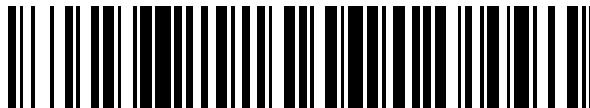


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2001 E 01104170 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1143248**

54 Título: **Método para inmovilizar conjugados en pruebas diagnósticas**

30 Prioridad:

29.02.2000 DE 10009503

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

20.03.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

SCHÄFFLER, JÜRGEN, DR. y
UPMEIER, BARBARA, DR.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 449 491 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

Método para inmovilizar conjugados en pruebas diagnósticas

5 La presente invención se refiere a un método de detección de un analito en una muestra, con el uso de conjugados específicos del analito que presentan al menos un grupo heterólogo para una unión independiente del analito a una zona de control. Además la presente invención ofrece nuevos kits de reactivos.

10 Para detectar analitos – p.ej. sustancias de importancia diagnóstica – en una muestra se usan reactivos específicos del analito, por ejemplo componentes de unión específicos del analito buscado y/o análogos del mismo. En el caso de los métodos de detección heterogéneos se usa una fase sólida para fijar el analito, de manera que éste se separe de otros componentes de cara a la determinación cualitativa o cuantitativa. Esta fijación a una fase sólida la puede facilitar otro receptor específico del analito que se une a la fase sólida antes o durante la realización del ensayo. En un método de detección según el principio del ensayo sándwich se puede fijar un componente de unión específico del analito a la fase sólida y detectar el analito mediante un componente de unión libre, específico del analito, que lleve un grupo marcador. En un método de detección competitivo, como reactivo específico del analito en la fase sólida también se puede usar un componente de unión específico del analito y detectar éste indirectamente, fijando a la fase sólida un análogo del mismo libre y marcado.

20 Una forma de ejecución técnica especial de los métodos de detección heterogéneos son las tiras de ensayo que llevan una zona de detección definida para la determinación cuantitativa o cualitativa del analito. El receptor libre, específico del analito, usado en la detección lleva preferiblemente una marcación directa, es decir un grupo emisor de una señal directa, por lo cual, además de una determinación cuantitativa con un aparato, también es posible una valoración visual cualitativa del ensayo.

25 Además de la zona de detección del analito, las tiras de ensayo diagnósticas también contienen una zona de control que permite al usuario reconocer la diferencia entre un resultado negativo del ensayo y un uso incorrecto o defecto funcional del mismo. En general dicha zona de control está configurada para permitir la inmovilización del receptor libre específico del analito, independientemente de la presencia del analito en la muestra. Por lo tanto, si el ensayo funciona correctamente, esta zona de control se tiñe en cualquier caso.

30 La fijación del receptor libre específico del analito a la zona de control puede realizarse por distintos procedimientos. Si el receptor libre específico del analito es un componente de unión específico del mismo, en la zona de control se puede inmovilizar el analito, un análogo del analito o un epítipo del mismo, con lo cual se capta el componente de unión libre del analito. Por consiguiente, si el componente de unión libre es un anticuerpo, para la zona de control se puede usar un antígeno que reaccione con el anticuerpo, un análogo de dicho antígeno o un epítipo del mismo.

35 Sin embargo en algunos casos esta forma de ejecución no es realizable, porque el analito no está suficientemente disponible o/y caracterizado para poder preparar análogos o/y epítipos del mismo, y/o porque el componente de unión específico reconoce regiones del analito que no son reproducibles como epítipo o ya no son accesibles tras la inmovilización sobre la tira de ensayo.

40 Hasta ahora, en estos casos se usaba un receptor dirigido contra una región homóloga del componente de unión no fijadora del analito, para captar el componente de unión libre específico del analito en la zona de control de la tira de ensayo. Cuando el componente de unión era un anticuerpo, como receptores de control se usaban anti-anticuerpos que reconocen la región constante del anticuerpo detector o bien otros reactivos capaces de fijar específicamente inmunoglobulinas, p.ej. proteína A o proteína G.

45 Para llegar a una conclusión válida sobre el resultado de un método de detección heterogéneo en formato de tira de ensayo es esencial que haya una reacción señalizadora de la zona de control, pues solo así se puede comprobar el correcto funcionamiento de la tira de ensayo. La coloración de solo la zona de control debe interpretarse como el resultado negativo de un ensayo operativo, mientras que una coloración adicional de la zona de detección del analito significa que el resultado ha sido positivo; dicho en general, que se ha detectado la presencia de un analito en la muestra analizada.

50 La fijación que fundamenta la coloración de la zona de control puede ser alterada por distintas causas. Por ejemplo, en caso de elevadas concentraciones de analito en la muestra se puede agotar en gran medida la capacidad del componente de unión libre del analito, de modo que ya no pueda unirse, o no suficientemente, con un analito o con un epítipo o análogo del mismo inmovilizado en la zona de control. Entonces la zona de control ya no se colorea o solo débilmente (efecto Hook).

55 El empleo de otros receptores independientes del reconocimiento del analito por el componente de unión, como p.ej. sustancias fijadoras de anticuerpos, sobre todo anti-anticuerpos como reactivos de fijación, en la región de control de la tira de ensayo disminuye el riesgo de una pérdida de funcionalidad por efecto Hook. Sin embargo este modelo de control de las tiras de ensayo tiene otras serias desventajas. En muchos casos se utilizan como muestras sustancias biológicas como sangre, plasma o suero. El especialista ya sabe que estas sustancias llevan componentes capaces

- de fijar anticuerpos, las cuales pueden alterar un ensayo inmunológico con anticuerpos como reactivos específicos de unión y detección, dando falsos resultados positivos o negativos. Para prevenir estas mediciones erróneas, como componentes supresores solían adicionarse inmunoglobulinas inespecíficas de aquellas especies animales de las cuales proceden los anticuerpos de detección específicos. La cantidad de estos anticuerpos supresores sobrepasa en gran medida la cantidad de los anticuerpos de detección específicos. Se pueden unir a los reactivos fijadores de la región de control de la tira de ensayo dirigidos contra los anticuerpos de detección y por lo tanto compiten con el reactivo de detección por los sitios de unión. Entonces se fijan menores cantidades de reactivo de detección y la coloración de la zona de control resulta mucho más débil o no tiene lugar en absoluto.
- 5
- 10 La patente WO 96/38720 revela un dispositivo de ensayo cromatográfico para detectar y/o determinar un analito en un ensayo inmunológico competitivo.
- La patente EP 0 833 157 B1 revela unos reactivos que pueden emplearse en ensayos inmunológicos y dispositivos para utilizar estos reactivos.
- 15 El objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos de detección heterogéneos con unas zonas de control que no tengan los inconvenientes del estado técnico arriba descritos.
- La presente invención está definida por las reivindicaciones.
- 20 Este objetivo se resuelve con la utilización de receptores libres específicos del analito derivatizados, es decir, se introduce uno o varios elementos estructurales heterólogos que no existían anteriormente en el receptor libre y con independencia de su marcación y naturaleza fijan específicamente el analito o un componente de unión del mismo. Gracias al nuevo elemento estructural introducido, el receptor derivatizado puede ser reconocido y fijado por un receptor dirigido contra él. Este otro receptor se inmoviliza en la zona de control de la fase sólida empleada para un ensayo heterogéneo y por tanto es posible captar en esta zona el receptor libre marcado. La cantidad de analito en la muestra no influye en la reacción de captura.
- 25 El elemento estructural heterólogo que permite fijar el receptor se puede seleccionar excluyendo ampliamente otras reacciones que interfieren en la unión con el receptor, p.ej. mediante sustancias supresoras.
- 30 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar un analito, según la reivindicación 1.
- 35 El método de la presente invención es especialmente adecuado para las fases sólidas de material poroso, como por ejemplo tiras de ensayo absorbentes. No obstante también sirve para otros tipos de fase sólida, p.ej. para materiales soporte no porosos en forma matricial que, además de una o varias zonas de fijación de analitos, también poseen zonas de control espacialmente definidas.
- 40 La zona de detección de analito de la fase sólida está configurada preferiblemente de modo que sobre ella hay inmovilizado un receptor específico del analito, p.ej. un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente con el analito. La inmovilización puede tener lugar antes o durante la realización del ensayo, con preferencia mediante interacciones de gran afinidad como las de estreptavidina o avidina/biotina. Por otra parte la inmovilización también puede realizarse por adsorción o por enlace covalente.
- 45 En un método de ensayo según el principio sándwich la fijación del analito a la fase sólida se detecta mediante el uso de un receptor libre que comprende un componente de unión específica al analito, p.ej. otro anticuerpo dirigido contra el analito. En un método de ensayo competitivo se puede emplear un análogo como receptor libre. El receptor libre está con preferencia directa o indirectamente marcado. En caso de marcación directa el receptor libre lleva un grupo señalizador y en el caso de la marcación indirecta un grupo capaz de fijarse a un grupo señalizador. Como ejemplos de grupos señalizadores adecuados cabe citar los marcadores radiactivos, enzimas, grupos fluorescentes o luminiscentes y marcadores cromáticos. Se prefieren especialmente las marcaciones directas y entre ellas los grupos detectables por método ópticos, como por ejemplo oro u otras partículas metálicas, colorantes o partículas fluorescentes, p.ej. partículas de látex o partículas de silicato, etc.
- 50 A diferencia de los métodos conocidos, según la presente invención se usa un receptor libre unido como mínimo a un "elemento estructural heterólogo" que sirve para la fijación a una zona de control. Como "elemento estructural heterólogo" en el sentido de la presente invención debe entenderse un elemento estructural que no está asociado al receptor de manera natural. El elemento estructural heterólogo puede estar directamente unido al receptor, pero la unión con el elemento estructural heterólogo también puede ser indirecta, p.ej. a través de un soporte.
- 55 El elemento estructural heterólogo es diferente del grupo del receptor libre específico para la fijación del analito y también diferente del grupo marcador del receptor libre, si lo hay. El elemento estructural heterólogo es un hapteno, preferentemente de bajo peso molecular ($PM \leq 3000$), un péptido de hasta 25 aminoácidos o biotina. El elemento estructural heterólogo puede estar unido al receptor libre por interacciones covalentes o no covalentes. Se prefiere una unión covalente.
- 60
- 65

El elemento estructural heterólogo puede ser por ejemplo un grupo agregado al receptor libre mediante una reacción química de derivación, p.ej. un hapteno acoplado a un polipéptido o a un ácido nucleico. Esta reacción de derivación puede efectuarse antes o después de la introducción de los grupos marcadores. Para la reacción de derivación el elemento estructural heterólogo en forma de un derivado activado – p.ej. un éster activo tal como uno de N-hidroxisuccinimida o como maleimida – suele ponerse en contacto con el receptor libre y se forma una unión a los grupos libres amino o tiol del receptor libre.

El receptor libre se puede seleccionar entre péptidos, polipéptidos, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, sacáridos, polisacáridos y otras sustancias biológicas. Preferiblemente es un péptido o un polipéptido, por ejemplo un anticuerpo. Este anticuerpo se puede modificar por ejemplo con un hapteno, p.ej. digoxigenina o fluoresceína, y a continuación se puede acoplar por adsorción a un grupo marcador, p.ej. partículas metálicas coloidales, por ejemplo partículas de oro. Este anticuerpo doblemente modificado se usa luego combinado con una zona de control que contiene anticuerpos anti-digoxigenina.

En otra forma de ejecución del método de la presente invención la fijación del elemento estructural heterólogo al receptor libre puede estar mediada por un soporte, preferiblemente por coinmovilización, es decir, inmovilización secuencial o/y simultánea sobre una partícula, p.ej. por adsorción. Las partículas se escogen preferiblemente entre las marcaciones directas antes citadas, p.ej. partículas metálicas, colorantes o fluorescentes. En el curso del proceso de preparación, además del receptor libre pueden unirse a estas partículas otras sustancias que le acompañan, por ejemplo estabilizantes, como por ejemplo albúmina de suero bovino, anticuerpos inespecíficos (p.ej. IgG) o agentes humectantes. Entonces, según la presente invención, el elemento estructural heterólogo se puede introducir en una de estas sustancias acompañantes, de manera que resulte un conjugado que lleve el receptor libre y el elemento estructural heterólogo como dos moléculas distintas coinmovilizadas en una partícula. Este conjugado cumple por un lado la función de un receptor libre marcado y por otro lado puede ser captado por un componente de unión dirigido contra el elemento estructural.

El método de la presente invención se puede usar para detectar analitos de importancia diagnóstica en muestras biológicas. Como ejemplos de muestras biológicas cabe citar líquidos corporales como sangre, suero, plasma, orina, saliva y esperma, muestras de tejidos, muestras de cultivos celulares, etc. La muestra analizada se pone en contacto con el reactivo de ensayo y la fase sólida en condiciones adecuadas. En general el orden de puesta en contacto de cada componente no es crítico. En las tiras de ensayo el reactivo suele estar en forma sólida sobre la tira y al entrar en contacto con la muestra líquida se disuelve. A continuación el líquido se mueve por la acción capilar del material absorbente de la tira de ensayo hacia las zonas de detección y control, donde luego puede verse el resultado del ensayo.

En principio el método de la presente invención es adecuado para todos los sistemas de detección del tipo X/anti-X, donde un analito X se puede detectar con un receptor anti-X capaz de unirse al analito, gracias a una interacción específica de gran afinidad. Se trata preferentemente de un método inmunológico de detección o de un método de hibridación de ácidos nucleicos. Evidentemente también hay otros métodos de detección, como por ejemplo los de azúcar/lecitina.

El uso de receptores libres específicos del analito que llevan adicionalmente un elemento estructural heterólogo para la fijación a una zona de control es adecuado, sobre todo, para los métodos de detección que requieren la presencia de reactivos supresores con el fin de poder excluir la frecuente aparición de falsos resultados. Son ejemplos de tales reactivos supresores sustancias de estructura parecida al receptor libre, pero no específicas del analito, como p.ej. anticuerpos de la misma especie o/y de la misma clase de inmunoglobulinas. Es precisamente en estos casos que la presente invención puede ser la única posibilidad de preparar una zona de control operativa.

Otro objeto de la presente invención es un kit de reactivos según la reivindicación 18.

El receptor libre lleva preferiblemente un grupo señalizador o un grupo capaz de unirse con un grupo señalizador. El receptor libre lleva con especial preferencia un grupo señalizador directamente detectable. El kit de reactivos según la presente invención contiene además un receptor de fase sólida específico del analito que puede estar en forma inmovilizada sobre la zona de detección del analito o que lleva un grupo de unión de fase sólida inmovilizable sobre la zona de detección del analito, por ejemplo mediante una interacción de gran afinidad como la de estreptavidina/biotina. La fase sólida contenida en el kit de reactivos es preferiblemente un material poroso, sobre todo una tira de ensayo absorbente. Además el kit de reactivos puede contener sustancias supresoras cuya estructura es análoga a la del receptor libre.

A continuación la presente invención se explica en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos, que muestran:

Fig. 1 la representación esquemática de una tira de ensayo. La tira de ensayo contiene una hoja soporte resistente al agua (3), sobre la cual se ha aplicado un fieltro soporte con un reactivo marcado (1) y un fieltro soporte con un reactivo inmovilizado (2), así como un fieltro (4) para separar componentes sólidos de la muestra tales como los glóbulos rojos sanguíneos. Sobre la hoja soporte también hay aplicada una membrana soporte (5)

con una zona de señalización (6a) y una zona de control (6b). Por último el soporte lleva un fieltro absorbente (7). Los fieltros soporte (2, 1, 4, 5 y 7) están en contacto cromatográfico entre sí. Una muestra depositada sobre el fieltro (2) fluye a través de (1), (4) y (5) hacia el fieltro absorbente (7);

5 Fig. 2 la evolución de una capa de señalización sobre una tira de ensayo de dímero D que lleva un conjugado de anticuerpo-oro marcado con digoxigenina como reactivo de ensayo;

Fig. 3 la evolución de una capa de control de anti-anticuerpo de ratón sobre una tira de ensayo de dímero D, en función de la presencia de un anticuerpo monoclonal supresor (comparación);

10 Fig. 4 la evolución de una capa de control de anti-anticuerpo-digoxigenina sobre una tira de ensayo de dímero D, en función de la presencia de un anticuerpo monoclonal supresor (inversión).

15 Ejemplos

Ejemplo 1: derivatización de un anticuerpo monoclonal con digoxigenina activada

Se disuelven en tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 8,5, 10 mg de un anticuerpo monoclonal purificado anti-dímero D a una concentración de 10 mg/ml y se tempera a 25°C en baño de agua. Se añaden lentamente, agitando, 0,065 ml de una disolución de digoxigenina-3-O-metilcarbonil-ε-aminoácido-N-hidroxi-succinimida-éster (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en dimetilsulfóxido (1,052 mg/ml). La mezcla se incuba durante 90 min. a 25°C en agitación. Luego se amplía con hidrocloreuro de lisina hasta 10 mM, manteniendo el pH a 8,5. Después de 15 minutos más de incubación a 25°C el material fluido se dializa contra un volumen 5000 superior de tampón de fosfato potásico 30 mM, pH 7,6, cloruro sódico 100 mM.

25 Ejemplo 2: preparación de un reactivo de detección para un ensayo inmunológico rápido, inmovilizando sobre oro coloidal un anticuerpo monoclonal marcado con digoxigenina

Se temperan hasta temperatura ambiente 500 ml de oro coloidal de 20 nm de diámetro de partícula (densidad óptica 1,0 a 520 nm) y se filtran a través de nitrato de celulosa de 0,2 mm de tamaño de poro. El pH se ajusta a un valor de 7,6 añadiendo carbonato potásico.

30 Se añaden al filtrado 50 ml de una disolución del anticuerpo anti-dímero D marcado con digoxigenina (preparado como en el ejemplo 1) a una concentración de 0,1 mg/ml de tampón Tris/HCl (Tris/HCl 2 mM, pH 7,6, cloruro sódico 20 mM). Tras 30 minutos de incubación, agitando ligeramente, la mezcla se amplía con albúmina de suero bovino hasta 1% (p/v) y se agita 30 minutos más. Luego el material se concentra por ultrafiltración de flujo tangencial con un límite de exclusión de 30.000 Dalton, hasta que la densidad óptica (medida a 520 nm) es de 20. El conjugado de anticuerpo-oro se estabiliza añadiendo sacarosa hasta el 4% % (p/v) y azida sódica hasta el 0,095% (p/v).

40 Ejemplo 3: ensayo inmunológico rápido

a) Soporte de conjugado

45 Como soporte poroso para la impregnación con el conjugado de oro se usa un fieltro mixto formado por una fibra de éster mixto de DuPont, viscosilla y el reforzante Kuralon contra desgarro en húmedo según una relación en peso de 80:20:20. El fieltro se elabora de manera análoga a la descripción de la patente EP-A-0 326 135. El fieltro (absorción de líquido 30 μl/cm² aproximadamente) se impregna con una disolución que lleva 1 ml de la solución del anticuerpo marcado con digoxigenina y conjugado con oro del ejemplo 2 y 4 ml de tampón HEPES (HEPES 130 mM/hidróxido sódico, pH 7,5). A continuación se seca y se corta a una anchura de 18 mm.

50 b) Soporte de conjugado con anticuerpo biotinilado

Un segundo anticuerpo monoclonal purificado anti-dímero D con D-biotinoil-ε-ácido aminocaproico-N-hidroxi-succinimida-éster (Roche Molecular Biochemicals) se derivatiza con biotina análogamente al ejemplo 1.

55 Otro fieltro mixto como el descrito en 3a) se impregna con una disolución que lleva 10 μg/ml del segundo anticuerpo conjugado con biotina y 10 mg/ml de albúmina de suero bovino en tampón HEPES (HEPES 130 mM/hidróxido sódico, pH 7,5). A continuación se seca y se corta a una anchura de 20 mm.

60 c) Tiras de ensayo

Estos fieltros reactivos, es decir el fieltro de conjugado de oro (1) y el fieltro con anticuerpo biotinilado (2) se aplican sobre una hoja soporte (3) de tiras de ensayo según la fig. 1, formada por poliestireno (Melinex), mediante una capa de adhesivo termofusible. Para separar los glóbulos rojos sanguíneos se utiliza un fieltro de fibra de vidrio reforzado con 10 partes en peso de Kuralon (4). El fieltro se elabora de manera análoga a la descripción de la patente EP-B-0 239 002. El fieltro de fibra de vidrio tiene normalmente un gramaje de unos 180 g/cm², un grosor de unos 1,5 mm y

una absorción de aproximadamente 1.400 ml/m². El fieltro se impregna con un tampón de ácido 2-morfolinoetan-sulfónico 80 mM, pH 5,6, que lleva 0,2% en peso de albúmina de suero bovino y 0,1% en peso de n-octilglucósido. El fieltro secado se corta a una anchura de unos 12 mm. Sobre una membrana de nitrato de celulosa (5) (Sartorius SN 11301, 145 µm de grosor, 8 µm de diámetro de poro) se dosifica respectivamente con una aguja (0,16 mm de diámetro de cánula) una solución que contiene 4,5 mg/ml de (poli)estreptavidina (Roche Molecular Biochemicals) en agua destilada, para la formación de una capa de señalización (6a), y 5 mg/ml de anticuerpo policlonal de oveja anti-anticuerpo de ratón (PAK < Maus >, Roche Molecular Biochemicals) en agua destilada o 1 mg/ml de anticuerpo policlonal de oveja anti-digoxigenina (PAK<Dig>, Roche Molecular Biochemicals) en PBS, para la formación de una capa de control (6b). Las soluciones se aplican de manera que se forman unas capas (6a, 6b) de unos 0,5 mm de anchura. A continuación la membrana de nitrato de celulosa se corta según la dirección longitudinal de la capa a una anchura de 15 mm. Al extremo opuesto de la membrana se fija un "fieltro absorbente" (7). Como fieltro absorbente se emplea un fieltro de fibra de vidrio sin impregnar, reforzado con 5 partes en peso de Kuralon. La elaboración del fieltro es similar a la descrita en la patente EP-B-O 239 002. El fieltro tiene normalmente un gramaje de 180 g/cm² y un grosor de 1,5 mm. Para integrarlo en el soporte de ensayo se recorta a una anchura de 7 mm. El soporte de ensayo sellado se recorta luego en tiras de ensayo individuales de 6 mm de ancho.

d) Medición

La muestra (150 µl de sangre entera, plasma o similar) se deposita sobre los fieltros de conjugado y lo disuelve. El analito presente en la muestra forma complejos sándwich con ambos anticuerpos conjugados. Esta solución es transportada por fuerzas de capilaridad a través del fieltro de fibra de vidrio, donde se separan ocasionalmente los eritrocitos, y de la membrana hacia el fieltro absorbente. En la capa de (poli)estreptavidina se fijan los anticuerpos biotinilados y los complejos sándwich formados. Dependiendo de la concentración de complejos sándwich formados aparece una línea roja más o menos intensa debido al oro coloidal fijado. En la capa de control (PAK < ratón> o PAK < Dig >) se captura el exceso de conjugado de oro por fijación del anticuerpo monoclonal de ratón o de la marcación de digoxigenina. En esta posición también se puede reconocer por una coloración roja, en ausencia de analito, si el ensayo funciona correctamente. Tras 10 minutos de tiempo de reacción se mide la intensidad de las líneas con una cámara CCD. La fig. 2 muestra la evolución de la señal en función de la concentración de analito (Rem % = reflexión de la línea respecto a la membrana no coloreada a la derecha y a la izquierda de la línea).

Ejemplo 4: tiras de ensayo "depuradas con HAMA"

Para el fieltro de conjugado de biotina del ejemplo 3 se añaden cantidades crecientes de un anticuerpo monoclonal supresor HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) (Roche Molecular Biochemicals) a la receta de impregnación, para capturar los anticuerpos anti-ratón que pueda haber en la muestra analizada.

Las tiras de ensayo se preparan tal como está descrito en el ejemplo 3.

Tal como está descrito en el ejemplo 3 se mide una serie de concentraciones de soluciones que contienen analito.

La fig. 3 muestra la formación de la línea de control con el empleo de distintas cantidades de anticuerpo supresor PAK <Maus> (rel. Rem % = reflexión de la línea respecto a la membrana no coloreada a la derecha y a la izquierda de la línea). La intensidad de la línea disminuye claramente a mayor cantidad de anticuerpo supresor. La fig. 4 muestra la formación de la línea de control con el empleo de distintas cantidades de anticuerpo supresor PAK<Dig>. La cantidad de anticuerpo supresor no tiene ninguna influencia reconocible en la formación de la línea de control.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) preparación de una fase sólida que comprende una zona de detección del analito y una zona de control, de manera que la zona de detección del analito sirve para la determinación cuantitativa y/o cualitativa del analito contenido en la muestra y la zona de control para la comprobación de la funcionalidad del reactivo de ensayo;
- 10 (b) puesta en contacto de la fase sólida con la muestra y el reactivo de ensayo, el cual contiene un receptor libre específico del analito y al menos un elemento estructural heterólogo para una fijación específica a la zona de control, de manera que el elemento estructural heterólogo es independiente de las características del receptor que son específicas para el analito y se elige entre haptenos, péptidos de hasta 25 aminoácidos o biotina, y el receptor libre va unido al menos a un elemento estructural heterólogo, y
- 15 (c) determinación de la presencia y/o de la cantidad del analito en la muestra mediante la zona de detección y comprobación de la funcionalidad del ensayo, de modo que en la zona de control hay un receptor o componente de unión inmovilizado, que es específico para el elemento estructural heterólogo.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la zona de detección del analito lleva un receptor inmovilizado que es específico del analito.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el receptor libre lleva un grupo señalizador o un grupo capaz de unirse a un grupo señalizador.
- 25 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el grupo señalizador es del tipo detectable mediante métodos ópticos y se elige especialmente entre partículas metálicas, colorantes y fluorescentes, p.ej. partículas de látex y partículas de sílice.
- 30 5. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la fase sólida contiene un material poroso.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque la fase sólida está formada como tira de ensayo absorbente.
- 35 7. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la fase sólida tiene forma matricial.
8. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el elemento estructural heterólogo está unido por enlace covalente al receptor libre.
- 40 9. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el elemento estructural heterólogo para la zona de control se introduce en el receptor libre mediante una reacción de derivatización.
10. Método según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el receptor libre y el elemento estructural heterólogo están coinmovilizados sobre una partícula.
- 45 11. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el receptor libre comprende un componente de unión específico del analito.
- 50 12. Método según una de las anteriores reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el receptor libre incluye un análogo del analito.
13. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el receptor libre se elige entre péptidos, polipéptidos, glicoproteínas, lipoproteínas, ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos, sacáridos, polisacáridos y otras sustancias biológicas.
- 55 14. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el receptor libre se elige entre anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.
- 60 15. Método según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se usa un reactivo de ensayo que además contiene sustancias estructuralmente parecidas al receptor libre, pero que son específicas del analito.
16. Uso del método según una de las reivindicaciones anteriores para detectar analitos de interés diagnóstico en muestras biológicas.
- 65

17. Uso según la reivindicación 16 en un método de detección inmunológico o en un método de hibridación de ácidos nucleicos.
- 5 18. Kit de reactivos para detectar un analito en una muestra, que comprende
- (a) una fase sólida que comprende una zona de detección del analito y una zona de control, de manera que la zona de detección del analito sirve para la determinación cuantitativa y/o cualitativa de los analitos contenidos en la muestra y la zona de control para la comprobación de la funcionalidad del reactivo de ensayo, de manera que la zona de detección del analito contiene un receptor inmovilizado o inmovilizable específico del analito y en la zona de control hay un receptor o componente de unión inmovilizado que es específico del elemento estructural heterólogo;
- 10
- (b) un reactivo de ensayo que comprende un receptor libre específico del analito y es un anticuerpo, y al menos un elemento estructural heterólogo para una unión específica a la zona de control, el cual es independiente de las características del receptor que son específicas para el analito y el receptor libre está unido al menos a un elemento estructural heterólogo que se elige entre haptenos, péptidos de hasta 25 aminoácidos o biotina;
- 15
- (c) una sustancia no específica del analito que es un anticuerpo de la misma especie y/o de la misma clase de inmunoglobulinas que el receptor libre.
- 20
19. Kit de reactivos según la reivindicación 18, caracterizado porque el receptor libre lleva un grupo señalizador o un grupo capaz de unirse a un grupo señalizador.
- 25 20. Kit de reactivos según la reivindicación 18 o 19, caracterizado porque la fase sólida comprende un material poroso.
21. Empleo de un kit de reactivos según una de las reivindicaciones 18 a 20 en un método de detección de un analito.
- 30 22. Empleo según la reivindicación 21 en un método según una de las reivindicaciones 1 a 15.

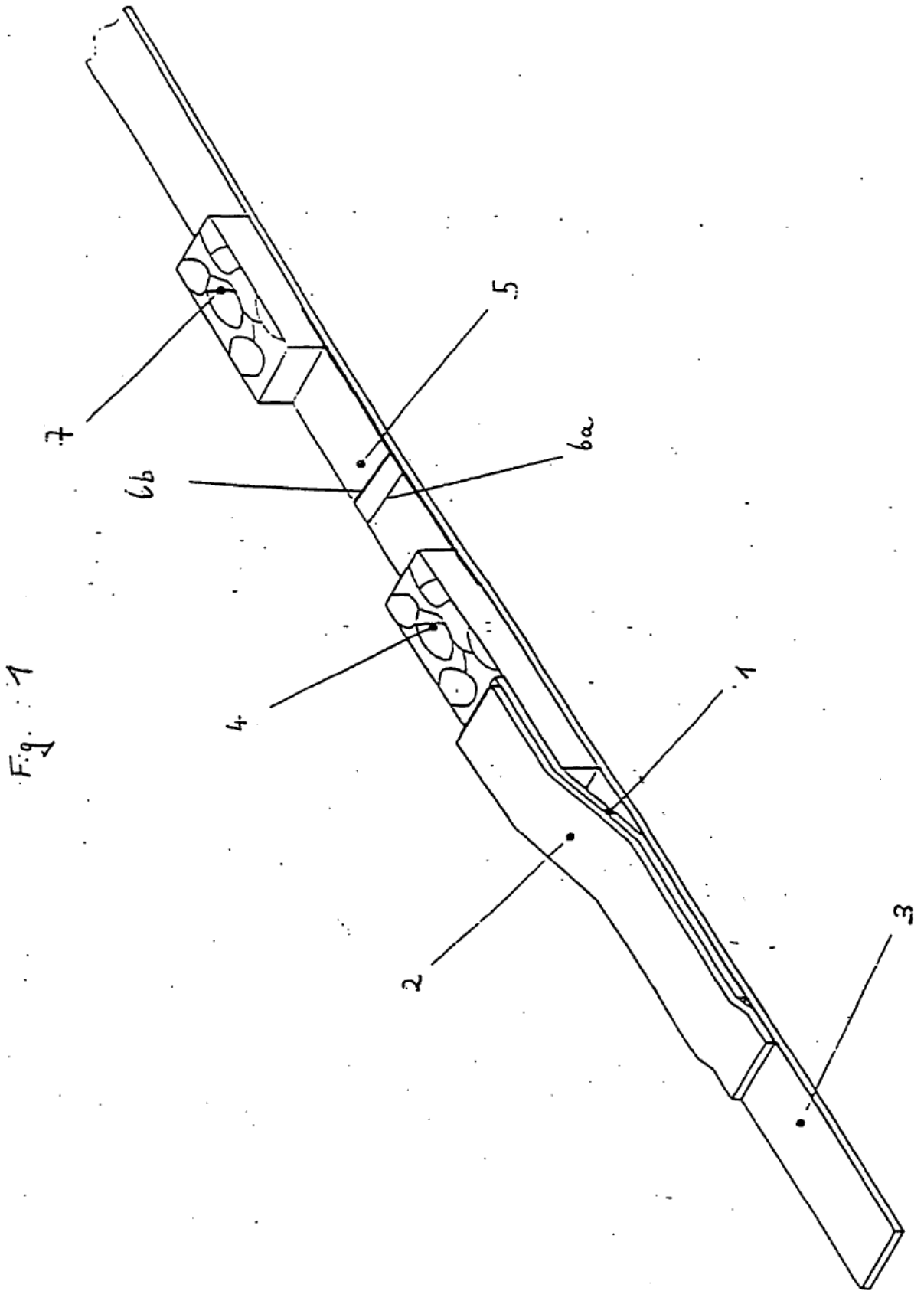


Fig. 1

Fig.2: tira de ensayo de dímero D con conjugado de anticuerpo-oro marcado con digoxigenina
Línea de señal

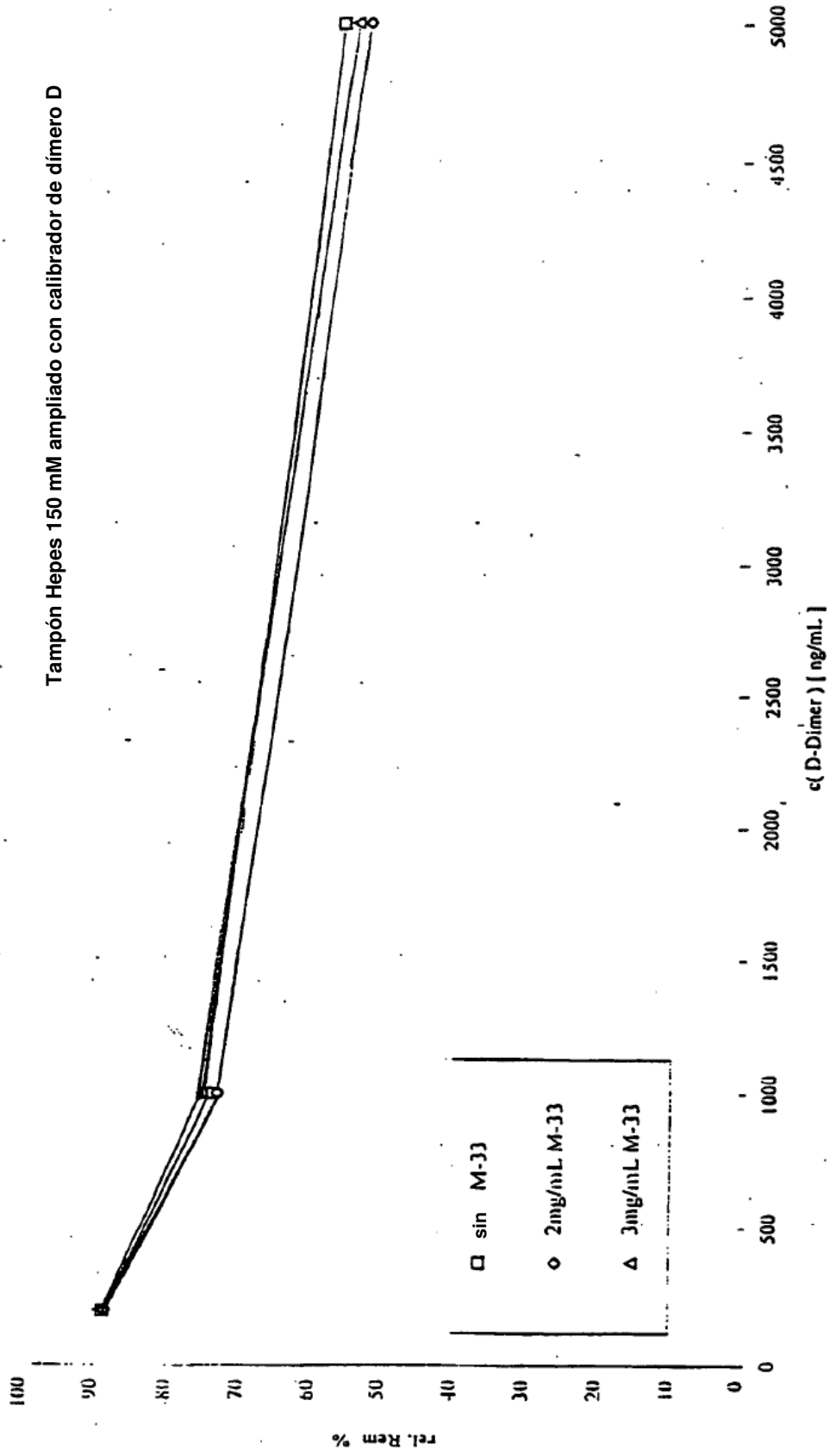


Fig. 3: influencia del anticuerpo supresor M 33 en las tiras de ensayo con conjugado de anticuerpo anti-dímero D-oro
 Línea de control PAK<ratón>

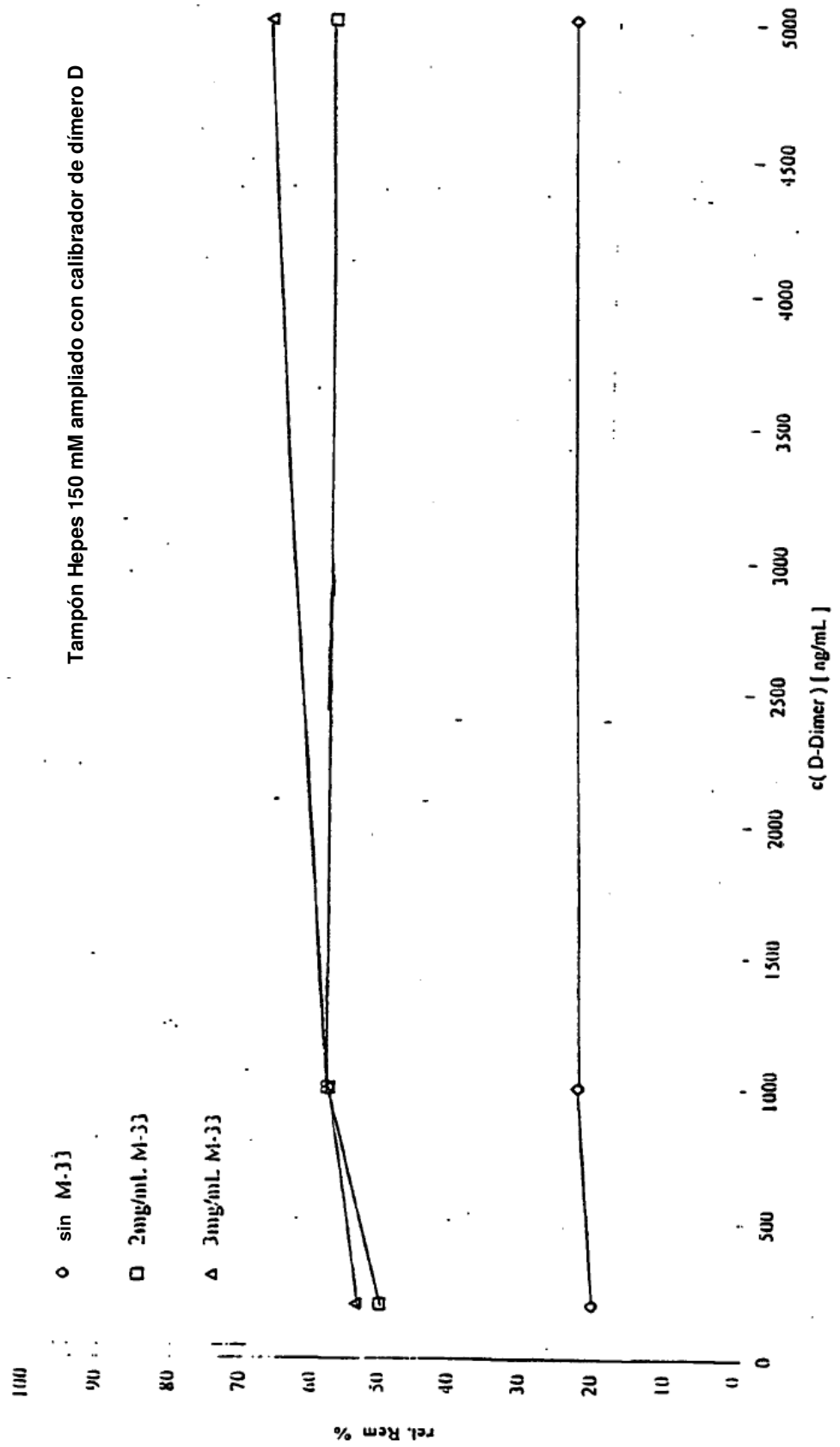


Fig. 4: influencia del anticuerpo supresor M 33 en las tiras de ensayo con conjugado de anticuerpo marcado con digoxigenina-oro
 Línea de control PAK<Dig>

