación de la intensidad de la señal en cada punto en la matriz. La Tabla 4 resume los reactivos que pueden utilizarse para imprimir y procesar matrices de anticuerpos. La numeración del testigo de la eficiencia del ensayo se refiere a la numeración en la Figura 2.

Tabla 4: Reactivos de la matriz de anticuerpos

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
Proteína o anticuerpo con un colorante cromogénico	Marcador de confianza para permitir que el programa informático de reticulación localice y coloque cuadrículas sobre cada punto de la matriz	Marcador proteico conjugado con colorante BlueRanger	El marcador de confianza siempre será detectable.
Tampón de impresión	Testigo negativo para determinar la señal de fondo en la matriz		
Anticuerpo conjugado con un hapteno (p. ej., biotina)	Testigo para supervisor la función de la estreptavidina conjugada con enzima o cualquier otra proteína unida a biotina (BP) (ensayo de la eficiencia (3))	IgG anti-ratón conjugada con biotina	
Conjugado de proteína que se une a hapteno-enzima	Testigo colorimétrico positivo para supervisar la eficiencia del sustrato enzimático	Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	
Anticuerpo anti-IgG	Testigo para demostrar la adición de la muestra (ensayo de la eficiencia (1))		La adición de suero dará como resultado la unión de IgG sérica a este punto; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a analizar.
IgG para la captura de anticuerpos de detección conjugados con hapteno	Testigo para demostrar la adición de la mezcla de anticuerpo de detección secundario (ensayo de la eficiencia (2))	IgG anti-ratón	Los anticuerpos monoclonales secundarios biotinilados se unirán a la IgG anti-ratón.
Anticuerpo no específico	Testigo negativo para determinar la especificidad de la captura del antígeno (ensayo de la especificidad)	IgG de hámster	IgG de una especie no representada en el panel de la matriz y reactivos de detección.
Panel de anticuerpos del ensayo para la captura de antígenos o ligandos	Pruebas de diagnóstico para marcadores de enfermedad o salud (elementos de captura)	Anticuerpo anti-citocina	Cada uno de los anticuerpos de la prueba se puede imprimir por duplicado o como un punto aislado (para un panel de 16 pruebas).

10 Las matrices se imprimen en cuadrículas de 5X5 tal como se muestra en la Tabla 5 a continuación. Los anticuerpos de la prueba y de control se imprimen en concentraciones que van desde 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, dependiendo de la afinidad del anticuerpo hacia su antígeno y de la señal obtenida a partir de los anticuerpos de control.

Tabla 5: Diseño de la matriz de anticuerpos para la detección de antígenos

Marcador de confianza	Anticuerpo de la prueba 1	Anticuerpo de la prueba 1	Anticuerpo de la prueba 2	Anticuerpo de la prueba 2
-----------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Tampón de impresión (testigo negativo)	Anticuerpo de la prueba 3	Anticuerpo de la prueba 3	Anticuerpo de la prueba 4	Anticuerpo de la prueba 4
Anticuerpo conjugado con hapteno (eficiencia del ensayo (3))	Anticuerpo de la prueba 5	Anticuerpo de la prueba 5	Anticuerpo de la prueba 6	Anticuerpo de la prueba 6
Tampón de impresión (testigo negativo)	Anticuerpo de la prueba 7	Anticuerpo de la prueba 7	Anticuerpo de la prueba 8	Anticuerpo de la prueba 8
Conjugado de HRP-hapteno BP (testigo colorimétrico)	Anticuerpo anti-IgG (eficiencia del ensayo (1))	Anticuerpo anti-ratón (eficiencia del ensayo (2))	Anticuerpo no específico (especificidad del ensayo)	Marcador de confianza

Las matrices impresas se utilizan para medir la presencia de proteínas marcadoras incubando inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min.

5 A su propio pocillo se añaden hasta noventa y seis muestras diferentes que se van a analizar, tales como suero, plasma o cualquier otro material biológico. Las muestras se pueden añadir sin dilución o se pueden diluir en Bloqueador antes de la adición al pocillo de la prueba. La membrana se incuba a 37°C durante 60 min, y el material no unido se elimina lavando con PBS-T.

10 Los antígenos o ligandos unidos a anticuerpos en la matriz se detectan mediante incubaciones secuenciales con anticuerpos secundarios biotinilados y una proteína que se une a biotina conjugada con una enzima. La cantidad de enzima en cada punto se mide entonces mediante el uso de un sustrato que da como resultado un precipitado de color depositado en el punto.

15 En este ejemplo, los testigos positivos se procesan y se detectan del modo siguiente. El testigo colorimétrico se procesa para generar un resultado de color mediante la adición del sustrato enzimático. Los testigos de la eficiencia del ensayo se procesan de la siguiente manera. El testigo de la eficiencia del ensayo (1), un anticuerpo anti-IgG, se unirá a IgG (un analito no diana) presente en la muestra de suero. La unión de IgG se detectará usando un anticuerpo secundario, o bien un conjugado de anticuerpo-adaptador (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo anti-IgG-biotina) o un conjugado de anticuerpo-enzima (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo-HRP). El testigo de la eficiencia del ensayo (2), un anticuerpo anti-ratón, se unirá al anticuerpo secundario biotinilado. Esta interacción se detectará a continuación mediante la adición del conjugado de proteína que se une a biotina-sustrato y el sustrato enzimático o una molécula que se une a biotina conjugada con un resto de color tal como oro coloidal. El testigo de la eficiencia del ensayo (3), un conjugado de anticuerpo-biotina, se unirá al conjugado de proteína que se une a biotina-enzima y esta interacción se detectará mediante la adición del sustrato enzimático.

Ejemplo 4

Matrices de antígenos para la detección de anticuerpos

25 Las matrices para la detección de anticuerpos para antígenos de interés, tales como marcadores proteicos de enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, cáncer y agentes infecciosos, o ligandos tales como factores de crecimiento, hormonas, citocinas y quimiocinas, se crean mediante la impresión de paneles de antígenos o ligandos como elementos de captura para la captura específica de anticuerpos. También se imprime una serie de anticuerpos de control y proteínas de control. Estos testigos sirven para una variedad de funciones, incluyendo testigos para supervisar la eficiencia del ensayo, incluyendo la eficiencia de reactivos individuales, testigos para supervisar la especificidad del ensayo y marcadores de confianza para reticular las matrices después del procesamiento de la muestra, para determinar la intensidad de la señal en cada punto en la matriz. La Tabla 6 resume los reactivos que pueden utilizarse para imprimir y procesar matrices de antígenos.

Tabla 6: Reactivos de la matriz de antígenos

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
Proteína o anticuerpo con un colorante cromogénico	Marcador de confianza para permitir que el programa informático de reticulación localice y coloque cuadrículas sobre cada punto de la matriz	Marcador proteico conjugado con colorante BlueRanger	
Tampón de impresión	Testigo negativo para determinar la señal de fondo en la matriz		

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
Anticuerpo anti-IgM	Testigo para demostrar la adición de la muestra (ensayo de la eficiencia (1))	IgM anti-humana	La adición de suero dará como resultado la unión de IgM sérica a este punto; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a analizar.
Conjugado de proteína que se une a hapteno-enzima	Testigo colorimétrico positivo para supervisar la eficiencia del sustrato enzimático	Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	
Anticuerpo anti-IgG	Testigo para demostrar la adición de la muestra (ensayo de la eficiencia (1))		La adición de suero dará como resultado la unión de IgG sérica a este punto; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a analizar.
IgG	Testigo para demostrar la adición del anticuerpo de detección secundario (eficiencia del ensayo (2))	IgG humana	El anticuerpo secundario se unirá a la IgG; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a analizar.
Anticuerpo no específico	Testigo negativo para determinar la especificidad de la captura del antígeno (ensayo de la especificidad)	IgG de hámster	IgG de una especie no representada en el panel de la matriz y reactivos de detección.
Panel de antígenos o ligandos de la prueba para la captura de anticuerpos	Pruebas de diagnóstico para marcadores de enfermedad o salud (elementos de captura)	Antígeno de la influenza A	Cada uno de los antígenos del ensayo se puede imprimir por duplicado o como un punto aislado (para un panel de 16 pruebas).

5 Las matrices se imprimen en cuadrículas de 5X5 tal y como se muestra en la Tabla 7 a continuación. Los anticuerpos de control se imprimen en concentraciones que van desde 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, dependiendo de la señal obtenida a partir de los anticuerpos de control. Los antígenos o ligandos de la prueba se imprimen en concentraciones que van desde 0,05 mg/ml a 1 mg/ml, en función de la afinidad del antígeno hacia los anticuerpos de la prueba, procedentes de muestras biológicas de testigo positivo

Tabla 7: Diseño de la matriz de antígenos para la detección de anticuerpos

Marcador de confianza	Antígeno de la prueba 1	Antígeno de la prueba 1	Antígeno de la prueba 2	Antígeno de la prueba 2
Tampón de impresión (testigo negativo)	Antígeno de la prueba 3	Antígeno de la prueba 3	Antígeno de la prueba 4	Antígeno de la prueba 4
Anticuerpo anti-IgM (eficiencia del ensayo (1))	Antígeno de la prueba 5	Antígeno de la prueba 5	Antígeno de la prueba 6	Antígeno de la prueba 6
Tampón de impresión (testigo negativo)	Antígeno de la prueba 7	Antígeno de la prueba 7	Antígeno de la prueba 8	Antígeno de la prueba 8
Proteína conjugada con HRP (testigo colorimétrico)	Anticuerpo anti-IgG (eficiencia del ensayo (1))	IgG (eficiencia del ensayo (2))	Anticuerpo de una especie sin reactividad cruzada (especificidad del ensayo)	Marcador de confianza

10 Las matrices impresas se utilizan para medir la presencia de anticuerpos incubando inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min.

A su propio pocillo se añaden hasta noventa y seis muestras diferentes que se van a ensayar tales como suero,

plasma o cualquier otro material biológico. Las muestras se pueden añadir sin dilución o se pueden diluir en Bloqueador antes de la adición al pocillo del ensayo. La membrana se incubaba a 37°C durante 60 min, y el material no unido se elimina lavando con PBS-T

5 Los anticuerpos unidos a antígenos en la matriz se detectan mediante incubaciones con anticuerpos secundarios conjugados con enzimas o anticuerpos secundarios conjugados con una molécula de color, tal como oro coloidal. La cantidad de enzima en cada punto se mide entonces mediante el uso de un sustrato que da como resultado un precipitado de color depositado en el punto.

10 Los testigos positivos se detectan del modo siguiente. El testigo colorimétrico se detectó mediante la adición de sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (1) se unirá a IgG en la muestra de suero y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo secundario-enzima y el sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (2) se unirá al conjugado anticuerpo secundario-enzima y se detecta por la adición del sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (1) se unirá a IgM en la muestra de suero y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo secundario-enzima y el sustrato enzimático.

Ejemplo 5

15 Matrices de anticuerpos para la detección de citocinas séricas

Los reactivos enumerados en la Tabla 8 se utilizaron para la preparación y el procesamiento de matrices de citocinas.

Tabla 8: Reactivos de la matriz de citocinas

Reactivo	Proveedor	Nº de Catálogo	Función
Anticuerpo anti-IFN γ humano de ratón	BioLegend	507501	Elementos de captura
Anticuerpo anti-TUFA humano de ratón	BioLegend	502801	
Anticuerpo anti-IL4 humana de ratón	BioLegend	500701	
Anticuerpo anti-IgG humana de cabra	Pierce	31119	Detecta la adición de la muestra. (Eficiencia del ensayo (1))
Anticuerpo anti-IgM humana de ratón	BioLegend	314501	
Anticuerpo anti-IFN γ humano con biotina	BioLegend	502503	Anticuerpos secundarios
Anticuerpo anti-TNF α humano con biotina	BioLegend	502903	
Anticuerpo anti-IL4 humana con biotina	BioLegend	500803	
Anticuerpo anti-IgG humana con biotina	Pierce	31774	Detecta la unión de IgG e IgM al testigo de la eficiencia del ensayo (1)
Anticuerpo anti-IgM humana con biotina	BioLegend	314503	
Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	Pierce	21126	Reacción de color
Peroxidasa IgG anti-humana de cabra	Pierce	31412	Marcador de confianza y reacción de color
IgG humana	Pierce	31154	Especificidad del ensayo
IgM humana	Pierce	31146	

20 Las matrices se imprimieron en cuadrículas de 5X5 tal como se muestra en la Tabla 6 a continuación. Los anticuerpos anti-citocinas se imprimieron a 0,2 mg/ml y los anticuerpos de control se imprimieron con las concentraciones indicadas en la Tabla 9. No se utilizó un testigo de la eficiencia del ensayo para el anticuerpo secundario.

Tabla 9: Detección con la matriz de anticuerpos para detectar citocinas

IgG anti-humana- peroxidasa (50 µg/ml) (Marcador de confianza)	Anticuerpo anti-IgG humana (eficiencia del ensayo (1)) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-IgG humana (eficiencia del ensayo (1)) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-IgM humana (eficiencia del ensayo (1)) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-IgM humana (eficiencia del ensayo (1)) (200 µg/ml)
Tampón de impresión (testigo negativo)	Anticuerpo anti-IFN γ humano (elemento de captura) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-IFN γ humano (elemento de captura) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-TNF α humano (elemento de captura) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-TNF α humano (elemento de captura) (200 µg/ml)
IgG biotinilada anti- humana (eficiencia del ensayo (3)) 50 µg/ml	Anticuerpo anti-IL4 humana (elemento de captura) (200 µg/ml)	Anticuerpo anti-IL4 humana (elemento de captura) (200 µg/ml)	Tampón de impresión (testigo negativo)	Tampón de impresión (testigo negativo)
Tampón de impresión (testigo negativo)	Tampón de impresión (testigo negativo)	Tampón de impresión (testigo negativo)	Tampón de impresión (testigo negativo)	Tampón de impresión (testigo negativo)
Estreptavidina- peroxidasa (testigo colorimétrico) (400 µg/ml)	IgG humana (50 µg/ml) (eficiencia del ensayo (2))	IgG humana (50 µg/ml) (eficiencia del ensayo (2))	IgM humana (50 µg/ml) (eficiencia del ensayo (2))	IgG anti-humana- peroxidasa (50 µg/ml) (Marcador de confianza)

Las matrices impresas se utilizaron para medir la cantidad, de citocinas incubando inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min.

- 5 Se añadió suero humano enriquecido con cantidades conocidas de citocinas a cada una de las noventa y seis matrices sobre la placa de la membrana. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min, y el material no unido se eliminó mediante lavado con PBS-T.

10 Las citocinas unidas a anticuerpos en la matriz se detectaron mediante incubaciones secuenciales con anticuerpos anti-citocina biotinilados y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Los testigos positivos se detectaron mediante incubación con anticuerpos anti-IgG humana y anti-IgM humana biotinilados, antes de añadir la estreptavidina-HRP. La cantidad de peroxidasa en cada punto se midió a continuación, mediante el uso de diaminobencidina potenciada con metal.

15 En este experimento, los anticuerpos de la eficiencia del ensayo (2) sobre la matriz detectaron los anticuerpos secundarios para determinar el testigo de la eficiencia del ensayo (1) (es decir, los anticuerpos anti-IgG humana y anti-IgM humana biotinilados), en lugar de ser los anticuerpos los que detectaban los anticuerpos anti-citocinas humanas biotinilados, preferidos en el Ejemplo 3.

20 Un ejemplo representativo de los resultados obtenidos a partir del procesamiento de una muestra de suero humano enriquecida con TNF α a 1,25 µg/ml e IFN γ a 0,32 ng/ml, se muestra en la Figura 3. La línea discontinua representa la señal umbral por encima de la cual el resultado se considera positivo. El umbral se basa en la intensidad de la señal de puntos de testigo negativo y es dos veces la señal. Los datos también se muestran en la Tabla 10 para las muestras analizadas.

Tabla 10: Resultados del Ejemplo 5

Número de muestra	Prueba	Resultado	Comentario
1	IgG	Positivo	La muestra era suero
	IgM	Positivo	La muestra era suero
	IFN γ	Positivo	Citocina presente
	TNF α	Positivo	Citocina presente
	IL4	Negativo	No presente

Ejemplo 6

- 25 Matrices de antígenos para la detección de anticuerpos en muestras reactivas con antígenos de enfermedades infecciosas

Los reactivos enumerados en la Tabla 11 se utilizaron para la preparación y el procesamiento de matrices de antígenos.

Tabla 11: Reactivos para el ensayo de detección de anticuerpos

Reactivo	Proveedor	Nº de Catálogo	Función
Anticuerpo anti-ratón peroxidasa	Pierce	31430	Reacción de color
Antígeno recombinante del núcleo del virus de la hepatitis B	BiosPacific	J44400352	Elementos de captura
Antígeno recombinante de la superficie del virus de la hepatitis B, ad	BiosPacific	J44050228	
Antígeno recombinante de la superficie del virus de la hepatitis B, av	BiosPacific	J44030228	
Anticuerpo anti-hepatitis B de ratón, reactivo con el subtipo ad y av	BiosPacific	A34060259P	
Antígeno de IgG E1A de CMV E1A	BiosPacific	J43010230	
Antígeno de IgM E1A de CMV	BiosPacific	J43020230	
Antígeno de influenza A	BiosPacific	J43610149	
Antígeno de influenza B	BiosPacific	J43620149	
IgG anti-humana de cabra peroxidasa	Pierce	31412	Marcador de confianza y reacción de color
IgM anti-humana de cabra peroxidasa	Pierce	31415	Reacción de color
Anticuerpo anti-IgG humana de cabra	Pierce	31119	Detecta la adición de la muestra. (eficiencia del ensayo (1)) Detecta IgG e IgM que se unen al testigo de la eficiencia del ensayo (1)
Anticuerpo anti-IgM humana de raton	BioLegend	314501	
IgG humana	Pierce	31154	Detecta la detección de adición de anticuerpo. (eficiencia del ensayo (1))
IgG de cabra	Pierce	31212	Especificidad del ensayo

- 5 Las matrices se imprimieron en cuadrículas de 5X5. Los anticuerpos de control y los antígenos recombinantes o purificados se imprimieron a diversas concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Diseño del ensayo con antígenos para la detección de anticuerpos

IgG anti-humana-peroxidasa 50 µg/ml	Ag de IgG E1A de CMV 0,5 mg/ml	Ag de IgG E1A de CMV 0,5 mg/ml	Ag de IgM E1A de CMV 0,5 mg/ml	Ag de IgM E1A de CMV 0,5 mg/ml
Tampón de impresión	Ag de superficie de hepatitis B <i>ad</i> 0,25 mg/ml	Ag de superficie de hepatitis B <i>ad</i> 0,25 mg/ml	Ag de superficie de hepatitis B <i>ay</i> 0,25 mg/ml	Ag de superficie de hepatitis B <i>ay</i> 0,25 mg/ml
Anticuerpo anti-IgM humana	Ag de Influenza A 0,25 mg/ml	Ag de influenza A 0,25 mg/ml	Ag de Influenza B 0,25mg/ml	Ag de Influenza B 0,25 mg/ml
Tampón de impresión	Ag del núcleo de Hepatitis B 0,25 mg/ml	Ag del núcleo de Hepatitis B 0,25 mg/ml	Tampón de impresión	Tampón de impresión
IgG anti-humana-peroxidasa 50 µg/ml	Anticuerpo anti-IgG humana 0,2 mg/ml	IgG humana 0,01 mg/ml	IgG de cabra 0,2 mg/ml	IgG anti-humana-peroxidasa 50 µg/ml

Las matrices impresas se incubaron inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min.

5 Suero humano enriquecido con 10 µg/ml de anticuerpos anti-hepatitis B que reaccionaban con los subtipos *ad* y *ay*, se añadieron a la Fila A de la placa que contenía las matrices y se diluyó 2 veces en Bloqueador desde la Fila A a la G. La Fila H solo contenía la solución bloqueante. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min, y los anticuerpos no unidos se lavaron con PBS-T.

Los anticuerpos unidos a antígenos en la matriz se detectaron incubando con una mezcla de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, y anticuerpos anti-IgG e IgM humanas. La cantidad de peroxidasa en cada punto se midió a continuación, empleando diaminobencidina potenciada con metal.

10 Como se muestra en la Figura 4, el ensayo devolvió una señal positiva por la presencia de anticuerpos anti-hepatitis B reactivos con los subtipos *ad* y *ay*. La señal procedente de otros antígenos estaba por debajo del umbral para pruebas con un resultado positivo, destacando la especificidad de la matriz.

Ejemplo 7

Optimización de la concentración de la impresión del marcador de confianza

15 Se añadieron 50 µl del tampón de impresión a cada uno de tres tubos de marcador del peso molecular de proteínas, liofilizado, teñido previamente con BlueRanger Prestained Protein Molecular Weight Marker (Pierce, nº de catálogo 26681). Las tres soluciones de proteína se agruparon y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga etiquetado como Tubo 1. Otros cuatro tubos de microcentrífuga se etiquetaron como 2 a 5 y se añadieron 62 µl de tampón de impresión a cada tubo

20 La proteína teñida previamente se diluyó 2 veces de los tubos 1 a 5 y se utilizó para la impresión de matrices. La configuración de la matriz se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Configuración de la matriz

Proteína sin diluir teñida previamente	Proteína sin diluir teñida previamente
dilución 1 a 2 de proteína	dilución 1 a 2 de proteína
dilución 1 a 4 de proteína	dilución 1 a 4 de proteína
dilución 1 a 8 de proteína	dilución 1 a 8 de proteína
dilución 1 a 16 de proteína	dilución 1 a 16 de proteína

Las matrices se escanearon y se analizaron, y los resultados se muestran en la Figura 5, en donde las unidades del eje x identifican el tubo y, por lo tanto, el factor de dilución.

25 Ejemplo 8

Matrices de alérgenos para la detección de anticuerpos anti-IgE

30 Matrices para la detección de anticuerpos IgE para alérgenos de interés, tales como los obtenidos por métodos recombinantes o derivados, por ejemplo, de ácaros del polvo, polen de la hierba y de los árboles, caspa de animales, hongos, venenos de insectos, y alimentos tales como proteína de soja, proteínas de la leche, proteínas derivadas de variedades de frutos secos, cereales y legumbres, proteínas de mariscos como camarón, abulón y langosta y otros, se crean mediante la impresión de paneles de alérgenos como elementos de captura para la captura específica de anticuerpos IgE. Una serie de anticuerpos de control y proteínas de control también se imprimen. Estos testigos sirven para una variedad de funciones, incluyendo testigos para supervisar la eficiencia del ensayo, incluyendo la eficiencia de los reactivos individuales, testigos para supervisar la especificidad del ensayo y marcadores de confianza para reticular las matrices después de procesamiento de la muestra, para determinar la intensidad de la señal en cada uno de los puntos en la matriz. La Tabla 14 resume los reactivos ejemplares que se pueden usar para imprimir y procesar matrices de alérgenos.

Tabla 14: Reactivos de la matriz de alérgenos

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
Proteína o anticuerpo conjugado con un colorante cromogénico o una	Marcador de confianza para permitir que el programa informático de reticulación localice y coloque cuadrículas sobre	Marcador proteico conjugado con colorante BlueRanger o conjugado de anticuerpo peroxidasa de rábano picante	

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
enzima	cada punto de la matriz		
Tampón de impresión	Testigo negativo para determinar la señal de fondo en la matriz		
Anticuerpo anti-IgE (testigo de la eficacia del ensayo 1)	Determina la presencia de IgE total en la muestra	Anticuerpo anti-IgE de ratón humano	La presencia de IgE en suero dará como resultado la unión de IgE a este punto; si se somete a ensayo una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgE procedente de especies que se van a someter a ensayo
Conjugado de proteína que se une a hapteno-enzima	Testigo colorimétrico positivo para supervisar la eficiencia del sustrato enzimático	Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	
Anticuerpo anti-IgG humana (testigo de la eficiencia del ensayo1)	Testigo para demostrar la adición de la muestra		La adición de suero dará como resultado la unión de IgG sérica a este punto; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG procedente de las especies que se van a someter a ensayo
IgE (testigo de la eficiencia del ensayo 2)	Testigo para demostrar la adición de anticuerpo secundario para la detección	IgE humana	El anticuerpo secundario se unirá a la IgE; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de anti-IgE procedente de las especies que se van a someter a ensayo
Anticuerpo no específico	Testigo negativo para determinar la especificidad de la captura del antígeno (especificidad del ensayo)	IgG de hámster	IgG procedente de una especie no representada en el panel de la matriz y reactivos de detección
Panel de alérgenos de la prueba para la captura de anticuerpo	Pruebas de diagnóstico para determinar la especificidad de la IgE de un paciente frente al alérgeno (elementos de captura)	Extracto de ácaros del polvo	Cada uno de los alérgenos de la prueba se puede imprimir por duplicado o como un solo punto (para un panel de 16 pruebas)

5 Las matrices se imprimen en cuadrículas 5X5 tal y como se muestra en la Tabla 15. Los anticuerpos de control se imprimen a concentraciones desde 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml dependiendo de la señal obtenida a partir de los anticuerpos de control. Los alérgenos de la prueba se imprimen a concentraciones desde 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml en función de la afinidad del antígeno hacia los anticuerpos de la prueba procedentes de muestras biológicas de testigo positivo.

Tabla 15: Diseño de la matriz de alérgenos para la detección de anticuerpos IgE

Marcador de confianza	Alérgeno de la prueba 1	Alérgeno de la prueba 1	Alérgeno de la prueba 2	Alérgeno de la prueba 2
Tampón de impresión (testigo negativo)	Alérgeno de la prueba 3	Alérgeno de la prueba 3	Alérgeno de la prueba 4	Alérgeno de la prueba 4
Anticuerpo anti-IgE (eficiencia del ensayo (1))	Alérgeno de la prueba 5	Alérgeno de la prueba 5	Alérgeno de la prueba 6	Alérgeno de la prueba 6
Tampón de impresión (testigo negativo)	Alérgeno de la prueba 7	Alérgeno de la prueba 7	Alérgeno de la prueba 8	Alérgeno de la prueba 8

Proteína conjugada con HRP (testigo colorimétrico)	Anticuerpo anti-IgG humana (eficiencia del ensayo (1))	IgE (eficiencia del ensayo (2))	Anticuerpo de una especie sin reactividad cruzada (especificidad del ensayo)	Marcador de confianza
--	--	---------------------------------	--	-----------------------

Las matrices impresas se utilizan para medir la presencia de anticuerpos incubando inicialmente con Bloqueador inicialmente a 37°C durante 60 min.

5 Se pueden añadir hasta noventa y seis muestras diferentes que se van a ensayar (por ejemplo, suero o plasma) a los pocillos individuales. Las muestras se pueden añadir sin diluir o se pueden diluir en Bloqueador antes de la adición al pocillo del ensayo. La membrana se incubaba a 37°C durante 60 min, y el material no unido se elimina mediante lavado con PBS-T.

10 Los anticuerpos unidos a antígenos en la matriz se detectan mediante incubaciones con anticuerpos secundarios conjugados con enzimas o anticuerpos secundarios conjugados con una molécula de color, tal como oro coloidal. La cantidad de enzima en cada punto se mide entonces empleando un sustrato que da como resultado un precipitado de color, depositado en el punto. Los testigos positivos se detectan del modo siguiente: el testigo colorimétrico se detectó mediante la adición de sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (1) se unirá a IgG en la muestra de suero y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo secundario-enzima y el sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (2) se unirá al conjugado de anticuerpo secundario-enzima y se detecta por la adición del sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (1) se unirá a IgE en la muestra de suero y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo secundario-enzima y el sustrato enzimático.

Ejemplo 9

Matrices compuestas de anticuerpos y antígenos

20 Las matrices para detectar simultáneamente la presencia de anticuerpos y antígenos, tales como citocinas y otros biomarcadores proteicos en el suero, se crean mediante la impresión de paneles de antígenos y anticuerpos afines correspondientes como elementos de captura para la captura específica de analitos. También se imprime una serie de anticuerpos de control y proteínas de control. Estos testigos sirven para una variedad de funciones, tales como la supervisión de la eficiencia del ensayo, incluyendo la eficiencia de los reactivos individuales, la supervisión de la especificidad del ensayo, y los marcadores de confianza para reticular las matrices después del procesamiento de la muestra para determinar la intensidad de la señal en cada punto en la matriz. La Tabla 16 resume los reactivos ejemplares que se pueden usar para imprimir y procesar estas matrices compuestas.

Tabla 16: Reactivos de una matriz compuesta de anticuerpos y antígenos

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
Proteína o anticuerpo conjugado con un colorante cromogénico o una enzima	Marcador de confianza para permitir que el programa informático de reticulación localice y coloque cuadrículas sobre cada punto de la matriz	Marcador proteico conjugado con colorante BlueRanger o conjugado de anticuerpo peroxidasa de rábano picante	
Tampón de impresión	Testigo negativo para determinar la señal de fondo en la matriz		
IgG anti-anticuerpo secundario (testigo de la eficiencia del ensayo 3)	Supervisión de la eficiencia de los anticuerpos secundarios de detección	Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón	La adición del anticuerpo secundario dará como resultado la unión de IgG a este punto; el anticuerpo depositado variará dependiendo del contenido en la mezcla de anticuerpos secundarios.
Conjugado de proteína que se une a hapteno-enzima	Testigo colorimétrico positivo para supervisar la eficiencia del sustrato enzimático	Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante	
Anticuerpo anti-IgG humana (testigo de la eficiencia del ensayo 1)	Testigo para demostrar la adición de la muestra		La adición de suero dará como resultado la unión de IgG sérica a este punto; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se

Reactivo	Función	Ejemplo	Comentarios
			sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a someter a ensayo.
IgG (testigo de la eficiencia del ensayo 2)	Testigo para demostrar la adición del anticuerpo secundario de detección	IgG humana	El anticuerpo secundario se unirá a la IgG; si se va a analizar una muestra no humana, el anticuerpo se sustituirá por uno adecuado para la captura de IgG de las especies que se van a someter a ensayo.
Anticuerpo no específico	Testigo negativo para determinar la especificidad de la captura del antígeno (ensayo de la especificidad)	IgG de hámster	IgG de una especie no representada en el panel de la matriz y reactivos de detección.
Panel de antígenos del ensayo para la captura del anticuerpo	Pruebas de diagnóstico para determinar la especificidad de la IgG o IgM del paciente frente al antígeno (elementos de captura)	Antígeno anti-nuclear (ANA)	Cada uno de los antígenos del ensayo se puede imprimir por duplicado o como punto aislado (para un panel de 16 pruebas).
Panel de anticuerpos del ensayo para la unión a antígenos	Pruebas de diagnóstico para determinar la presencia de antígenos en muestras del paciente (elementos de captura)	Proteína C-reactiva	Cada uno de los anticuerpos del ensayo se puede imprimir por duplicado o como punto aislado (para un panel de 16 pruebas).

5 Las matrices se imprimen en cuadrículas 5X5 tal y como se muestra en la Tabla 17. Los anticuerpos de control se imprimen a concentraciones desde 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml, dependiendo de la señal obtenida a partir de los anticuerpos de control. Los antígenos y los anticuerpos de la prueba se imprimen a concentraciones desde 0,05 mg/ml a 1,0 mg/ml en función de la afinidad del antígeno hacia los anticuerpos de la prueba procedentes de muestras biológicas de testigo positivo.

Tabla 17: Matrices compuestas de anticuerpos y antígenos

Marcador de confianza	Antígeno de la prueba 1	Antígeno de la prueba 1	Antígeno de la prueba 2	Antígeno de la prueba 2
Tampón de impresión (testigo negativo)	Antígeno de la prueba 3	Antígeno de la prueba 3	Antígeno de la prueba 4	Antígeno de la prueba 4
IgG anti-anticuerpo secundario (eficiencia del ensayo (3))	Anticuerpo de la prueba 1	Anticuerpo de la prueba 1	Anticuerpo de la prueba 2	Anticuerpo de la prueba 2
Tampón de impresión (testigo negativo)	Anticuerpo de la prueba 3	Anticuerpo de la prueba 3	Anticuerpo de la prueba 4	Anticuerpo de la prueba 4
Proteína conjugada con HRP (testigo colorimétrico)	Anticuerpo anti-IgG humana (eficiencia del ensayo (1))	IgG (eficiencia del ensayo (2))	Anticuerpo de una especie sin reactividad cruzada (especificidad del ensayo)	Marcador de confianza

10 Las matrices impresas se utilizan para medir la presencia de antígenos y anticuerpos, incubando inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min.

Se pueden añadir hasta noventa y seis muestras diferentes que se van a analizar, tales como suero o plasma, a los pocillos individuales. Las muestras se pueden añadir sin diluir o se pueden diluir en Bloqueador antes de la adición al pocillo de la prueba. La membrana se incuba a 37°C durante 60 min, y el material no unido se elimina mediante lavado con PBS-T.

15 Los antígenos y los anticuerpos unidos a los reactivos en la matriz se detectan mediante incubaciones con anticuerpos secundarios conjugados con enzimas o anticuerpos secundarios conjugados con una molécula de color, tal como oro coloidal. La cantidad de enzima en cada punto se mide entonces utilizando un sustrato que da como

resultado un precipitado de color depositado en el punto. Los testigos positivos se detectan del modo siguiente. El testigo colorimétrico se detectó mediante la adición de sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (1) se unirá a IgG en la muestra de suero y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo secundario-enzima y el sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (2) se unirá el conjugado de anticuerpo secundario-enzima y se detecta por la adición del sustrato enzimático. El testigo de la eficiencia del ensayo (3) se unirá a IgG secundaria (anticuerpos de detección) y se detecta mediante la adición de un conjugado de anticuerpo de detección-enzima y el sustrato enzimático.

Ejemplo 10

Matrices de agentes patógenos víricos de las vías respiratorias superiores para la detección de anticuerpos en muestras de suero

Los reactivos enumerados en la Tabla 18 se utilizaron para la preparación y el procesamiento de matrices antígenos.

Tabla 18: Reactivos del ensayo de detección de anticuerpos

Reactivo	Proveedor	Nº de Catálogo	Función
Anticuerpo anti-ratón peroxidasa	Pierce	31430	Reacción de color
Antígeno de adenovirus	Virion	1121	Elementos de captura
Antígeno CF de citomegalovirus	Virion	1130	
Antígeno de la influenza A	Microbix	EL-13-02	
Antígeno de la influenza B	Microbix	EL-14-02	
Antígeno de la parainfluenza 3	Microbix	EL-10-02	
Antígeno del virus respiratorio sincitial	Virion	1124	
Antígeno de IgG de citomegalovirus	BiosPacific	J43010230	
Antígeno de la influenza A	BiosPacific	J43610149	
IgG anti-humana de cabra peroxidasa de rábano picante	Pierce	31412	Marcador de confianza y reacción de color
Anticuerpo anti-IgG humana de cabra	Pierce	31119	Detecta la adición de la muestra (eficiencia del ensayo (1)). Detecta la unión de IgG e IgM al testigo de la eficiencia del ensayo (1)
Anticuerpo anti-IgM humana de ratón	BioLegend	314501	
IgG humana	Pierce	31154	Detecta la adición de anticuerpo de detección (eficiencia del ensayo (2)).
IgG de ratón	Pierce	31202	Especificidad del ensayo
IgG anti-ratón de cabra	Pierce	31164	Especificidad del ensayo

Las matrices se imprimieron en cuadrículas de 5X5. Los anticuerpos de control y los antígenos recombinantes o purificados se imprimieron a diversas concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19: Diseño del ensayo con agentes patógenos víricos de las vías respiratorias superiores para la detección de anticuerpos

IgG anti-ratón- peroxidasa 0,1 mg/ml	Ag de adenovirus 2 veces diluido	Ag de adenovirus 2 veces diluido	Ag CF de CMV 2 veces diluido	Ag CF de CMV 2 veces diluido
--	-------------------------------------	-------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

ES 2 422 597 T3

Tampón de impresión	Ag de Influenza A (Microbix) 0,50 mg/ml	Ag de Influenza A (Microbix) 0,50 mg/ml	Ag de Influenza B 0,40 mg/ml	Ag de Influenza B 0,40 mg/ml
Anticuerpo anti-IgG de ratón 0,05 mg/ml	Ag de Parainfluenza 3 1,0 mg/ml	Ag de Parainfluenza 3 1,0 mg/ml	Ag de VSR 2 veces diluido	Ag de VSR 2 veces diluido
Tampón de impresión	Ag de IgG E1A de CMV 0,40 mg/ml	Ag de IgG E1A de CMV 0,40 mg/ml	Ag de Influenza A (Biospacific) 0,40 mg/ml	Ag de Influenza A (BiosPacific) 0,40 mg/ml
IgG humana 0,01 mg/ml	IgG de ratón 0,01 mg/ml	IgG anti-humana 0,025 mg/ml	IgM anti-humana 0,1 mg/ml	IgG anti-ratón-peroxidasa 0,1 mg/ml

5 Las matrices impresas se incubaron inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min. Se añadieron muestras de suero humano con una dilución de 1 a 100 a la Fila A de la placa que contenía las matrices y se diluyó 2 veces en Bloqueador desde la Fila A a G. La Fila H solo contenía la solución bloqueadora. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min, y los anticuerpos no unidos se lavaron con PBS-T.

Los anticuerpos unidos a antígenos en la matriz se detectaron mediante incubación con conjugado de peroxidasa de rábano picante y anticuerpos IgG anti-ratón. La cantidad de peroxidasa en cada punto se midió a continuación, mediante el uso de diaminobencidina potenciada con metal.

10 La Figura 6 muestra los resultados de seis muestras de suero humano con una dilución de 1 a 800, para estudiar la presencia de anticuerpos para cada uno de los seis antígenos víricos en las matrices. Se fijó un umbral de intensidad de la señal de 100000 para una prueba positiva. El ensayo devuelve una señal positiva para algunos de los antígenos en la matriz. La señal de los otros antígenos estaba por debajo del umbral para un resultado de prueba positiva, poniendo de relieve la capacidad de las matrices para determinar la presencia de anticuerpos séricos para los antígenos en la matriz. Basándose en este umbral se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 20.

15 Tabla 20

Muestra	Adeno	CMV	Gripe A	Gripe B	Para3	VSR
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
4	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Ejemplo 11

Matrices de antígenos de la hepatitis B para la detección de anticuerpos anti-hepatitis B en muestras de suero

20 Los reactivos enumerados en la Tabla 21, se utilizaron para la preparación y el procesamiento de matrices de antígenos.

Tabla 21: Reactivos del ensayo de detección de anticuerpos anti-hepatitis B

Reactivo	Proveedor	Nº de Catálogo	Función
Anticuerpo anti-ratón peroxidasa	Pierce	31430	Reacción de color
Antígeno de superficie "ad" de la hepatitis B	BiosPacific	J44010031	Elementos de captura
Antígeno de superficie "ay" de la hepatitis B	BiosPacific	J44020031	
Antígeno "E" de la hepatitis B	BiosPacific	J44200352	
Antígeno del núcleo de la	BiosPacific	J44400352	

Reactivo	Proveedor	Nº de Catálogo	Función
hepatitis B			
IgG anti-humana de cabra peroxidasa de rábano picante	Pierce	31412	Marcador de confianza y reacción de color
Anticuerpo anti-IgG humana	Pierce	31119	Detecta la adición de la muestra (eficiencia del ensayo (1)). Detecta la unión de IgG e IgM al testigo de la eficiencia del ensayo (1)
IgG humana	Pierce	31154	Detecta la adición del anticuerpo de detección (eficiencia del ensayo (2))
IgG anti-ratón de cabra	Pierce	31164	Especificidad del ensayo

Las matrices se imprimieron en cuadrículas de 5X3. Los anticuerpos de control y los antígenos recombinantes o purificados se imprimieron a diversas concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22: Diseño del ensayo con antígenos para la detección de anticuerpos anti-hepatitis B

IgG anti-ratón-peroxidasa 0,1 mg/ml	Antígeno de superficie "ad" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml	Antígeno de superficie "ad" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml
Tampón de impresión	Antígeno de superficie "ay" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml	Antígeno de superficie "ay" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml
Anticuerpo anti-IgG de ratón 0,2 mg/ml	Antígeno "E" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml	Antígeno "E" de la hepatitis B 0,2 mg/ ml
Tampón de impresión	Antígeno del núcleo de la hepatitis B 0,2 mg/ ml	Antígeno del núcleo de la hepatitis B 0,2 mg/ ml
Anticuerpo anti-IgG humana 0,2 mg/ml	IgG humana 0,05 mg/ml	IgG anti-ratón-peroxidasa 0,1 mg/ml

5

Las matrices impresas se incubaron inicialmente con Bloqueador a 37°C durante 60 min. Las muestras de suero humano fueron añadidas con una dilución de 1 a 100 a la Fila A de la placa que contenía las matrices y se diluyeron 2 veces en Bloqueador desde la Fila A a G. La Fila H solo contenía la solución bloqueadora. La membrana se incubó a 37°C durante 60 min, y los anticuerpos no unidos se lavaron con PBS-T.

- 10 Los anticuerpos unidos a antígenos en la matriz se detectaron mediante incubación con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. La cantidad de peroxidasa en cada punto se midió a continuación, mediante el uso de diaminobencidina potenciada con metal. La Figura 7 muestra los resultados de diez muestras de suero humano sometidas a ensayo con una dilución de 1 a 4000, para estudiar la presencia de anticuerpos para cada uno de los cuatro antígenos de la hepatitis B sobre las matrices.
- 15 Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia al ejemplo anterior, se entenderá que modificaciones y variaciones se incluyen dentro del espíritu y el alcance de la invención. En consecuencia, la invención solo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una membrana microporosa para la detección de al menos un analito diana en una muestra, que comprende una matriz que comprende al menos un elemento de captura y cinco elementos de control impresos en la superficie de la membrana, en donde el elemento de captura, al menos uno, se corresponde y es capaz de unirse a un analito diana, en donde la pluralidad de elementos de control comprende:
- 5
- i) al menos un marcador de confianza,
 - ii) al menos un testigo negativo para supervisar la señal de fondo,
 - iii) al menos un testigo negativo para supervisar la especificidad del ensayo,
 - iv) al menos un testigo colorimétrico positivo, y/o
 - 10 v) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.
2. La membrana según la reivindicación 1, en donde la membrana es para detectar una pluralidad de analitos diana en una muestra, comprendiendo la membrana una matriz de elementos de captura impresa en la superficie de la membrana, correspondiéndose cada elemento de captura y siendo capaz de unirse a un analito diana.
3. La membrana microporosa según la reivindicación 2, en donde la matriz de elementos de captura comprende una pluralidad de grupos de elementos de captura, siendo capaz cada elemento de captura dentro de un grupo de unirse al mismo analito diana, y siendo capaz cada grupo de elementos de captura de unirse a un analito diana diferente del de cualquier otro grupo de elementos de captura.
- 15
4. La membrana microporosa según la reivindicación 2, en donde la matriz de elementos de captura comprende una pluralidad de parejas de elementos de captura, siendo capaz cada elemento de captura en una pareja de unirse al mismo analito diana, y siendo capaz cada pareja de elementos de captura de unirse a un analito diana diferente del de cualquier otra pareja de elementos de captura.
- 20
5. La membrana microporosa según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana indicativos de una o varias enfermedades o afecciones humanas como las que se exponen en la Tabla 1.
- 25
6. La membrana microporosa según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana para determinar la eficacia de uno o varios tratamientos, como los que se exponen en la Tabla 2.
- 30
7. La membrana microporosa según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde la pluralidad de grupos de elementos de captura es capaz de unirse a una pluralidad de analitos diana, en donde la pluralidad de analitos diana comprende uno o varios paneles de analitos diana para someter a ensayo a animales como los que se exponen en la Tabla 3.
8. La membrana microporosa según la reivindicación 2, en donde el analito diana se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, un péptido, un polipéptido, un fragmento de polipéptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un fragmento de antígeno, un determinante antigénico, un epitopo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de inmunógeno, un ión metálico, una molécula revestida con iones metálicos, biotina, avidina, estreptavidina, un inhibidor, un cofactor, un sustrato, una enzima, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un ligando de receptor, un agonista de receptor, un antagonista de receptor, una molécula de señalización, una proteína de señalización, un fragmento de proteína de señalización, un factor de crecimiento, un fragmento de factor de crecimiento, un factor de transcripción, un fragmento de factor de transcripción, un inhibidor, un monosacárido, un oligosacárido, un polisacárido, una glicoproteína, un lípido, una célula, una proteína de la superficie celular, un lípido de la superficie celular, un carbohidrato de la superficie celular, una glicoproteína de la superficie celular, un extracto celular, un virus, una proteína de la cubierta vírica, una hormona, una proteína sérica, una proteína de la leche, una macromolécula, una droga, un oligonucleótido o cualquier combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.
- 35
- 40
- 45
9. La membrana microporosa según la reivindicación 2, en donde el elemento de captura se selecciona a partir de una proteína, un fragmento de proteína, una proteína de unión (BP), un fragmento de proteína de unión, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio único (un VHH, por ejemplo), un fragmento de anticuerpo Fab, un fragmento de anticuerpo Fc, un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo Fab', un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio que se une a anticuerpo, un antígeno, un determinante antigénico, un epitopo, un hapteno, un inmunógeno, un fragmento de
- 50

inmunógeno, un dominio de unión; biotina, una avidina, una estreptavidina; un sustrato, una enzima, una abzima, un cofactor, un receptor, un fragmento de receptor, una subunidad de receptor, un fragmento de una subunidad de receptor, un ligando, un inhibidor, una hormona, un sitio de unión, una lectina, una polihistidina, un dominio de acoplamiento, un oligonucleótido, o una combinación de dos cualesquiera o más de los mismos.

- 5 10. La membrana según la reivindicación 1, en donde la membrana está fijada de forma movable a la placa de microtitulación sin fondo.
11. Un kit para detectar una pluralidad de analitos diana en una muestra, que comprende:
- a) una membrana microporosa según la reivindicación 2, y, opcionalmente, uno o ambos de los siguientes elementos:
- 10 b) un reactivo reductor del ruido de fondo, y
- c) un sistema de detección colorimétrica.
12. El kit según la reivindicación 11, que comprende además uno o varios elementos seleccionados entre el grupo que consiste en:
- a) una solución de lavado,
- 15 b) uno o varios anticuerpos para la detección de antígenos, ligandos o anticuerpos unidos a los elementos de captura o para la detección de los testigos positivos,
- c) un programa informático para el análisis de los analitos diana capturados, y
- d) un protocolo para medir la presencia de analitos diana en las muestras.
- 20 13. El kit según la reivindicación 12, en donde los anticuerpos de detección comprenden conjugados de anticuerpo-proteína de unión (BP), conjugados de anticuerpo-marcador enzimático o cualquier combinación de los mismos.
14. Un método para el procesamiento de una micromatriz que comprende
- a) proporcionar una membrana microporosa según la reivindicación 2,
- b) añadir al menos una muestra a la membrana, y
- 25 c) procesar la membrana de tal manera que se proporcione un resultado detectable mediante dos o más de los siguientes elementos:
- i) al menos un marcador de confianza,
- ii) al menos un testigo colorimétrico positivo, y
- iii) al menos un testigo positivo para supervisar la eficiencia del ensayo.
- 30 15. Un método para detectar un analito en una muestra que comprende proporcionar una membrana según la reivindicación 1, añadir al menos una muestra a la membrana y procesar la membrana de tal manera que se proporcione un resultado detectable.
16. El método según la reivindicación 15, en el que el resultado detectable incluye dos o más de al menos un marcador de confianza, al menos un testigo colorimétrico positivo y al menos un testigo positivo para detectar un
- 35 analito en la muestra.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en donde el marcador de confianza se emplea para orientar y reticular la matriz.

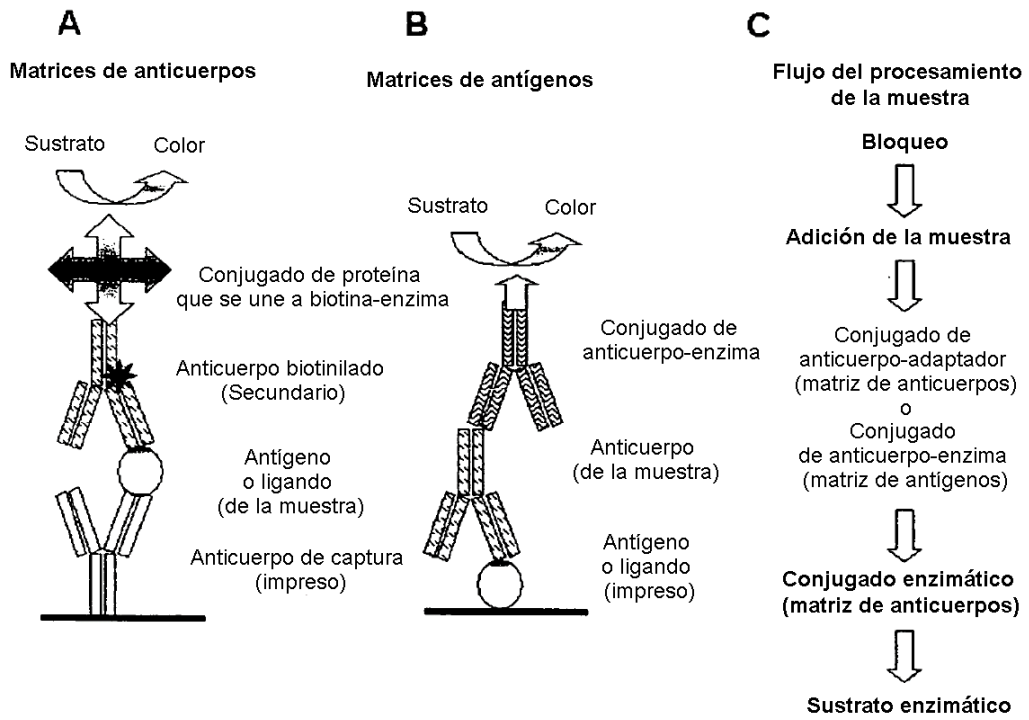


FIG. 1

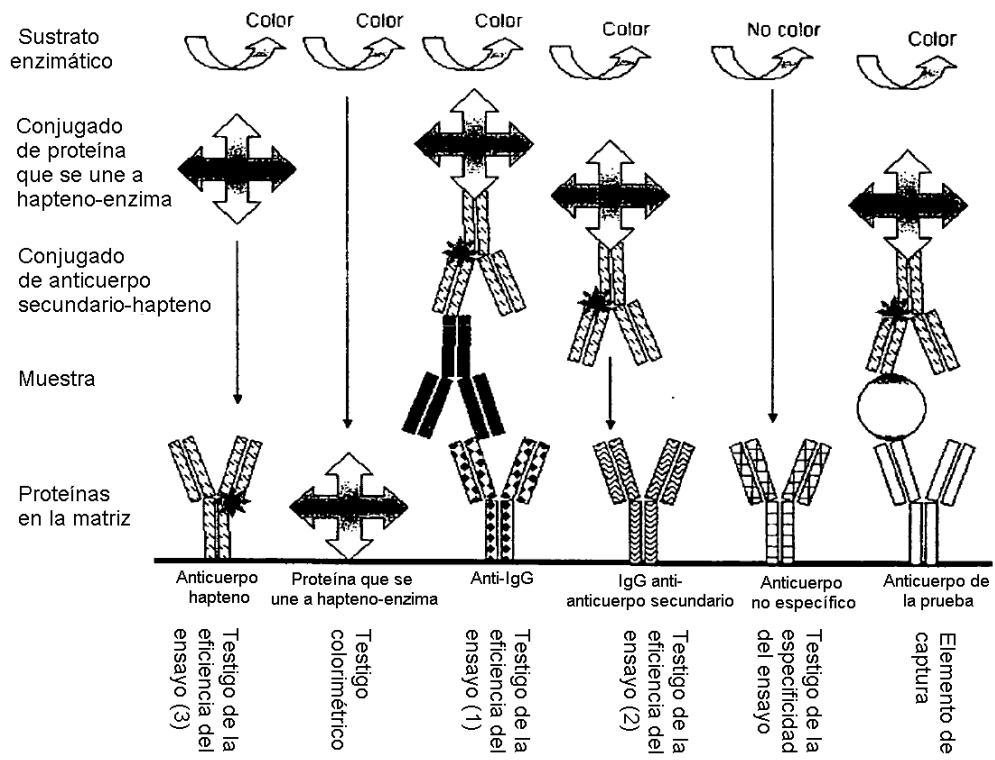


FIG. 2

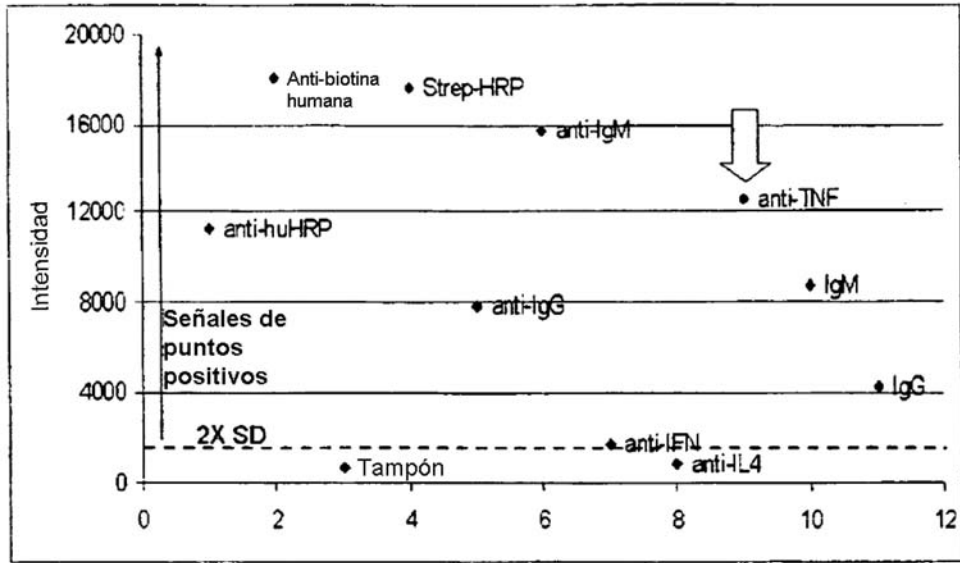


FIG. 3

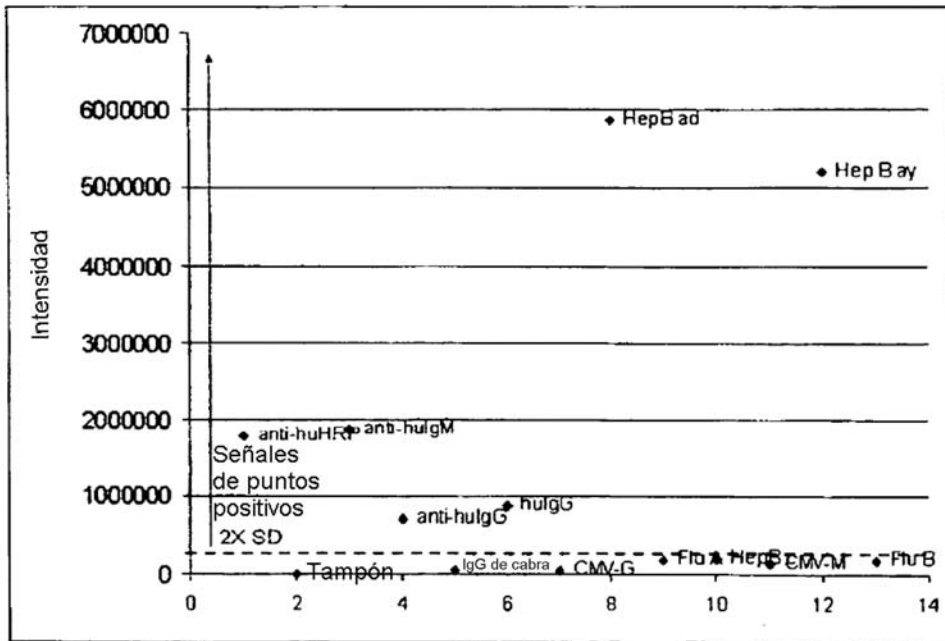


FIG. 4

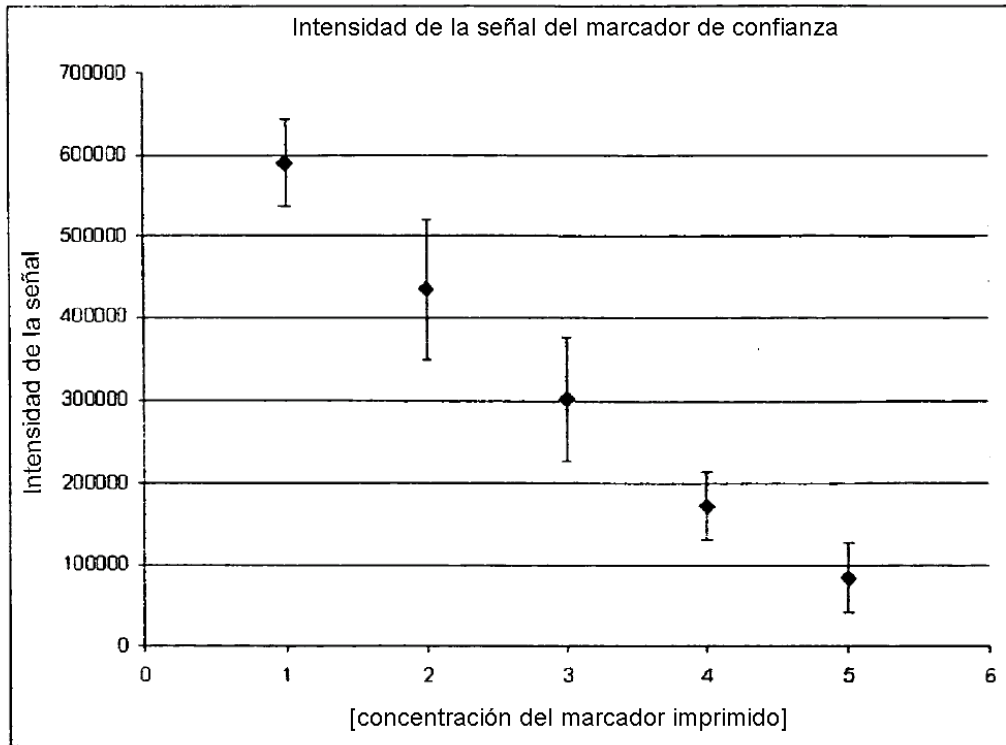


FIG. 5

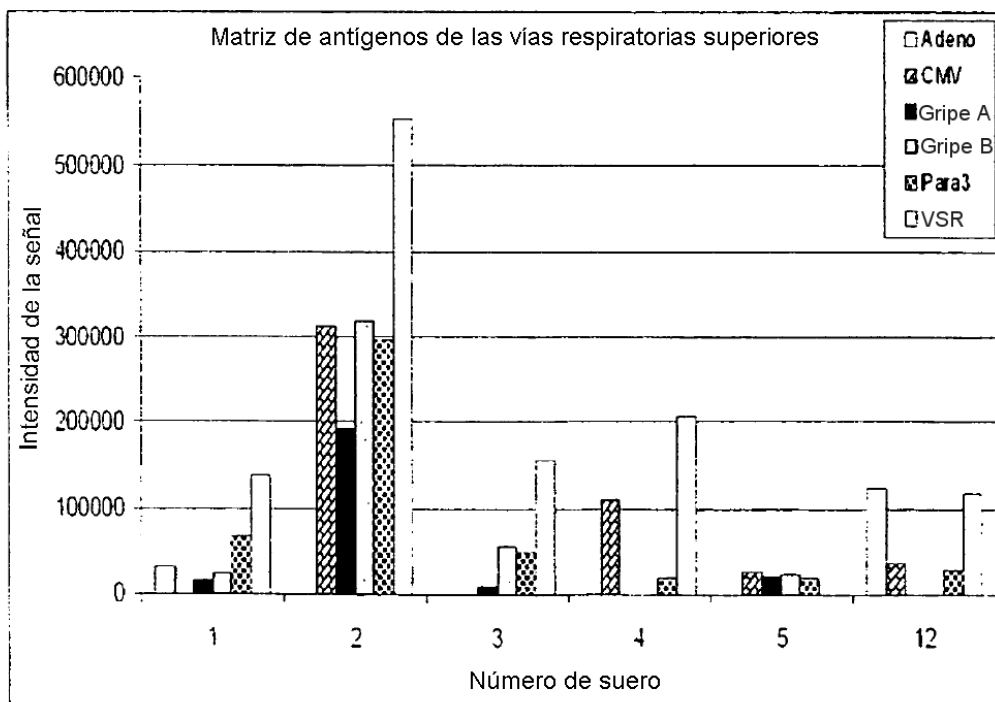


FIG. 6

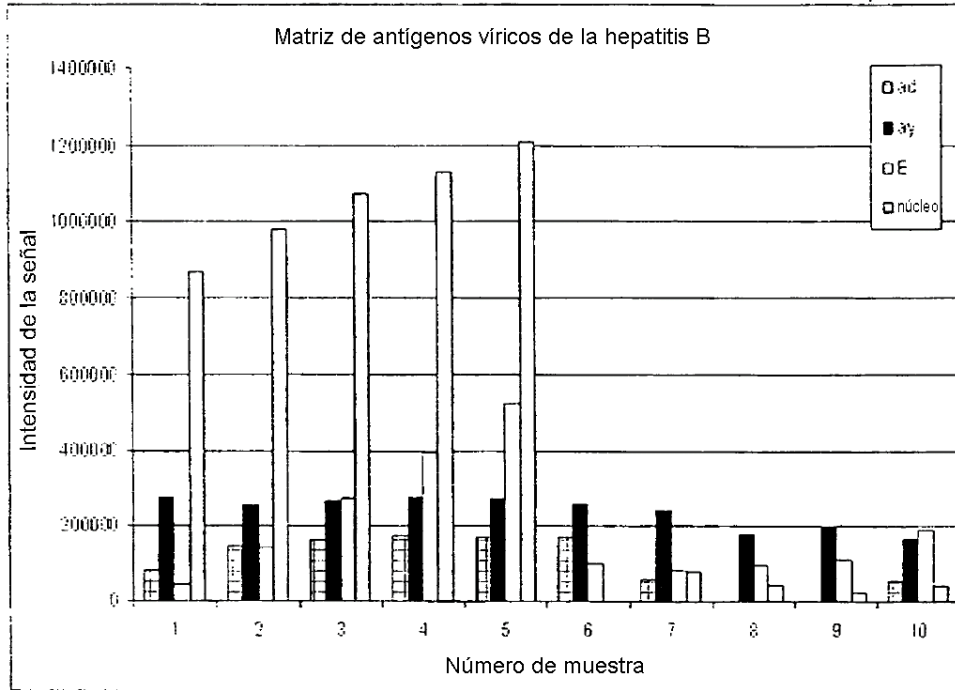


FIG. 7