

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 420**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2003 E 10184768 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2014 EP 2290100**

54 Título: **Inmuno-PCR sándwich por desplazamiento**

30 Prioridad:

01.11.2002 US 423173 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2014

73 Titular/es:

**IRIS INTERNATIONAL, INC. (100.0%)
9172 Eton Avenue
Chatsworth, CA 91311, US**

72 Inventor/es:

**JABLONSKI, ED;
DRIVER, DAVID y
ADAMS, TOM**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

ES 2 463 420 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

ÁMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a kits para generar una señal en respuesta a un analito presente en una muestra. Específicamente, la invención se refiere a kits que emplean detección por amplificación de señal de un marcador de ácido nucleico. Esta invención también se refiere a kits para etiquetar anticuerpos u otras proteínas con ADN.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Existe un inmuno ensayo típico conocido como Ensayo Inmunoenzimático Enlazado a Enzimas (ELISA). El antígeno que va a ser detectado se elimina de la solución mediante una adsorción no específica a una superficie sólida, como por ejemplo el interior de un pocillo de placa de microtitulación. Después de lavar para eliminar el exceso de antígeno y bloquear los puntos restantes de la placa, el antígeno inmovilizado es contactado con un anticuerpo primario para formar un complejo inmune en el soporte sólido. El exceso de anticuerpo puede extraerse lavando la placa. El anticuerpo primario se detecta a través de una enzima, que puede conjugarse directamente al anticuerpo primario (ELISA directo) o a un segundo anti-anticuerpo, que posteriormente se pone en contacto con la placa (ELISA indirecto). La actividad enzimática asociada con la superficie sólida es proporcional a la cantidad de antígeno unido presente y puede medirse, por ejemplo utilizando un sustrato cromogénico para la enzima.

El Inmuno-PCR es similar al ELISA indirecto, pero utiliza una secuencia de ADN en lugar de una enzima como molécula de detección (ver, por ejemplo, Sano et al., *Science*, 1992, 258 : 120-22). Sano *et al.*, demostraron la eficacia de este método con un antígeno de albumina de suero bovino (BSA) y un anticuerpo primario anti-

BSA. El ADN plásmido biotinilado se acopló con el anticuerpo primario vía la proteína A-avidina. La amplificación del ADN asociado al antígeno por medio de 30 ciclos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) permitió la detestación mediante tinción con bromuro de etidio seguida de electroforesis de gel. Los autores informaron de una mejora en la sensibilidad de detección de aproximadamente cinco órdenes de magnitud en comparación con la detección de ELISA. En teoría, una etiqueta de ADN puede detectarse con una sensibilidad extraordinaria (potencialmente hasta una copia sencilla) cuando es amplificada mediante PCR o mediante cualquier otra técnica de amplificación de ácido nucleico exponencial. Sin embargo, la adición secuencial de cada componente del ensayo requiere un lavado extensivo con el fin de reducir el material unido no específicamente.

El Inmuno-PCR también puede realizarse en un formato de inmunoensayo en sándwich. Un inmunoensayo en sándwich típico utiliza dos anticuerpos que reconocen el antígeno que va a ser detectado. Se utiliza un anticuerpo de “captura” para revestir la superficie de un soporte sólido, como por ejemplo un pocillo, una gota o una partícula de microtítulo. Se etiqueta un anticuerpo “informador” con una molécula de detección, como por ejemplo un isótopo radioactivo, un fluoróforo o una enzima. En algunos casos, puede utilizarse el mismo anticuerpo tanto para la captura como para el informe. Habitualmente, el antígeno entra en contacto en primer lugar con el anticuerpo informador en solución o con el anticuerpo de captura en el soporte sólido, seguido de la adición del anticuerpo restante. El complejo inmune específico resultante se une a la superficie del soporte sólido y consiste en el antígeno combinado con dos anticuerpos. El antígeno y los anticuerpos sobrantes son eliminados lavando de forma repetida el soporte. Es de gran importancia mantener la integridad del complejo inmune inmovilizado durante la fase de lavado con el fin de maximizar la intensidad de la señal,

a la vez que se mejora la eliminación del anticuerpo informador no unido, minimizando de esta manera el fondo. Después de los lavados, el anticuerpo informador unido es medido a través de la molécula de detección, como indicación de la cantidad de antígeno presente.

El anticuerpo informador puede ser etiquetado directamente mediante una modificación covalente del anticuerpo, o indirectamente a través del enlace de un segundo anticuerpo o proteína que posea una etiqueta detectable. La adhesión indirecta puede conseguirse, por ejemplo, etiquetando el anticuerpo informado con biotina y adhiriendo la molécula de detección a la avidina. Cuando el sistema de detección es lo suficientemente sensible, el límite inferior del ensayo quedará determinado normalmente por el grado de fondo producido por el enlace no específico del anticuerpo informador no unido.

También se han indicado ejemplos de inmuno-PCR sándwich en la literatura (ver, por ejemplo, Joerger et al., *Clin Chem*, 1995,41: 1371-77; Hendrickson et al., *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 522-529). Los límites de detección para el formato de ensayo de Inmuno-PCR exceden los de los inmunoensayos de enzimas convencionales. Sin embargo, es necesario realizar una limpieza astringente, utilizando por ejemplo una solución detergente, para eliminar los anticuerpos informadores con etiqueta ADN no específicamente unidos.

EP 1 249 500 se refiere a un método para la detección de un analito, en que un soporte sólido se acopla con una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia complementaria se acopla a un anticuerpo por medio de una interacción de biotina-avidina utilizando una secuencia de ácido nucleico biotinilado y un anticuerpo adherido a la avidina. También explica la unión de un ácido nucleico

marcador detectable por PCR a un segundo anticuerpo de analito específico por medio de interacciones de biotina–avidina.

El formato de sándwich del Inmuno-PCR también ha sido utilizado para demostrar la detección de múltiples antígenos ("multiplexing") (*ver, por ejemplo*, U.S. Pat. No. 5,985,548). Las etiquetas de ADN de diferente longitud fueron adheridas cada una de ellas con anticuerpos informadores que reconocen diferentes antígenos que utilizan un éster de 5' N-hidroxisuccinimida (NHS). Los conjugados de ADN de anticuerpo informador – ADN se vincularon a un soporte sólido revestido con los diferentes antígenos. Las múltiples etiquetas de ADN fueron detectadas de forma simultánea en el ensayo en base a los tamaños de los productos de amplificación de PCR respectivos, que habían sido diseñados para permitir la resolución de cada uno de los otros por electroforesis de gel.

El Inmuno-PCR ofrece una mejora real en sensibilidad sobre los inmunoensayos actuales, pero presenta un gran número de oportunidades por lo que se refiere a generar fondo. El fondo puede generarse a partir del enlace no específico de cualquier componente, incluyendo el conjugado de anticuerpo–ADN informador, la proteína quimérica u otro componente de etiquetado secundario. Dado que las moléculas individuales de ácido nucleico pueden ser detectadas por el PCR, si se deja de eliminar todas las moléculas de ADN modelo no específicamente unidas, ello provoca un fondo significativo, e interfiere con la capacidad de detectar cantidades minúsculas de analito. Los lavados astringentes, numerosos o prolongados para reducir los productos no específicos han sido utilizados para reducir el fondo, pero pueden tener como resultado una señal reducida debido a la elución o la disociación de complejos de antígenos/anticuerpos. De la misma manera, el Inmuno-PCR está limitado por la ya conocida no-linealidad del PCR, que puede frustrar los intentos de evaluar las

cantidades proporcionadas de analito presentes. Estas diferencias prácticas han impedido que las técnicas de Inmuno-PCR consigan una aceptación y una utilidad globales en este campo.

Se ha sugerido una gran variedad de métodos para reducir el fondo en métodos tanto de inmunoensayo standard como de Inmuno-PCR. Ishikawa *et al.* (U. S. Pat. No. 5,888,834) han propuesto la técnica de inmunoensayo de transferencia de complejos inmunes, en la cual un complejo inmune sándwich es liberado del soporte de captura y recapturado sobre una superficie nueva. Los componentes informadores no específicamente unidos quedan en el soporte sólido inicial. La sensibilidad del ensayo de hibridación del ácido nucleico también ha experimentado una mejora, mediante la elución química del ADN hibridizado desde un soporte sólido, dejando atrás las sondas de ADN informador no específicamente unidas (*ver Morrissey, et al., Anal Biochem* 1989, 181: 345-359). El ADN objetivo fue hibridizado con una sonda de captura de cola dA y una sonda informadora etiquetada. *Id.* El complejo fue capturado en gotas paramagnéticas revestidas con oligo dT. *Id.* Después de lavarlo, el complejo fue liberado mediante elución con una solución de tiocianato de guanidinio y recapturado en un soporte nuevo revestido con poli dT. *Id.* Los complejos también han sido liberados mediante el uso de homopolímeros, como por ejemplo 200-400 mediante poli (rU), en combinación con el lavado en sales de tetraalquilamonio (Collins *et al.*, Patente No. US 5,702,896).

Desde un punto de vista conceptual, el Inmuno-PCR posee una sensibilidad teórica extraordinaria. Sin embargo, esta técnica no ha sido explotada comercialmente debido al problema de la etiqueta de ADN modelo no específicamente unido, que oscurece la señal del analito real. Ello lleva a la generación de resultados positivos falsos y a la irreproducibilidad cuando se intenta detectar los analitos presentes en

niveles bajos. Algunos investigadores han llegado a la conclusión de que el Inmuno-PCR no es más sensible que el ELISA a la hora de detectar IgG debido a la unión no específica (McKie, et al., J. Immunol. Meth., 2002, 261:167175). La destacable sensibilidad conseguida por Sano *et al.* quedó demostrada con un sistema puro que utilizaba un formato engorroso multi-fase, que resultaba poco práctico para aplicaciones médicas.

En el campo de los diagnósticos y las biociencias existe la necesidad de una prueba sólida que detecte los analitos presentes en niveles o concentraciones muy escasos. Esta necesidad será más patente a continuación de la secuenciación y el análisis del genoma humano. Este esfuerzo masivo de secuenciación ha tenido como resultado el descubrimiento de proteínas no descubiertas con anterioridad, que deben ser analizadas y caracterizadas. Muchas de estas proteínas pueden encontrarse presentes en cantidades no detectables por la tecnología actual. La promesa por parte del Inmuno-PCR de proporcionar métodos de alta sensibilidad para la detección de analitos solamente se ha cumplido en parte. De esta manera, existe una necesidad de proporcionar métodos para el Inmuno-PCR que tengan una alta sensibilidad y un fondo bajo.

RESUMEN DE LA INVENCION

En su sentido más amplio, la invención se refiere a kits tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

La descripción se refiere a un proceso por el cual un anticuerpo de captura para un inmunoensayo de sándwich es etiquetado con una molécula específica de ADN de doble hebra en que la hebra complementaria a la hebra fijada al anticuerpo de captura es modificada con un ligando de alta afinidad. La utilización del ligando permite que la

hebra de ADN complementaria quede fijada a un soporte sólido. A continuación, el anticuerpo de captura/ADN de doble hebra es inmovilizado en una fase sólida que comprende la proteína de la unión del ligando de alta afinidad correspondiente con el puente de ácido nucleico que enlaza el anticuerpo de captura a la fase sólida. En realizaciones preferentes, se utiliza un par de unión de biotina/avidina, pero también pueden emplearse otras combinaciones de ligandos y aglomerantes. La fase sólida puede servir como medio para capturar complejos inmunes de anticuerpos de antígenos o de informadores de antígenos. La hebra de ADN puede ser modificada con propiedades que permitan la liberación del complejo inmune del medio de captura con el fin de mejorar la sensibilidad de detección.

Aunque la invención se describe en el presente documento mediante la utilización como ejemplo de moléculas de ADN como un puente, ácidos nucleicos desplazadores y ácidos nucleicos marcadores, en otras realizaciones también pueden utilizarse ácidos nucleicos distintos del ADN, como por ejemplo ARN o ácido nucleico péptido (PNA) para una hebra, para ambas hebras o para partes de una o de ambas hebras.

Los kits de diagnóstico para realizar dichos métodos pueden construirse para que incluyan un primer contenedor que contenga el anticuerpo de captura enlazado a un soporte sólido con un puente de ácido nucleico; un segundo contenedor que contenga un conjugado del mismo anticuerpo o de un anticuerpo distinto, y una molécula de ADN marcador; y un tercer contenedor que comprende un ácido nucleico desplazador. El kit de diagnóstico también puede incluir una notificación de autorización de uso de FDA e instrucciones para ello. Una persona con conocimientos en la técnica puede reconocer con facilidad que los anticuerpos distintos a los descritos en la presente invención

pueden ser incorporados sin problemas a uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el estado de la técnica.

Esta descripción también se refiere al proceso de etiquetado de anticuerpos (u otras proteínas) con una molécula de ADN de una secuencia predeterminada. La molécula de ADN puede ser posteriormente detectada con gran sensibilidad por parte del PCR o de cualquier técnica de amplificación de ácido nucleico. Como alternativa, la molécula de ADN puede ser utilizada como puente para el anticuerpo o la proteína hacia un soporte sólido. La molécula de ADN puede ser adherida directamente al anticuerpo activando químicamente el ADN en primer lugar, y a continuación permitiendo que la molécula de ADN enlace con el anticuerpo. Una proteína que une el ligando también puede ser etiquetada con ADN activado químicamente, y a continuación permitir que forme un complejo con el anticuerpo informador derivado con el ligando correspondiente para la proteína de unión. De esta manera, el anticuerpo informador, el anticuerpo de captura u otra proteína pueden ser adheridos a una molécula de ADN mediante una unión covalente directa.

Los kits para llevar a cabo dichos métodos pueden estar constituidos para incluir un contenedor que contenga un ácido nucleico de una secuencia predeterminada activada para estar preparada para enlazar con una proteína seleccionada.

En un aspecto, la invención consiste en un kit para realizar inmunoensayos de detección de ácido nucleico que comprende moléculas de ADN activadas para etiquetar al informador y/o para capturar anticuerpos cuando el anticuerpo informador va a ser etiquetado con una hebra de un puente de ácido nucleico. El kit también comprende hebras complementarias a las moléculas de ADN mencionadas más arriba, en que el ADN complementario en parte o en su totalidad con la hebra de ADN del puente de

ácido nucleico mencionada anteriormente es biotinilado, y una hebra desplazadora que es complementaria en parte o en su totalidad a la hebra de ADN anteriormente mencionada del puente de ácido nucleico, pero que no es biotinilada. El kit también puede comprender cebador(es) de amplificación, micro-partículas paramagnéticas avidiniladas, amortiguadores de unión y lavado, reactivos de PCR, y un tinte para detectar el producto de amplificación, como por ejemplo Verde SYBR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: la Figura 1A muestra una secuencia de ADN, adherida a un anticuerpo, e hibridizada para la secuencia anclada al soporte sólido a través de una región hibridizada de 22 bases. La molécula desplazadora se hibridiza para anclar la secuencia en el soporte sólido mediante una estructura rica en GC de 7 bases y procede a desplazar la secuencia de captura a lo largo de las 20 bases siguientes, dejando un híbrido de AT en el extremo de unión del anticuerpo, que es inestable. La Figura 1B muestra un experimento en el cual, en lugar de un anticuerpo de captura, la fosfatasa alcalina se conjuga con una molécula de ácido nucleico, y a continuación sirve como puente hacia un soporte sólido. La Figura 1C muestra una primera captura, seguida de un desplazamiento, seguida de una recaptura.

Figura 2: Señal de fondo obtenida por el desplazamiento del complejo inmune de las micropartículas paramagnéticas.

Figura 3: Estabilidad del Híbrido de Captura/Anclaje. La Figura 3 muestra que el híbrido de captura/anclaje es estable bajo las condiciones de salinidad del amortiguador utilizado. El conjugado de anticuerpo/ADN biotinilado permanece unido al pocillo, así como los controles.

Figura 4: Desplazamiento y Concentración de sal de PNA. La Figura 4 muestra el efecto del desplazamiento de PNA en el conjugado de anticuerpo/ADN biotinilado unido. Con una resistencia iónica baja, el desplazamiento de PNA es muy efectivo, eliminando el anticuerpo en unos pocos minutos. No resulta tan eficaz con una concentración de sal alta.

Figura 5: Desplazamiento de ADN y Concentración de Sal. La Figura 5 muestra el desplazamiento por ADN. Resulta muy efectivo en una concentración de sal alta, e ineficaz en ausencia de sal.

Figura 6: La Figura 6 muestra el resultado de un experimento de PCR en tiempo real. La Figura 6A muestra la señal de fluorescencia en tiempo real obtenida a partir de una serie de diluciones standard de conjugados de anti-PSA rMAb-DNA. La Figura 6B muestra el umbral de ciclo como función del número inicial de moléculas de rMAb-DNA a partir de (A).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

El término “**analito**” tal como se utiliza en este documento se refiere a cualquier sustancia que pueda ser detectada en un ensayo, y que pueda encontrarse presente en una muestra. El analito puede ser, sin limitación, cualquier sustancia, y preferiblemente comprende una sustancia para la cual existe un anticuerpo que se produce de forma natural o para la cual puede prepararse un anticuerpo. El analito puede ser, por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un hapteno, un carbohidrato, un lípido, una célula o cualquier otra de una variedad de moléculas o complejos biológicos

o no biológicos, o una combinación de los mismos. En las realizaciones preferentes de la invención, los analitos no contienen ácidos nucleicos.

El término “**analito de ácido no nucleico**” se refiere en general a un analito que no contiene un ácido nucleico que interfiere con los métodos de detección de Inmuno-PCR de la invención. Los analitos de ácido no nucleico de la invención no consisten únicamente de moléculas de un ácido nucleico, y habitualmente, el analito de ácido no nucleico no contiene ácidos nucleicos. En realizaciones preferentes, un analito puede comprender un péptido, una proteína, un carbohidrato, un lípido, una célula o cualquier material antigénico. Los analitos de la invención pueden comprender un componente de ácido nucleico, pero la unión del analito que va a ser detectado no depende de la hibridación complementaria entre cualquier secuencia de ácido nucleico en el analito y una secuencia de ácido nucleico en el receptor proporcionado por la invención.

El término “**muestra**” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una parte alícuota de material, con frecuencia una solución acuosa o una suspensión acuosa derivada de material biológico. Las muestras que van a experimentar el ensayo para determinar la presencia de un analito mediante los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, células, tejidos, homogeneatos, lisatos, extractos y proteínas purificadas o parcialmente purificadas y otras moléculas biológicas y mezclas de las mismas. Los ejemplos sin limitación de las muestras que se utilizan típicamente en los métodos de la invención incluyen fluidos humanos y animales como por ejemplo, sangre, suero, plasma, fluido cerebro-espinal, esputos, limpieza bronquial, aspiraciones bronquiales, orina, fluidos linfáticos y diversas secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos sanguíneos, mielomas y similares; fluidos biológicos como sobrenadantes de cultivo de

células; especímenes de tejido que pueden estar o no estar fijados. Las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención variarán en función del formato del ensayo y de la naturaleza de los tejidos, células, extractos u otros materiales, especialmente materiales biológicos, que vayan a experimentar el ensayo. Los métodos para preparar extractos de proteínas a partir de las células o de muestras son bien conocidos en el sector, y pueden ser adaptados con facilidad para obtener una muestra que sea compatible con los métodos de la invención.

El término **“contactar”** tal como se utiliza en el presente documento se refiere en general a proporcionar acceso de un componente, reactivo, analito o muestra a otro. Por ejemplo, contactar puede implicar mezclar una solución que comprenda un receptor de ácido no nucleico con una muestra. La solución que comprende un componente, reactivo, analito o muestra puede comprender también otro componente o reactivo, como sulfóxido de dimetil (DMSO) o un detergente, que facilita la mezcla, la interacción, la absorción u otro fenómeno físico o químico que resulte ventajoso para el contacto entre componentes, reactivos, analitos y/o muestras. En una realización de la invención, contactar implica añadir una solución que comprende un receptor de ácido no nucleico a una muestra utilizando un aparato de distribución, como por ejemplo un dispositivo basado en una pipeta, o un dispositivo basado en una jeringa.

Los términos **“receptor de ácido no nucleico”** o **“receptor”** tal como se utilizan en el presente documento se refieren a una molécula de ácido no nucleico que es capaz de unir de forma específica otra molécula. En una realización, el receptor es un anticuerpo. En un aspecto preferente de esta realización, el receptor es un anticuerpo informador. En otras realizaciones de la invención, los receptores pueden incluir, sin limitación: moléculas de receptor biológico, como un receptor de insulina, ligandos para receptores, como la insulina, y otras moléculas biológicas que tienen afinidad por otra

molécula, como biotina o avidina. Los receptores de la presente invención no tienen que comprender una molécula que se produzca de forma completamente natural, sino que pueden consistir únicamente de una parte, fragmento o subunidad de una molécula que se produzca de forma natural, como por ejemplo el fragmento Fab de un anticuerpo. Los receptores pueden ser generados por cualquier método conocido en el estado de la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden encontrarse en un suero preparado a partir de un fluido ascítico o sobrenadante de cultivo de tejido de hibridoma, o pueden derivarse de un sistema de expresión recombinante, tal como es bien conocido en el estado de la técnica. Los fragmentos, partes o subunidades de, por ejemplo, un anticuerpo u otro receptor, pueden ser generados por medios químicos, enzimáticos u otros, produciendo moléculas, ya sean conocidas (por ejemplo, Fab, o Fab') o nuevas. La presente invención también contempla los receptores que pueden incluir moléculas recombinantes, quiméricas o híbridas, tales como los anticuerpos humanizados o primatizados, así como otras formas de anticuerpo que no se produzcan de forma natural. Las personas con conocimientos en el tema reconocerán que los ejemplos no limitadores que se proporcionan más arriba, y que describen diferentes formas de anticuerpos también pueden ser extendidos a otros receptores de manera que las formas recombinantes, quiméricas, híbridas, truncadas, etc. de receptores no de anticuerpo pueden ser utilizadas en los métodos de la presente invención.

Los “**anticuerpos policlonales**” son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno, o un derivado funcional antigénico de los mismos. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse animales huésped como conejos, ratones y cabras mediante la inyección de un antígeno o un conjugado portador de hapteno suplementado de forma opcional con adyuvantes.

Los “**anticuerpos monoclonales**”, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno determinado, y pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas de células continuas en cultivo. Entre ellas se incluyen, sin limitación, la técnica de hibridoma de Köhler y Milstein, *Nature*, 256:495-7 (1975); y Patente No. US 4,376,110), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor, et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-30 (1983)), y la técnica del hibridoma EBV (Cole, et al., en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 77-96 (1985)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier otra subclase de los mismos. El hibridoma que produce el mAb de esta invención puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos altos de mAbs *in vivo* lo convierte en un método de producción preferido en la actualidad.

Asimismo, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de “**anticuerpos quiméricos**” (Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); Takeda, et al., *Nature*, 314:452-54 (1985)) empalmando los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de la especificidad de molécula de anticuerpo apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de la actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente No. US 4,946,778; Bird, *Science* 242:423-26 (1988); Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-83 (1988); y Ward, et al.,

Nature, 334:544-46 (1989)) para producir anticuerpos de gen de una sola cadena. Habitualmente, los anticuerpos de una sola cadena se forman enlazando los fragmentos de cadena pesados y ligeros de la región Fv vía un puente de aminoácido, lo cual tiene como resultado un polipéptido de una sola cadena.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítomos específicos pueden ser generados mediante técnicas ya conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen sin limitación: los fragmentos de $F(ab')_2$ que pueden ser producidos por digestión de pepsina de la molécula del anticuerpo y los fragmentos de Fab que pueden ser generados reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos de $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden crearse estudios de expresión de Fab (Huse, et al., Science, 246: 1275-81 (1989)) para permitir una identificación rápida y sencilla de los fragmentos de Fab monoclonal con la especificidad deseada.

Mediante los términos **“unir específicamente”** y **“unión específica”** tal como se utilizan en el presente documento, se indica que un anticuerpo u otra molécula, especialmente un receptor de la invención, se une con un objetivo, como por ejemplo un antígeno, un ligando o un analito, con mayor afinidad que cuando se une con otras moléculas bajo las condiciones especificadas de la presente invención. Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, tal como se conocen en el estado de la técnica, son moléculas polipéptidas que contienen regiones que pueden unir otras moléculas, como por ejemplo antígenos. En diferentes realizaciones de la invención, **“unir específicamente”** puede significar que un anticuerpo u otra molécula biológica se une a una molécula objetivo con una afinidad por lo menos 10^6 veces superior aproximadamente, preferiblemente una afinidad 10^7 veces superior aproximadamente, más preferiblemente una afinidad aproximadamente 10^8 veces superior, y todavía más preferiblemente una afinidad 10^9 veces superior de la que enlaza moléculas no

relacionadas con la molécula objetivo. Habitualmente, la unión específica se refiere a afinidades en torno a entre 10^6 y 10^9 veces superiores a la unión no específica. En algunas realizaciones, la unión específica puede caracterizarse por afinidades 10^9 veces superiores a la unión no específica.

Los términos **“polinucleótido”** y **“(molécula de) ácido nucleico”** se utilizan de manera intercambiable para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura en tres dimensiones, y pueden realizar cualquier función, conocida o no conocida. El término **“polinucleótido”** incluye moléculas de hebra sencilla o doble y de triple hélice. **“Oligonucleótido”** se refiere a polinucleótidos de entre 5 y aproximadamente 100 nucleótidos de ácido nucleico de hebra sencilla o doble, habitualmente ADN. Los oligonucleótidos también se conocen como oligómeros u oligos, y pueden ser aislados de los genes o sintetizados químicamente a través de métodos conocidos en el estado de la técnica. Un **“cebador”** se refiere a un oligonucleótido, normalmente de hebra sencilla, que proporciona un extremo de hidroxil 3' para la iniciación de la síntesis de ácido nucleico mediante enzima. A continuación se indican una serie de realizaciones de polinucleótidos, sin limitación: un gen o un fragmento de gen, exones, intrones, mRNA, tARN, rARN, ribozimas, cADN, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos con ramificaciones, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas y cebadores de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas, como por ejemplo moléculas de ácido nucleico metilado y análogos de moléculas de ácido nucleico. Los análogos de purinas y pirimidinas son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, sin limitación, aciridinicitosina, 4-

acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracil, 5-carboximetil-aminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, pseudouracilo, 5-pentilniluracilo y 2,6-diaminopurina. La utilización de uracilo como sustancia para timina en un ácido desoxirribonucleico también se considera como una forma análoga de pirimidina.

El término “**marcador de ácido nucleico**” se refiere a una molécula de ácido nucleico que producirá un producto de detección de un tamaño previsto u otras características seleccionadas cuando se utilice con cebadores de oligonucleótidos debidamente designados en una reacción de amplificación de ácido nucleico, como por ejemplo una reacción de PCR. Los expertos en la materia estarán familiarizados con el diseño de cebadores de oligonucleótidos adecuados para PCR, y en Internet se encuentran disponibles programas para facilitar este aspecto de la invención (*ver*, por ejemplo, la página [http: bibiserv.techfak.unibielefeld.de/ genefisher](http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher)). Un marcador de ácido nucleico puede ser lineal o circular. En realizaciones preferentes el marcador de ácido nucleico comprenderá una secuencia de ácido nucleico lineal predeterminada con puntos de unión para cebadores seleccionados localizados en cada uno de los extremos, o cerca de los mismos. En una molécula de ácido nucleico de ADN circular, los cebadores se encontrarán en el interior, más que en los extremos, y puede utilizarse un cebador sencillo, por ejemplo, para Amplificación de Círculo Giratorio. El ADN amplificado puede ser detectado utilizando cualquier método disponible, incluyendo, sin limitación, técnicas como PCR en tiempo real, tinción en Verde SYBR o tinción con bromuro de etidio. En otras realizaciones de la invención, los puntos de unión para los cebadores de amplificación rodean una secuencia de ADN no definida de una longitud

definida o que comprende otra característica identificable, como por ejemplo una secuencia detectable, además de secuencias no definidas. En algunas realizaciones, los marcadores de ácido nucleico se distinguen por el tamaño o la masa de las secuencias amplificadas, de esta manera la secuencia de ADN entre los cebadores no necesita ser definida en relación con la secuencia exacta, sino únicamente por lo que se refiere al número de bases. Como alternativa, no es necesario definir el tamaño y/o la secuencia de todo el marcador de ácido nucleico siempre que se proporcione un punto de unión para un modelo molecular (ver más abajo). En otras realizaciones, la secuencia de ADN localizada entre los puntos de unión del cebador comprende una “secuencia de identificación característica” capaz de ser detectada durante la reacción de PCR. La generación de señal fluorescente puede, por ejemplo, ser de secuencia específica (Modelos Moleculares, Taq Man, cebadores fluorogénicos, como por ejemplo los cebadores LUX (Invitrogen (Carlsbad, CA.)) o dependientes de la masa (Verde SYBR, Bromuro de Etidio). Los ejemplos proporcionados no tienen como objetivo ser una lista exhaustiva de posibles esquemas de detección de ácido nucleico, ya que aquellas personas expertas en el tema tendrán conocimiento de los marcadores alternativos adecuados para su utilización en los métodos de la presente invención.

El término “**secuencia de identificación característica**” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que puede ser detectada específicamente por medio de la hibridación a oligonucleótido u otro ácido nucleico que ha sido etiquetado con un marcador detectable como por ejemplo un radioisótopo, una tintura (como por ejemplo una tintura fluorescente), u otras especies que son conocidas en el estado de la técnica. En realizaciones preferentes, la secuencia de identificación característica es capaz de unir una sonda de “modelo molecular”. El término “**modelo molecular**” se refiere a oligonucleótidos como los que comercializan Operon Technologies (Alameda, CA) y

Synthetic Genetics (San Diego, CA). (Ver también, Tyagi and Kramer, Nat Biotechnol, 1996,14 : 303-308; y Tyagi et al., Nat Biotechnol, 2000,18 : 1191-96.). Tal como se ha indicado en el presente documento, puede generarse una señal utilizando una variedad de técnicas y reactivos.

El término **“complejo informador dependiente de analito”** se refiere al complejo formado por un receptor que ha sido etiquetado con un marcador de ácido nucleico y unido a un analito de ácido no nucleico. En una realización preferente, el complejo es específico, estable y tiene un alto grado de especificidad.

El término **“soporte sólido”** se refiere a cualquier fase sólida que pueda utilizarse para inmovilizar, por ejemplo, un analito, un anticuerpo o un complejo. Los soportes sólidos adecuados serán bien conocidos en el estado de la técnica, e incluyen las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, como por ejemplo una placa de microtitulación, las paredes de tubos de ensayo, gotas de poliestireno, gotas paramagnéticas o no magnéticas, membranas de nitrocelulosa, membranas de nylon, micropartículas como por ejemplo partículas de látex, y células de glóbulos rojos de oveja (o de otro animal). Los materiales habituales para los soportes sólidos incluyen, sin limitación, cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno, celulosa, nylon, látex y derivados de los mismos. Asimismo, el soporte sólido puede ser recubierto, derivado o modificado de alguna otra forma para facilitar la adhesión de las moléculas deseadas (por ejemplo, analitos) y/o para impedir en unión no deseada u otras interacciones no deseadas. Normalmente, la elección de una “fase sólida” específica no resulta crítica, y puede ser seleccionada por una persona con conocimientos en la materia, en función del ensayo empleado. De esta manera, las partículas de látex, las micropartículas, las gotas paramagnéticas o no magnéticas, las membranas, los tubos de plástico, las paredes de los pocillos de microtitulación, los chips de cristal o de silicona, y las células de

glóbulos rojos son todos ellos soportes sólidos adecuados. El soporte sólido puede ser seleccionado de manera conveniente con el fin de abarcar diferentes métodos de detección. Por ejemplo, pueden utilizarse placas de 96 o de 384 pocillos para ensayos que serán realizados de forma automatizada, por ejemplo por estaciones de trabajo robóticas y/o aquellos que serán detectados utilizando, por ejemplo, un lector de placas. Para aquellos métodos de la presente invención que pueden implicar una fase de detección autoradiográfica o quimiluminiscente utilizando una visualización basada en una película, el soporte sólido puede ser una membrana fina, como por ejemplo una membrana de nitrocelulosa o nylon. De acuerdo con una realización de la invención en la cual se realizan inmunoensayos en sándwich, normalmente se emplean las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción. En realizaciones alternativas de la presente invención pueden utilizarse gotas paramagnéticas como soporte sólido. Los métodos adecuados para inmovilizar moléculas en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrofóbicas o covalentes y similares, así como combinaciones de las mismas. Sin embargo, normalmente el método de inmovilización no es importante, y puede implicar mecanismos de adsorción no caracterizados. De esta manera, un “soporte sólido” tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a cualquier material que es no soluble, o que puede convertirse en no soluble mediante una reacción posterior. El soporte sólido puede ser elegido por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar un reactivo de captura. Como alternativa, la fase sólida puede retener un receptor adicional que tenga la capacidad de atraer e inmovilizar un reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia que esté cargada de forma opuesta en relación con el propio reactivo de captura, o con una sustancia cargada conjugada al reactivo de captura. En otra realización de la invención, una molécula de receptor adicional puede ser cualquier miembro de una unión específica que esté inmovilizado en (adherido a) la

fase sólida, y que tenga la capacidad de inmovilizar un reactivo de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula de receptor adicional permite la inmovilización indirecta del reactivo de captura a una fase sólida antes o durante la realización del ensayo. De esta manera, la fase sólida puede ser un plástico, un plástico derivado, un metal paramagnético o no magnético, la superficie de cristal o silicona de un tubo de ensayo, un pocillo de microtitulación, una lámina, una gota, una micropartícula, un chip u otras configuraciones conocidas para aquellas personas que tienen conocimientos ordinarios sobre la materia.

El término “**puente de ácido nucleico**” se refiere a una fracción de ácido nucleico parcial o totalmente de doble hebra que funciona para conectar los receptores de ácido no nucleico de la invención con un soporte sólido. Habitualmente, el puente de ácido nucleico consta de dos moléculas de ácido nucleico, una de las cuales está adherida a un soporte sólido de la invención, mientras que la otra está adherida al receptor de ácido no nucleico. Estas dos moléculas de ácido nucleico se hibridizan entre sí por sus regiones complementarias, conectando de esta manera el receptor de ácido no nucleico al soporte sólido. En algunas realizaciones de la invención, el ADN se utiliza como puente de ácido nucleico. En otras realizaciones, pueden utilizarse ácidos nucleicos distintos del ADN, como ARN o ácido nucleico péptido (PNA), para una hebra, para ambas hebras o para partes de una o de ambas hebras. En realizaciones preferentes de la presente invención, la parte de doble hebra del puente de ácido nucleico es completamente complementaria. Sin embargo, en otras realizaciones, la parte de doble hebra del puente de ácido nucleico es sustancialmente complementaria. Mediante el término “**sustancialmente complementario**” se indica que dos secuencias de ácido nucleico tienen por lo menos aproximadamente un 80% o más de complementariedad de ácido nucleico, preferiblemente por lo menos un 90% o más de

complementariedad de ácido nucleico, más preferiblemente por lo menos un 95% o más de complementariedad de ácido nucleico, y lo más preferible es que tenga por lo menos un 99% o más de complementariedad de ácido nucleico. La complementariedad describe la capacidad de las bases de nucleótido de una hebra de ácido nucleico para unirse a una base opuesta en otra hebra de ácido nucleico. Tal como es bien conocido en el estado de la técnica, las bases de adenina del ADN se unen con timidina, mientras que la citosina y la guanina forman un par complementario. La complementariedad se mide dividiendo el número de pares de bases complementarias en dos secuencias de ácido nucleico por el número total de bases y multiplicando el producto por 100. De esta manera, los complementos exactos presentan un 100% de complementariedad a lo largo de toda su longitud, mientras que las secuencias que son menos similares y tienen, por ejemplo, bases sin encajar, poseen un grado de complementariedad más bajo. En realizaciones habituales de esta invención, la complementariedad es suficiente para mantener la unión de doble hebra del puente de ácido nucleico antes de la utilización del ácido nucleico desplazador, bajo las condiciones empleadas.

En realizaciones preferentes, la hebra del puente de ácido nucleico adherida al receptor de ácido no nucleico se une de forma covalente mediante un grupo de enlace en su extremo 5'. En realizaciones preferentes, la hebra del puente de ácido nucleico adherida al soporte sólido es adherida al mismo mediante un puente de biotina/avidina en que la biotina es adherida de forma covalente al extremo 5' de esta molécula de puente de ácido nucleico, y la biotina se une a un receptor de biotina como la avidina, adherida al soporte sólido. En realizaciones preferentes, el puente de ácido nucleico adherido al soporte sólido es adherido de forma covalente al soporte sólido mediante un grupo de enlace en el extremo 5' de la molécula de ácido nucleico. En otras realizaciones preferentes, la secuencia de la molécula de ácido nucleico adherida al

soporte sólido se selecciona a partir del grupo formado por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:7. En otras realizaciones, la hebra parcialmente complementaria que está adherida a un receptor de ácido no nucleico de captura (o de una enzima informadora, como la fosfatasa alcalina) se selecciona a partir del grupo formado por SEQ ID NO:2, y SEQ ID NO:5. En realizaciones adicionales, el receptor de ácido no nucleico es un anticuerpo. Estas realizaciones son únicamente a modo de ejemplo, y pueden utilizarse otras secuencias de ácido nucleico, tal como resultará aparente para una persona con conocimientos en la materia. Asimismo, pueden utilizarse otros medios para adherir el puente de ácido nucleico al soporte sólido.

El término “**detectar**” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier método para verificar la presencia de una molécula determinada. Las técnicas utilizadas para conseguirlo pueden incluir, sin limitación, PCR, secuenciación, secuenciación de PCR, tecnología de modelo molecular, hibridación e hibridación seguida de PCR. Los ejemplos de reactivos que pueden ser utilizados para la detección incluyen, sin limitación sondas radioetiquetadas, sondas etiquetadas enzimáticas (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), y sondas etiquetadas de afinidad (biotina, avidina, o estreptavidina).

El término “**eluido**” o “**eluir**” se refiere a extraer, disociar o eliminar un material unido o adsorbido de un adsorbente por medio de una molécula, búfer o solvente de forma controlada. En una realización, la elución utiliza una molécula seleccionada para evitar, disociar o desestabilizar el enlace con el soporte sólido sin cambiar de forma significativa el amortiguador u otras condiciones. En un aspecto de esta realización, la molécula seleccionada compite con el material unido o adsorbido para unirse con el adsorbente. En una realización preferente, la molécula seleccionada es una molécula de ácido nucleico que comprende una región de complementariedad de

secuencia con la hebra de ácido nucleico de un puente de ácido nucleico de doble hebra adherido al soporte sólido. En otras realizaciones, la elución puede conseguirse utilizando enzimas o endonucleasas de restricción, que son ampliamente conocidas en el estado de la técnica. Los ejemplos de enzimas de restricción conocidas incluyen, sin limitación Eco RI, Hind III y Nco I.

El término **“ácido nucleico desplazador”** se refiere a un ácido nucleico de una secuencia predeterminada que se utiliza para eluir un complejo informador dependiente del analito de un soporte sólido. En realizaciones preferentes de la invención, la secuencia se selecciona a partir del grupo que consta de SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:6.

En una realización de la invención, el ácido nucleico desplazador es una molécula de ADN. En otras realizaciones, el ácido nucleico desplazador es una molécula de ARN. En otras realizaciones distintas, el ácido nucleico desplazador es una molécula de PNA. En otras realizaciones el ácido nucleico desplazador es una molécula de fosforotioato.

El término **“composición de replicación de ácido nucleico”** se refiere a composiciones que proporcionan un medio para replicar una secuencia de ácido nucleico. Habitualmente, la composición consistirá en dichos componentes como amortiguador, sales, cofactores, enzimas, cebadores y/u otros reactivos necesarios para replicar un ácido nucleico. La replicación puede ser por cualquier medio disponible para replicar la secuencia de ácido nucleico objetivo, y el experto en la materia reconocerá que se halla disponible una amplia variedad de métodos. En realizaciones preferentes de la invención, el medio para replicar el ADN es la reacción en cadena de polimerasa (ver, por ejemplo Sambrook and Russell, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd

ed., 2001). En otras realizaciones no limitadoras de la invención, la amplificación se lleva a cabo por medio de las técnicas de (1) amplificación isotérmica del ADN (*ver, por ejemplo*, Solicitud Internacional de PCT No. WO 00/41524); (2) Amplificación de Desplazamiento de Hebra de una Sola Temperatura (SDA) (*ver, por ejemplo.*, Patente No. US 5,270,184); (3) Amplificación por Medio de Transcripción (TMA) (Patente No. US 5,766,849); o Reacción en Cadena de Ligasa (LCR) (*ver, por ejemplo*, Wu & Wallace, 1989, Genomics 4:560).

El término **“hapteno”** tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un determinante antigénico con poca proteína o sin proteína que es capaz de ser reconocido por un anticuerpo. Habitualmente, los haptenos no consiguen la formación de anticuerpos en un animal, a menos que forme parte de una especie mayor. Por ejemplos, los haptenos de péptidos pequeños a menudo se acoplan a una proteína transportadora como por ejemplo la hemocianina de lapa californiana para generar una respuesta de anticuerpo anti-hapteno. Los **“antígenos”** son macromoléculas capaces de generar una respuesta de anticuerpo en un animal y ser reconocidas por el anticuerpo resultante. Tanto los antígenos como los haptenos comprenden por lo menos un determinante antigénico o **“epítipo”**, que es la región del antígeno o hapteno que se une al anticuerpo. Habitualmente, el epítipo de un hapteno es toda la molécula.

“Péptido” se refiere generalmente a una cadena corta de aminoácidos enlazados por uniones de péptidos. Habitualmente, los péptidos comprenden cadenas de aminoácidos de unos 2 a 100 aminoácidos, más típicamente entre 4 y 50 aminoácidos, y lo más común, entre 6 y 20 aminoácidos. **“Polipéptido”** se refiere generalmente a las secuencias de aminoácidos individuales rectas o de cadena con ramificaciones que habitualmente son más largas que los péptidos. **“Polipéptidos”** comprende habitualmente por lo menos entre 100 y 1000 aminoácidos de longitud, más

habitualmente por lo menos entre unos 150 y 600 aminoácidos, y con frecuencia por lo menos entre unos 200 y 500 aminoácidos. Las **“proteínas”** incluyen polipéptidos simples, así como complejos de cadenas múltiples de polipéptidos, que pueden ser el mismo o uno distinto. Las cadenas múltiples en una proteína pueden estar caracterizadas por estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, así como la estructura de la secuencia primaria de aminoácido, y pueden estar adheridas, por ejemplo, por uniones de disulfuro, y pueden incluir modificaciones post-sintéticas, como por ejemplo, sin limitación, glicosilación, fosforilación, truncamientos u otros procesos. Los anticuerpos como las proteínas de IgG, por ejemplo, consisten habitualmente en cuatro cadenas de polipéptidos (es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) que están unidas por uniones de disulfuro. Asimismo, las proteínas pueden incluir componentes adicionales, como por ejemplo metales asociados (por ejemplo, hierro, cobre y azufre), u otras fracciones. Las definiciones de péptidos, polipéptidos y proteínas incluyen, sin limitación, formas biológicamente activas o no activas, formas naturales y desnaturalizadas, así como variantes, y formas modificadas, truncadas, híbridas y quiméricas de las mismas. Los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención pueden ser derivados de cualquier fuente o por medio de cualquier método, incluyendo, sin limitación, la extracción de tejidos producidos de forma natural u otros materiales; producción recombinante en organismos huésped, como por ejemplo células de bacterias, hongos, plantas, insectos o animales; y síntesis química utilizando métodos que serán bien conocidos por un experto en la materia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término **“distinguible”** se refiere a una capacidad de distinguir experimentalmente entre los dos marcadores o especies diferentes. En realizaciones en las cuales se utiliza un ensayo para detectar múltiples analitos, ninguna de las moléculas marcadoras de ADN consistirá en

secuencias idénticas tanto en longitud como en secuencia. Dos marcadores pueden comprender la misma secuencia nuclear, pero los marcadores podrán distinguirse en función del tamaño y/o de las secuencias diferentes. En realizaciones preferentes, los productos PCR serán de una longitud distinta. En otras realizaciones, los marcadores tendrán secuencias que se unen con sondas específicas de secuencia diferente.

El término “**conjugado**” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a dos moléculas que han sido adheridas de forma covalente, o enlazadas de alguna otra forma. En una realización, un conjugado de ácido nucleico se genera enlazando de forma covalente el ácido nucleico con un polipéptido. En una realización preferente de la invención, un receptor de ácido no nucleico, como el que se utiliza en este caso, y un polipéptido, se unen de forma covalente a través de un grupo de enlace para formar un conjugado.

Un “**kit**” para detectar la presencia de un analito seleccionado en una muestra por los métodos de la invención comprende por lo menos un medio contenedor donde se ha dispuesto el anticuerpo enlazado con el soporte sólido del kit por parte de un puente de ácido nucleico. El kit también puede comprender un medio contenedor donde se ha dispuesto el anticuerpo informador, o un medio contenedor donde se ha dispuesto el ácido nucleico desplazador. El kit puede comprender también otros contenedores que comprendan uno o más de los siguientes elementos: reactivos de lavado, reactivos capaces de amplificar los reactivos de sonda de ácido nucleico unido, y agentes capaces de detectar la presencia de sondas de ácido nucleico unido después de la amplificación. Preferiblemente, el kit también comprende instrucciones de uso. El kit, si va a ser utilizado para uso diagnóstico, también puede incluir la notificación de aprobación de uso de FDA e instrucciones para ello.

Específicamente, un kit compartimentado incluye cualquier kit en el cual los reactivos están contenidos en contenedores separados. Dichos contenedores incluyen pequeños contenedores de cristal, contenedores de plástico o tiras de plástico o papel. Dichos contenedores permiten la transferencia efectiva de reactivos de un compartimento a otro compartimento de manera que las muestras y los reactivos no experimentan contaminación cruzada, y los agentes o soluciones de cada contenedor pueden ser añadidos de forma cuantitativa de un compartimento a otro. Dichos contenedores incluirán un contenedor que aceptará la muestra de prueba, un contenedor que contiene la sonda o los cebadores utilizados en el ensayo, contenedores que contienen reactivos de lavado (como por ejemplo una solución salina amortiguadora de fosfatos, amortiguadores Tris, y similares), y contenedores que contienen los reactivos utilizados para detectar el ácido nucleico marcador, el producto amplificado o similares. Una persona experta en la materia reconocerá sin problemas que los anticuerpos etiquetados con moléculas de ácido nucleico descritas en la presente invención pueden ser incorporadas sin problemas en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el estado de la técnica.

Un kit para acoplar el ADN con un anticuerpo u otra proteína por el método de la invención comprende por lo menos un medio contenedor donde se ha dispuesto el ADN activado liofilizado. El kit puede comprender también otros contenedores que comprendan uno o más de los siguientes elementos: reactivos de lavado y agentes capaces de detectar la presencia de sondas de ácido nucleico después de la reacción. Preferiblemente, el kit también comprende instrucciones de uso. Una persona experta en la materia reconocerá sin problemas que los ácidos nucleicos activados descritos en la presente invención pueden ser incorporados sin problemas en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en el estado de la técnica.

Inmuno-PCR Sándwich por Desplazamiento

La presente descripción proporciona métodos para detectar analitos de interés en diferentes campos, incluyendo el diagnóstico clínico y las ciencias biológicas. El método de Inmuno-PCR Sándwich por Desplazamiento del presente documento utiliza un anticuerpo informador directamente etiquetado con 1 o 2 moléculas de oligonucleótido que utilizan química de reticulado de proteínas. Las 1 o 2 moléculas de oligonucleótidos adheridas al anticuerpo informador pueden ser de hebra sencilla o de hebra doble. La descripción también se refiere al proceso de detección de un antígeno (Ag) en una muestra utilizando uno o más anticuerpos etiquetados. La descripción también se refiere a un proceso por el cual un anticuerpo de captura o un anticuerpo informador, u otra proteína, es etiquetado con una secuencia de ADN específica.

De acuerdo con un método de la descripción, un analito de ácido nucleico presente en la muestra es detectado mediante:

(i) contactar una muestra que comprenda un analito de ácido nucleico con un conjugado informador, en que el conjugado informador comprende un primer receptor capaz de unir de forma específica el analito, y un marcador de ácido nucleico;

(ii) permitir la unión del analito al conjugado informador, formando de esta manera un complejo informador dependiente del analito;

(iii) contactar el complejo informador dependiente del analito con un segundo receptor para el analito, en que el segundo receptor es adherido a un soporte sólido a través de un puente de ácido nucleico de una secuencia predeterminada;

(iv) permitir la unión del segundo receptor al complejo informador dependiente del analito, formando de esta manera un complejo informador dependiente del analito/segundo receptor adherido al soporte sólido;

(v) eluir el complejo informador dependiente del analito/segundo receptor del soporte sólido con un ácido nucleico desplazador; y

(vi) detectar específicamente la presencia del marcador de ácido nucleico en el complejo informador dependiente del analito/segundo receptor, en que la detección del marcador de ácido nucleico indica la presencia del analito en la muestra.

Uno de los aspectos de este método es un proceso conocido comúnmente como Inmuno-PCR, en que un anticuerpo (Ab), en particular un anticuerpo monoclonal (MAb) está etiquetado con una secuencia específica de ácido nucleico que es habitualmente ADN, con la finalidad de detectar la formación de un complejo inmune supervisando la amplificación enzimática de, por ejemplo, el ADN. El complejo inmune puede formarse con un solo anticuerpo monoclonal informador etiquetado con ADN (rMAb), o en un formato de inmunoensayo de sándwich en concordancia con un anticuerpo monoclonal de captura (cMAb). Los anticuerpos policlonales también pueden emplearse cuando sea preciso. La etiqueta de ácido nucleico puede ser detectada con una sensibilidad extraordinaria, de hasta una copia sencilla de la molécula, cuando es sometida a amplificación por la Reacción en cadena de polimerasa (PCR), o cualquier otra técnica de amplificación exponencial de ácido nucleico (por ejemplo (1) Tabor et al. (WO 00/41524); (2) Single Temperature Strand Displacement Amplification (SDA) (U.S. Pat. No. 5,270,184); (3) Transcription Mediated Amplification (TMA) (U.S. Pat. No. 5,766,849); o Ligase Chain Reaction (LCR) (Wu, D. Y. & R. B. Wallace, 1989, Genomics 4, 560)).

Habitualmente, la amplificación nucleica se consigue mediante PCR utilizando una polimerasa. Las polimerasas adecuadas son bien conocidas en el estado de la técnica, y pueden incluir, sin limitación, polimerasas de ADN, polimerasas de ARN, transcriptasas y polimerasas Q-beta. El experto en la materia reconocerá que la elección de la polimerasa dependerá del tipo de ácido nucleico que se va a amplificar. De acuerdo con una realización de la invención, se utiliza una composición de replicación que comprenda reactivos y cebadores para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa para la amplificación de ácido nucleico. Generalmente, la composición comprenderá el amortiguador, nucleótidos, sales, enzimas y otros componentes necesarios para realizar el PCR u otro procedimiento de amplificación.

Algunos métodos de la presente descripción pueden también realizarse utilizando PCR en tiempo real, en los cuales una secuencia específica de, por ejemplo, el ADN es cuantificada supervisando su coeficiente de amplificación durante el termociclo en presencia de polimerasa Taq, cebadores adecuados y trifosfatos de nucleótido. (Para una breve explicación sobre PCR en tiempo real, ver Walker, 2002, Sci 296: 557-58.).

De forma conveniente, los métodos de la presente descripción pueden utilizarse para detectar múltiples analitos presentes en una muestra sencilla (es decir, multiplicación). Por ejemplo, una multiplicidad de diferentes analitos de ácido nucleico presentes en una muestra sencilla pueden estar detectando simultáneamente, realizando las fases de:

(i) contactar una muestra que comprenda una multiplicidad de diferentes analitos de ácido nucleico con una multiplicidad de conjugados informadores, en que cada conjugado informador comprende un primer receptor capaz de unir de forma

específica uno de la multiplicidad de analitos de ácido nucleico de la muestra, y un marcador de ácido nucleico, y en que cada conjugador informador se une específicamente a un analito diferente y comprende un ácido nucleico que es distinguible de otros ácidos nucleicos en la multiplicidad de conjugados informadores;

(ii) permitir la unión de la multiplicidad de analitos de ácido nucleico en la muestra a la multiplicidad de conjugados receptores, formando de esta manera una multiplicidad de complejos informadores dependientes del analito;

(iii) contactar con la multiplicidad de complejos informadores dependientes del analito con una multiplicidad de segundos receptores, en que la multiplicidad de los segundos receptores es capaz colectivamente de unirse con la multiplicidad de analitos en la muestra, y en que los segundos receptores están adheridos a un soporte sólido a través de un puente de ácido nucleico de una secuencia determinada;

(iv) permitir el enlace de los segundos receptores a los complejos informadores dependientes del analito, formando de esta manera una multiplicidad de complejos de informador dependiente del analito/segundo receptor adheridos al soporte sólido;

(v) eludir la multiplicidad de complejos de informador dependiente del analito/segundo receptor del soporte sólido con por lo menos un ácido nucleico desplazador, y

(vi) detectar específicamente la presencia de los marcadores de ácido nucleico en la multiplicidad eluida de los complejos de informador dependiente del analito/segundo receptor visualizando el marcador de ácido nucleico replicado mediante

tintura con bromuro de etidio, en que la detección de cada marcador de ácido nucleico distinguible indica la presencia del analito correspondiente en la muestra.

Un ensayo típico de acuerdo con este método podría emplear cuatro o más receptores distintos, como por ejemplo anticuerpos, cada uno específico para un analito distinto. Cuando los anticuerpos se utilizan como receptores, los analitos son antígenos o haptenos, como por ejemplo componentes de suero. Puede resultar deseable, por ejemplo, medir de forma simultánea dos o más componentes de dicho suero, como por ejemplo hormonas, enzimas y marcadores de enfermedad en la misma reacción. De esta manera, se puede realizar un ensayo diseñado para medir el riesgo de enfermedad determinando la concentración de suero de por ejemplo colesterol, insulina, PSA, CA125 y otras especies relacionadas con enfermedades en la sangre. De acuerdo con este aspecto de la invención, los marcadores de ácido nucleico están diseñados de manera que cada uno puede distinguirse, por ejemplo, según su tamaño. Así, para un ensayo de cuatro analitos, los marcadores de ácido nucleico pueden ser 50, 70, 90 y 110 nucleótidos de longitud, respectivamente. Después de la ampliación, los productos de PCR pueden ser decididos y cuantificados utilizando técnicas como por ejemplo la electroforesis de gel y la espectroscopia de masa.

Otro aspecto de la descripción se refiere a la selección de anticuerpos para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas. Más específicamente, la invención proporciona métodos para etiquetar anticuerpos de prueba con una secuencia específica de ácido nucleico. A continuación puede detectarse la etiqueta de ácido nucleico con gran sensibilidad mediante PCR o cualquier técnica de amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, una etiqueta de ADN puede ser adherida directamente al anticuerpo utilizando ADN activado químicamente. Como alternativa, puede etiquetarse una proteína de unión con ADN activado químicamente, y conectarse con un anticuerpo

informador derivado con el ligando correspondiente para la proteína de unión, para formar un complejo.

La presente descripción también proporciona métodos para preparar ADN activado con un compuesto químico de reticulado, y almacenar el ADN activado en formato de kit. De acuerdo con este método, se sintetiza un oligonucleótido (habitualmente entre aproximadamente 10 y 100 bases) que va a adherirse a un anticuerpo, péptido, polipéptido o proteína para contener un enlace amino 5' y se activa con el exceso de suberato. El intermedio queda rápidamente aislado y añadido a una solución concentrada de, por ejemplo, anticuerpo monoclonal (MAb). Como alternativa, el oligonucleótido puede ser almacenado para su uso futuro. El conjugado oligonucleótido-MAb puede ser purificado por filtración de gel y cromatografía de intercambio de aniones. Puede hibridizarse una hebra complementaria al primero (por ejemplo, conjugado oligo-Mab), formando un puente de ADN de doble hebra para su utilización en ensayos de Inmuno-PCR Sándwich por Desplazamiento (tal como se describe más abajo). En el caso de un anticuerpo de captura, la segunda hebra complementaria puede ser biotinizada con un reactivo comercial en el extremo 5' y utilizada para revestir partículas paramagnéticas u otro material que contenga avidina unida. La fase sólida sirve como medio para capturar antígeno (Ag) o complejos inmunes Ag-MAb. Pueden asignarse propiedades a una hebra de ADN adherida al anticuerpo de captura para la liberación del complejo inmune desde el medio de captura con el fin de mejorar la sensibilidad de detección.

Los kits de la presente invención para etiquetar proteínas, polipéptidos o péptidos comprende habitualmente un contenedor que contiene moléculas de ADN activadas con disuccinimidil suberato. Las moléculas de ADN pueden, por ejemplo, ser una primera hebra de un puente de ácido nucleico, o una primera hebra de una molécula

de ADN marcador. En una realización, los kits también pueden contener direcciones para etiquetar proteínas, polipéptidos o péptidos utilizando el kit.

La presente descripción también proporciona métodos novedosos para detectar analitos utilizando desplazamiento de ácido nucleico. De acuerdo con estos métodos, generalmente, un analito de ácido no nucleico presente en una muestra es contactado con un conjugado informador. El conjugado informador comprende: un primer receptor capaz de unir específicamente el analito; y un marcador de ácido nucleico. A continuación, se permite que el analito se una al conjugado informador, formando de esta manera un complejo informador dependiente del analito. El complejo informador dependiente del analito es contactado a continuación con un segundo receptor para el analito, en que el segundo receptor es adherido a un soporte sólido a través de un puente de ácido nucleico de una secuencia predeterminada. Cuando se une el segundo informador al complejo informador dependiente del analito, forma un complejo informador dependiente del analito/segundo informador unido al soporte sólido, que puede ser eluido, por ejemplo, utilizando ácido nucleico desplazador. Finalmente, la presencia del marcador de ácido nucleico puede ser detectada como un indicador de la presencia de analito en la muestra.

Una aplicación de esta realización es en el ensayo de Inmuno-PCR sándwich por Desplazamiento (DSI-PSR). De acuerdo con esta realización, el exceso de anticuerpo informador/conjugado de ADN se añade en una solución al antígeno, formando un primer complejo inmune. El complejo es capturado en un soporte sólido revestido con un segundo anticuerpo a través de un puente de ácido nucleico de doble hebra. El lavado extensivo elimina la mayor parte del exceso de anticuerpo informador (superior al 99%). En realizaciones preferentes, a continuación este complejo analito/informador es eliminado gradualmente mediante el uso de un ácido nucleico

desplazador. La etiqueta de ADN eluido asociada con el complejo inmune es amplificada por PCR, y supervisada de forma continua por la generación de una señal fluorescente. La utilización de PCR en tiempo real, en que el aumento en la concentración de copias de ácido nucleico se observa durante el curso de una reacción de amplificación de PCR, permite la determinación del número original de secuencias de ADN marcador, y de esta manera, el número de moléculas de analito. Ello evita la incertidumbre a la hora de cuantificar los productos de PCR en reacciones llevadas a cabo hasta su finalización. Puede detectarse estadísticamente una copia sencilla de un marcador de ADN o el conjugado de MAb informador correspondiente. La presencia de diez copias se detecta con certitud.

Realizar el ensayo de DSI-PCR en ausencia de un antígeno/analito y sin la fase de elución tiene como resultado la “detección” de unas 5000 copias de ADN-MAb debido a la unión no específica. Un lavado posterior no disminuye este fondo. Se ha observado que la eliminación del exceso de MAb-ADN informador mediante un lavado extensivo bajo un conjunto determinado de condiciones de amortiguador dejará siempre algunos informadores unidos de forma no específica al soporte. Las fases de lavado adicional bajo otro conjunto de condiciones, como por ejemplo una temperatura elevada o resistencia iónica, producirán un “florecimiento” fresco de señal de fondo eluida, demostrando que las condiciones de lavado anteriores no habían sido suficientes para eliminar toda la señal de fondo.

La dificultad a la hora de eliminar el informador no específicamente unido MAb-ADN sugirió eluir o eliminar el complejo antígeno/inmune (por ejemplo, PSA/anti- PSA) del soporte antes (por ejemplo, partícula paramagnética de avidina) de la amplificación de PCR. Un medio para conseguirlo fue interponer un brazo espaciador de doble hebra de 26 pares de base que contenía sitios de nucleasa del extremo de

restricción entre el MAb de captura y la biotina utilizada para enlazar el soporte sólido. Se sintetizaron moléculas de ADN de 26 mer complementarias que contenían un enlace de amino 5' para contener sitios de nucleasa tanto para Hind III como para Eco RI cuando se hibridizasen. La función de amino en una hebra de ADN fue derivada con biotina. La segunda hebra fue conjugada para capturar MAb, y a continuación fue hibridizada a la hebra biotinilada. El conjugado de MAb de captura de doble hebra fue completamente unido por avidina inmovilizada, y liberado con Hind III y más eficazmente, con digestión de Eco RI. Un complejo inmune de PSA capturado fue adherido eficazmente desde el soporte sólido mediante tratamiento de Eco RI a 37° C durante 15 min. Sin embargo, estas condiciones también eluyeron el Mob-ADN informador no específico. Cuando se utilizó el anticuerpo anti-PSA la sensibilidad solamente mejoró hasta 5,000,000 copias de PSA. Los resultados obtenidos con placas de microtitulación revestidas de estreptavidina o avidina fueron similares.

La posterior reducción de fondo, y la mejora de sensibilidad del ensayo, requiere la eliminación del complejo inmune específico del soporte sólido mediante el uso de un ácido nucleico desplazador tal como se describe en la presente invención. El complejo inmune MAb-Ag-MAb es liberado de nuevo en una solución y transportado a un recipiente limpio. El MAb informador no específicamente unido o atrapado se deja en el soporte sólido o en las paredes del contenedor de ensayo original. Esto tiene el efecto de purificar el complejo inmune específico. Si la liberación y la transferencia del complejo son eficaces, la intensidad de la señal se mantiene mientras que se reduce la señal de fondo.

La sensibilidad del ensayo DSI-PCR ha sido mejorada en esta invención gracias a: (1) etiquetar directamente el MAb informador con una hebra sintética corta de ADN marcador; (2) emplear pares de sándwich de MAb con constantes de afinidad

$> 10^{10}$; (3) reducir 1000 veces la concentración de MAb informador de entrada (hasta aproximadamente 0.01 no); (4) optimizar los protocolos de bloqueo y lavado; y (5) minimizar el área de la superficie del soporte sólido y el revestimiento de MAb de captura.

En la presente invención, se han conseguido más mejoras en la sensibilidad de DSI-PCR mediante el diseño de un enlace entre el MAb de captura y el soporte de inmunoensayo, que permiten el desplazamiento específico del complejo inmune en la solución utilizando unas condiciones de elución extremadamente cómodas, adaptadas específicamente al puente de ácido nucleico utilizado

En una realización de la invención, se etiqueta un MAb con una hebra de ADN sintético (hebra de captura) a través de un enlace de amino 5'. Se hibridiza una hebra de ADN sintético (hebra ancla) que contiene biotina 5' y una secuencia 3' complementaria a la hebra de captura. El conjugado de captura/ADN de anclaje/ADN se utiliza para revestir la superficie de las placas de microtitulación de avidina o micropartículas paramagnéticas u otro soporte sólido adecuado. A continuación, el MAb de captura se desplaza desde el soporte mediante la adición del oligonucleótido desplazador sobrante que contiene secuencias complementarias tanto del extremo 5' de la hebra de anclaje como del extremo 3' de la hebra de captura. El desplazador hibridiza cerca del extremo 5' de la hebra de anclaje y desplaza la hebra de captura, ya que dicha hebra hibridiza cerca del extremo 3' de la hebra de captura. El conjugado ADN de captura-ADN se libera en una solución como función del equilibrio y la estabilidad relativa del original en relación con la hebra de anclaje recientemente hibridizada.

El desplazamiento se consigue sin alteración en la mayoría de condiciones de solución, incluyendo sin limitación, pH, temperatura o resistencia iónica, todos los cuales han mostrado que liberan de forma independiente conjugado MAb informador-ADN marcador no específicamente unidos de nuevo en la solución. El ADN desplazador elimina todo el complejo inmune MAb-Ag-MAb y el MAb no unido. Solamente el complejo inmune contiene ADN marcador reconocido por los cebadores de PCR. La liberación concomitante del exceso de captura de MAb no afecta ni a la señal ni al fondo. La aplicación de desplazamiento de complejo inmune a Inmuno-PCR tiene como resultado una mejora de 10 veces en la detección por la reducción de la señal de fondo. Se han conseguido sensibilidades de detección de unos pocos cientos de moléculas de antígeno de proteína (aproximadamente cinco attogramos).

El Inmuno-PCR, tal como describen Sano y Cantor, emplea un anticuerpo etiquetado con un fragmento biotilado de ADN a través de un puente de proteína quimérica que consiste en avidina y proteína A. La etiqueta de ADN fue amplificada por la reacción en cadena de polimerasa, y detectada de forma semi-cuantitativa por la electroforesis de gel seguida de la tinción con bromuro de etidio. *Id.* La complejidad multi-fase del ensayo de Sano & Cantor requirió una larga incubación y ciclos de lavado, superiores a media vida del complejo inmune primario, lo cual provocó una pérdida de señal y de precisión debido a la disociación macromolecular. Aunque algunos investigadores más recientes han introducido mejoras, las limitaciones temporales, la complejidad de los reactivos y la contaminación de las plantillas de ADN han inhibido una aplicación extensa de esta tecnología. Por ejemplo, Watanabe y sus colaboradores se han embarcado en una serie de estudios para optimizar la concentración de ADN y las concentraciones de estreptavidina para su utilización en conjunción con anticuerpos específicos (Sugawara, et al., *Clint Chem. Act.*, 299:45-54,

2000 (angiotensinógeno), Saito et al., Clin Chem., 45:5:665-669,1999 (tumor necrosis factor- alpha), y Furuya et al., J. Immunol. Methods, 238:173-180, 2000 (interleukin-18)). Joerger et al. utilizaron ADN conjugado directamente a anticuerpos específicos para hormonas estimuladoras de la tiroides humana y gonadotropina coriónica en una preparación para desarrollar un ensayo capaz de detectar ambos antígenos de forma simultánea (Joerger et al., Clin Chem 41/9: 1371-1377, 1995). Posteriormente, Hendrickson et al. mostraron un inmunoensayo de multianalitos para la detección simultánea de tres analitos (hTSH, hCG y beta-Gal) utilizando anticuerpos etiquetados con ADN (Hendrickson et al. Nucl. Acids Res. 14:6115-28, 1986) ver también, Patente No. US 5,985,548)). Jablonski et al. también describieron técnicas para adherir directamente moléculas de ADN a moléculas de proteínas (Jablonski et al., Nucl. Acids Res. 23/3:522-29, 1995). Para otros métodos de conjugar moléculas de ADN a polipéptidos, ver Hermanson, Bioconjugate Techniques, pp 639-666,1996.

De acuerdo con otra realización, pueden realizarse los métodos de desplazamiento de la presente descripción, purificación de anticuerpos, analitos y complejos de los mismos. Un aspecto de esta realización comprende un método para unir de forma reversible un complejo de anticuerpo/analito a un soporte sólido. Dicho método comprende las fases siguientes:

(i) proporcionar un complejo de anticuerpo/analito, en que el extremo 5' del primer ácido nucleico se conjuga con el anticuerpo, el analito comprende un antígeno reconocido por el anticuerpo, y el analito está específicamente unido al anticuerpo a través del sitio de combinación del antígeno del anticuerpo;

(ii) proporcionar un soporte sólido que comprenda un segundo ácido nucleico, en que el extremo 5' del segundo ácido nucleico está unido al soporte sólido,

en que el segundo ácido nucleico es sustancialmente complementario al primer ácido nucleico sobre su terminal 3’;

(iii) unir el complejo anticuerpo/analito al soporte sólido por medio de un puente de ácido nucleico de doble hebra, en que el puente de ácido nucleico está formado por hibridación de los extremos no unidos del primer y el segundo ácido nucleico; y

(iv) eluir el complejo anticuerpo/analito del soporte sólido por medio de un ácido nucleico desplazador.

Tal como se ha descrito anteriormente, los métodos para eluir el complejo informador dependiente de analito/segundo receptor de ácido no nucleico utilizan habitualmente una molécula de ácido nucleico desplazador bajo condiciones que favorecen el desplazamiento del puente de ácido nucleico con el ácido nucleico desplazador, pero reducen o eliminan la elución de las especies no específicamente unidas. En realizaciones alternativas, puede utilizarse cualquier medio para eluir específicamente la molécula de ácido no nucleico sin contaminar especies no específicas. Por ejemplo, una endonucleasa, como una enzima de restricción, puede ser utilizada para digerir el puente de doble hebra, eluyendo de esta manera el complejo informador dependiente de analito/segundo receptor de ácido no nucleico.

En otras realizaciones de la descripción, se proporcionan un método para etiquetar anticuerpos o proteínas que unen ligandos directamente con ADN y un medio para realizar inmunoensayos de detección de ácido nucleico con PCR en tiempo real en un formato de kit que será muy resistente al uso. El formato de la descripción permite la aplicación mejorada y práctica de un ensayo de Inmuno-PCR. Los métodos de la presente descripción reducen el problema de la unión no específica del marcador de

ADN, que afecta a todos los ensayos de amplificación de ácido nucleico exponenciales. La presente invención también proporciona precisión y cuantificación, utilizando detección de PCR en tiempo real.

Kit para etiquetar Proteínas con Moléculas de Ácido Nucleico

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a métodos para etiquetar moléculas de anticuerpo. De acuerdo con este aspecto, se proporciona un reactivo de ADN que, cuando es contactado en solución bajo unas condiciones apropiadas, forma un enlace covalente con, por ejemplo, un anticuerpo. El reactivo de ADN puede ser de hebra sencilla o de hebra doble. Si es de hebra sencilla, la etiqueta de ADN puede ser convertida en un dúplex por hibridación con una hebra total o parcialmente complementaria.

El reactivo de ADN está formado por la síntesis de una secuencia de ADN que contiene un grupo funcional de amina primaria. La amina primaria puede localizarse en cualquier punto de la molécula de ADN, pero en realizaciones preferentes, la amina está localizada en el terminal 5' del ADN. El ADN que contiene amina es contactado con un exceso de agente de reticulado reactivo con amina bajo condiciones apropiadas de reacción y la mitad de amina del ADN reacciona con el agente de reticulado. El ADN activado es aislado por cromatografía de filtración de gel bajo condiciones que mantienen la actividad de reticulado residual. El reactivo de ADN se distribuye en cantidades conocidas en recipientes apropiados, se congela rápidamente y se liofiliza hasta desecación. El anticuerpo (en solución) añadido al liofilizado reacciona con el extremo no reaccionado del agente de reticulado para formar un conjugado covalente al ADN. El reactivo hidrolizado excesivo puede ser eliminado, por

ejemplo, por una o más pasadas a través de un ultra-filtro que tenga un límite de peso molecular apropiado para discriminar el anticuerpo del ADN.

La descripción también proporciona métodos para etiquetar una proteína de unión de ligando. Se utiliza una solución de proteína de unión para hidratar el reactivo de ADN liofilizado (preparado tal como se indica más arriba). La parte no reaccionada del agente de reticulado combina con los residuos específicos de aminoácido en la estructura de la proteína para formar una unión de covalente al ADN. La proteína de unión etiquetada con ADN puede ser contactada con anticuerpo etiquetado con el ligando correspondiente, lo cual tiene como resultado un conjugado ADN-anticuerpo.

Un aspecto adicional de la presente descripción proporciona un método para realizar el ensayo DSI-PSR utilizando el proceso de conjugación ADN-anticuerpo. Un inmuno ensayo de este tipo de acuerdo con este aspecto de la descripción utiliza un formato de sándwich, en que se forma un complejo inmune utilizando dos anticuerpos de epítopos diferentes en el mismo antígeno. Un anticuerpo del par (informador) es etiquetado con ADN marcador. El segundo anticuerpo (captura) es inmovilizado sobre una superficie sólida para capturar el complejo inmune formado por el anticuerpo informador y el antígeno. El complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo puede formarse combinando todos los reactivos de forma simultánea o secuencial. El complejo inmune inmovilizado se separa del exceso de conjugado anticuerpo informador-ADN mediante un lavado, seguido de la elución selectiva, y el ADN marcador es detectado por la amplificación de PCR.

La reacción de PCR es iniciada mediante la adición de los cuatro trifosfatos de nucleósida diferentes, un par cebador de oligonucleótido para cada modelo que va a ser amplificado, una enzima termoestable que cataliza la polimerización de los

trifosfatos de nucleósida desde el extremo del cebador, y cualquier otro reactivo necesario para la reacción de PCR. La amplificación de las hebras del modelo de ADN se consigue mediante fases sucesivas de calentamiento y enfriamiento.

La reacción de PCR puede ser detectada mediante técnicas de cuantificación de ADN comunes, incluyendo la electroforesis de gel, hibridación de mancha y autorradiografía. Preferiblemente, el PCR es supervisado en tiempo real utilizando un termociclador automatizado y generación de señal de fluorescencia (ver, por ejemplo, Walker, 2002, Science 296:557-58). La generación de señal de fluorescencia puede ser, sin limitación, específica para cada secuencia (Modelos Moleculares, Taq Man, cebadores fluorogénicos) o dependientes de la masa (Verde SYBR, Bromuro de Etidio).

La amplificación y detección de PCR puede llevarse a cabo en los complejos inmunes unidos al soporte sólido, o en complejos disueltos de nuevo en la solución. De forma ventajosa, la liberación de complejo inmune unido desde una superficie sólida capturadora mejora la sensibilidad eliminando el conjugado de ADN-anticuerpo informador no específicamente unido.

Otra forma de inmunoensayo de detección de ácido nucleico utiliza un formato de inmunotintura. Una sección fina de tejido fijada a una superficie sólida es contactada con un anticuerpo que ha sido etiquetado con un marcador de ADN. Si el antígeno se encuentra presente, se formará un complejo inmune en la sección del tejido. La muestra se lava para eliminar el exceso de reactivo anticuerpo-ADN y las células individuales pueden ser aisladas mediante la técnica de captura por láser. A continuación, las células individuales capturadas pueden ser lisadas, provocando la liberación y solubilización de los complejos antígeno-anticuerpo. La etiqueta de ADN marcador puede ser cuantificada durante o después de la amplificación.

En otro aspecto de la descripción, puede examinarse la actividad de los anticuerpos elevados contra aptenos en relación con un antígeno determinado etiquetándolos con un marcador de ADN a través de la formación del complejo con un conjugado proteína de unión-ADN.

La presente invención puede ser mejor comprendida mediante los ejemplos siguientes, que tienen como única finalidad ilustrar la presente invención, y de ninguna manera deberían ser considerados como limitadores de la invención en cuestión.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Activación del ADN de Amino 5'

Una secuencia de 59 bases de ADN marcador:

5'NH₃- (C12)-TGCGTAGCGA TGACTAGCTG CTGATCGATA TTAGCTAGCA
TCAGCGATCG ATACGAGCA-3' (SEQ ID NO: 13)

fue sintetizada para contener un solo grupo de amina primaria en el extremo 5' a través de un brazo espaciado de carbón 12 (Glen Research, Sterling, VA). El ADN de amino 5' (350 µg) se disolvió en 20 µl de amortiguador de fosfato de sodio 10.05 M, pH 8.0. El suberato de disuccidimidil se disolvió en DMSO seco a una concentración de 12 mg/ml. Inmediatamente se añadió un alícuoto de 40 µl a la solución de ADN, mezclando con un re-pipeteado suave. Después de un minuto a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se cargó en una columna (fina) G-25 de 0.5 x 20 cm equilibrada en 5 mM de ácido cítrico, ajustado a un pH de 5.4 con 0.1 M de hidróxido de sodio, y desarrollado a un coeficiente de flujo de 0.5 ml/min a temperatura ambiente. El primer pico eluido fue recogido directamente en un Dispositivo de Filtro Centrífugo YM-10 (Millipore Corp., Bedford MA) incrustado en hielo. El ADN modelo activado por

suberato fue concentrado por centrifugación a 5000-x g durante 30 minutos a 4°C, a 200-300 µl. La concentración de ADN se determinó por absorción a 260 nm. Se distribuyó una unidad A_{260} (aproximadamente 30 µl) en tubos microcentrífugos que contenían 5 µl de manitol al 10%, e inmediatamente fue congelada en un baño de hielo seco/acetona. Las bolitas fueron liofilizadas en seco, selladas con argón seco y almacenadas congeladas.

La actividad del ADN activado liofilizado fue evaluada mediante reacción con una molécula que contenía una pequeña parte de amina. Se hizo reaccionar glutatona a 50 mg/ml en 0.1 M de fosfato de sodio, pH 8.0 con una cantidad estequiométrica de N-etilmalimida (NEM). El pH fue reajustado a 8.0 con hidróxido de sodio. Se disolvió una unidad A_{260} de ADN activado con suberato en 10 µl de NEM-glutatona, y a continuación se diluyó 25 veces con agua a 4.0 unidades de A_{260} /ml. La conjugación con NEM-glutatona tuvo como resultado una sola banda migrante más lenta en electroforesis de gel de urea de TBE de poliacrilamida al 15 % en comparación con el ADN amino 5' no modificado. El ADN activado con suberato, purificado y liofilizado bajo las condiciones descritas, muestra habitualmente casi un 100% de conjugación con NEM-glutatona, lo cual indica una activación completa y un mantenimiento de la reactividad de la amina.

Ejemplo 2: Conjugación del Anticuerpo Monoclonal con ADN

Se concentraron cien microlitros de anticuerpo monoclonal en PSA (1 mg/ml) (A45110136P de Biospecific, Emeryville, CA) y se intercambió en 0.1 M de fosfato de sodio, 0.15 M cloruro de sodio, pH 8.25 mediante dos pasadas a través de un dispositivo de filtración centrífuga Microcon YM-50 a 10,000 x g en un microcentrífugo a temperatura ambiente. El volumen final de 25 a 50 µl fue recogido por centrifugado en

un tubo microcentrífugo, y fue añadido a una bolita liofilizada de ADN marcador activado. Se dejó continuar la reacción de conjugación durante varias horas a temperatura ambiente.

El grado de etiquetado de anticuerpo fue evaluado por SDS y electroforesis de gel de proteína nativa. La incorporación de una o más hebras de ADN en una estructura de anticuerpo aumenta tanto el peso molecular como la densidad de la carga negativa. Los anticuerpos etiquetados con una o más hebras de ADN aparecen como bandas de migración más lenta diferenciadas en electroforesis de gel de SDS al 4%, lo cual corresponde al grado de incorporación. Estas mismas moléculas de conjugado migran más rápidamente que el anticuerpo no derivado correspondiente en una electroforesis de gel de proteína nativa al 4-12%. La separación es menos dramática, pero no tiene una definición tan óptima para conjugados de orden superior en geles nativos.

Se evaluó el grado de conjugación del ADN mediante densidades de banda relativas para anticuerpos libres y conjugados, y varió entre 50 y 100%, dependiendo de la reactividad relativa y de la exposición de grupos de amina de lisina contenidos en la estructura del anticuerpo. El grado de etiquetado se determinó a partir del número y la densidad relativa de las bandas de proteína de conjugado, e indicaron una mezcla de etiquetas de ADN predominantemente sencillo y doble por anticuerpo.

El ADN no reaccionado fue eliminado del preparado de conjugado mediante cromatografía de filtración de gel FPLC, empleando una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada en una solución salina amortiguadora de fosfatos. El anticuerpo no reaccionado fue eliminado mediante una cromatografía de intercambio de aniones FPLC utilizando una columna Mono Q HR 5/5

equilibrada en 20 MM de amortiguador Tris-Cl, pH 8.0 y una pendiente del 5% min. de NaCl de 1.0 M a 0.5 ml/min.

El ADN conjugado fue convertido en bicatenario mediante hibridación a un oligonucleótido 59-mer complementario:

5'-TGCTCGTATC GATCGCTGAT GCTAGCTAAT ATCGATCAGC
AGCTAGTCAT CGCTACGCA-3' (SEQ ID NO: 18)

El exceso de ADN complementario fue eliminado mediante varias pasadas a través de un dispositivo de filtro centrífugo Microcon YM-100.

Ejemplo 3: Etiquetado de Anticuerpo Monoclonal Con Biotina.

Se etiquetó MAb de captura en PSA (A45120136P (Biospecific)) con biotina para inmovilización en soportes sólidos revestidos con avidina. Se hizo reaccionar MAb de captura (1 mg/ml) sulfo-NHS-LC-biotina de exceso molar 7.5 y 15 veces más (Pierce, Rockford, Ill.) en 0.1 M de fosfato de sodio, pH 8.0, durante 2-4 horas a temperatura ambiente. La reacción produjo 3.6 y 7.3 moles de biotina/moles de MAb, respectivamente, tal como se determinó mediante la reacción con HABA. El MAb de captura biotinilado fue purificado en una columna de desalación, y se probó su reactividad inmune al antígeno específico de próstata (PSA) mediante ELISA.

Ejemplo 4: Etiquetar ADN Amino 5' Con Biotina.

Se biotinilaron oligonucleótidos sintetizados para contener un enlace amino 5' (C12) mediante la adición de sulfo-NHS-LC-biotina sólida en exceso en una solución de 1-5 mg/ml en 0.1 M de bicarbonato de sodio, pH 8.5. Se dejó proceder la reacción durante 4 horas hasta el día siguiente a temperatura ambiente. El ADN

biotinilado fue purificado a partir de la mezcla de reacción mediante HPLC utilizando una columna de fase inversa C-18 eluida con una pendiente de acetonitrilo en agua. Se secaron los oligonucleótidos biotinilados puros mediante centrifugación al vacío y se almacenaron congelados.

Ejemplo 5: Preparación De Micropartículas Paramagnéticas Revestidas con Cmah-Biotina.

Se colocaron partículas paramagnéticas de estreptavidina Bio-Mag (Polysciences, Warrington, PA) o SeraMag-Streptavidina (Seradyn, Ramsey, MN) (5 mg en 500 μ l) en un frasco de tapón de rosca de 2 ml. Las partículas fueron recogidas en la parte lateral del frasco bajo un campo magnético, y el supernadante fue descartado. Las partículas fueron lavadas dos veces por recogida magnética y resuspensión en 2 ml de Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos que contenía 0.05% de Tween-20. Las partículas fueron resuspendidas en 1 ml de solución de bloqueo (PBS que contenía 1% de albumina de suero bovino, 0.1 mg/ml de ADN de esperma de salmón y 0.1% de azida sódica) y fueron transferidas a un tubo cónico de 50 ml. Para ello se añadieron 24 ml de 10 nM cMAb biotinilado (etiquetado con biotina, ya fuera directamente, como en el ejemplo 3, o a través de un puente de ADN de doble hebra) en una solución de bloqueo, seguido de una incubación durante una hora bajo una agitación suave a temperatura ambiente. Las partículas fueron lavadas tres veces por recogida magnética y resuspensión en 25 ml de PBS/Tween y una vez en PBS. Las partículas fueron resuspendidas en 2.5 ml de solución de bloqueo y almacenadas a 4°C.

De forma parecida, también se revistieron placas de microtitulación Reacti-Bind NeutrAvidin Polystyrene (Pierce, Rockford, IL.) con cMAb mediante una etiqueta de biotina. El grado de revestimiento en los soportes fue supervisado por la pérdida de

MAB biotinilado de la solución tal como fue medido por el ácido bicinconínico (Reactivo de Ensayo de Proteína BCA de Pierce). Se mostró el MAb de captura inmovilizado por medio de la electroforesis de gel de proteína para unir el complejo de ADN de PSA y MAb informador de PSA.

Ejemplo 6: Ensayo de Sándwich Inmuno-PCR para Antígeno Específico De Próstata.

Se añadieron ochenta (80) μ l de conjugado de 12.5 pM rMAB-ADN del ejemplo 1 en solución de bloqueo a cada pocillo de muestra en una placa iCycler (Bio-Rad, Hercules CA), seguido de 20 μ l de muestra de suero o series de disolución standard. La solución fue mezclada con suavidad por repipeteado. La placa fue cubierta con un sellador para impedir la evaporación, y fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente para formar el primer complejo inmune en solución.

Se añadieron micropartículas magnéticas recubiertas con cMAB-biotina (5 μ l), que fueron mezcladas mediante repipeteado suave. La placa fue cubierta con un sellador y se incubó durante 30 minutos bajo agitación suave para capturar el complejo inmune de PSA sobre la partícula.

Las partículas fueron recogidas en las partes laterales de los pocillos bajo un campo magnético, y el supernadante fue extraído utilizando una pipeta equipada con puntas de filtro. Las partículas fueron resuspendidas en 120 μ l de TKMT (10 mM Tris, pH 8.0 que contenía 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, Tween20 al 0.05%) utilizando pipetas con filtro en el extremo. Esta recogida y resuspensión de las partículas se repitió cinco veces de forma adicional, incrementando el volumen de cada lavado sucesivo en

20 µl. De esta manera se aseguró la eliminación del exceso de conjugado ADN-MAb informador del menisco líquido en las paredes del pocillo.

Captura del Complejo Inmune de PSA En Partículas.

Las partículas fueron resuspendidas en 50 µl de reacción de PCR (Platinum Quantitative PCR Super Mix, Invitrogen, Carlsbad, CA) que contenían Verde SYBR @ 1:30000 (Molecular Probes, Eugene, OR), 10 nM de fluoresceína, 0.2 µM cada cebador, y 0.5 x TKMT. La placa fue cubierta con cinta selladora de calidad óptica y golpeada con suavidad para eliminar las burbujas en el fondo de los pocillos. La amplificación de PCR se llevó a cabo de forma automática durante 40 ciclos de fusión a 95°C durante 15 segundos y extensión de 62°C durante 1 minuto en un Instrumento iCycler. La intensidad de fluorescencia fue supervisada en tiempo real y se registró un número de ciclo para cada muestra que consiguió un nivel de umbral de señal. Este número de ciclo de umbral se comparó a continuación con los valores obtenidos para una serie de dilución standard de ADN marcador. Los ensayos de este formato detectaron habitualmente unas 5000 moléculas de PSA por encima del fondo (señal en ausencia de PSA). La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de PCR de ADN marcador adherido a rMAb para PSA.

Ejemplo 7: Ensayo de Inmuno-PCR por Desplazamiento para Antígeno

Específico de Próstata.

El anticuerpo capturado a PSA (Bioespecífico A45120136P) fue conjugado con:

5'-NH₃ (C12)-TAGGACTTCAGACTGGGACGAT-3' (SEQ ID NO: 2)

e hibridizado a:

3'-ATCCTGAAGTCTGACCCTGCTAGCTCGAG- (C12) NH3-5'-biotina
(SEQ ID NO:1)

a continuación fue revestido en micropartículas paramagnéticas de Estreptavidina BioMag (lote 495594) a 50 pmol/mg. El Antígeno Específico de Próstata (0 a 10⁶ moléculas) fue incubado durante 2 horas a temperatura ambiente con 10 pM rMAb (Biospecific A215110136P) conjugado a:

5'-NH3-(C12)TGCGTAGCGA TGACTAGCTGC TGATCGATAT
TAGCTAGCAT CAGCGATCG ATACGAGCA-3' (SEQ ID NO:13)

hibridizado a

3'-ACGCATCGCT ACTGATCGAC GACTAGCTAT AATCGATCGT
AGTCGCTAGC TATGCTCGT-5' (SEQ ID NO: 14)

en 0.1 ml de estructura de bloqueo.

La estructura de hibridación es tal como se indica más abajo:

5'-NH3 (C12)-TGCGTAGCGA TGACTAGCTG CTGATCGATA
||||| **|||||** **|||||**
3'-ACGCATCGCT ACTGATCGAC GACTAGCTAT

TTAGCTAGCA TCAGCGATCG ATACGAGCA-3' (SEQ ID
NO:13)
||||| **|||||** **|||||**
AATCGATCGT AGTCGCTAGC TATGCTCGT-5' (SEQ ID
NO:14)

El complejo inmune fue eliminado de la solución al cabo de 30 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 5 µl en suspensión de micropartículas

revestidas (2 mg/ml). Las micropartículas fueron lavadas 6 veces por recogida magnética y resuspensión en TKMT repetidamente, y divididas en dos grupos.

y

Un grupo fue resuspendido en 25 µl de TKMT y sometido a un análisis de PCR en tiempo real utilizando el grupo del cebador.

5' -TGCGTAGCGA TGACTAGCTG CTG-3' (SEQ ID NO:15)

5' -TGCTCGTATC GATCGCTGAT GCT-3' (SEQ ID NO:16)

El otro grupo fue resuspendido en 25 µl de 1 µM de oligonucleótido desplazador de la secuencia:

5'-GGACTTCAGA CTGGGACGAT CGAGCTC-3' (SEQ ID NO: 3)

disuelto en TKMT. Las partículas fueron recogidas por campo magnético, y el sobrenadante fue sometido a análisis de PCR en tiempo real utilizando los mismos cebadores. La señal de cada reacción fue analizada con relación a una curva standard de conjugado rMAb-ADN.

Los resultados que aparecen en la figura 2 indican una reducción del fondo de aproximadamente 10 veces por el desplazamiento del complejo inmune de las micropartículas paramagnéticas, lo cual tiene como resultado una mejora equivalente en la sensibilidad del ensayo definitivo.

Ejemplo 8: Reacciones de Desplazamiento.

División de Endonucleasa: se creó un enlazador dissociable que conectase el MAb de captura con la biotina, utilizando un ADN de doble hebra de 26 pares de base que contenía puntos de endonucleasa de restricción (SEQ ID NO:17). Los

oligonucleótidos de 26-bases, cada uno de ellos con un enlace de amino 5' fueron sintetizados para contener puntos de restricción Hind III y Eco RI cuando fueran hibridizados. La función de amino en una hebra de ADN fue derivada con sulfo-NHS-LC-biotina. La segunda hebra fue conjugada para capturar MAb con PSA seguido de hibridación a la hebra complementaria biotilada. El conjugado de MAb de captura biotilado fue plenamente unido por la avidina inmovilizada (o estreptavidina) y liberado por digestión con una endonucleasa de restricción. Se empleó tanto Hind III como Eco RI, aunque la digestión de Eco RI fue más eficiente. Un complejo PSA capturado-MAb informador fue adherido efectivamente desde el soporte paramagnético mediante tratamiento con Eco RI a 37°C durante 15 min. Sin embargo, estas condiciones eluyeron también el conjugado MAb informador no específico-ADN. La sensibilidad de un ensayo Sándwich Inmuno-PCR (Ejemplo 6) mejoró de forma marginal para la detección de PSA cuando el complejo inmune fue desplazado del soporte sólido por división de restricción del enlace de ADN. Los resultados obtenidos con placas de microtitulación revestidas con estreptavidina o avidina fueron similares.

5' CAGGTAGAAT TCCTAAGCTT CAGGCT (SEQ ID NO:17)

3' GTCCATCTTA AGGATTCGAA GTCCGA

Eco R1 Hind III

Desplazamiento: otro medio para reducir el fondo durante la reacción de PCR final utilizó un enlazador de ADN de doble hebra entre el MAb de captura y la biotina utilizada para enlazar con el soporte sólido. Se sabe que el Ácido nucleico péptido (PNA) forma híbridos extremadamente tensos con el ADN complementario, y se utilizó para desplazar una hebra de ADN hibridizada de la misma secuencia. El MAb de

captura fue biotinilado mediante un brazo enlazador compuesto de ADN de doble hebra, que se disociaría en presencia de un PNA complementario excesivo.

Ácido Nucleico Proteínico: Se sabe que el Ácido nucleico péptido (PNA) forma híbridos extremadamente tensos con el ADN complementario, y se utilizó para desplazar una hebra de ADN hibridizada de la misma secuencia.

Una secuencia de anclaje de ADN de 22 bases fue sintetizada con una función de amino 5', y fue biotinilada. Una secuencia de captura de ADN de 15 bases, complementaria al extremo 3' de la secuencia de anclaje, fue sintetizada con una función de amino 5' y fue conjugada al MAb de captura. El conjugado de MAb de captura fue hibridizado a una secuencia de anclaje biotinilada, dejando una región de hebra sencilla de 7 bases en el extremo 5' del anclaje. Se sintetizaron secuencias idénticas de desplazador de ADN de 18 bases para ser complementarias al extremo 5' de la secuencia de anclaje. La hibridación de la secuencia de desplazador a la región abierta de 7 bases de la sonda de anclaje “desplazaría” la secuencia de captura hibridizada, liberando el complejo inmune, y por lo tanto el modelo de ADN, en la solución. La secuencia de anclaje biotinilada, y la secuencia desplazadora hibridizada, así como el MAb informador-ADN unido a la superficie, permanecerían con el soporte revestido de avidina. El supernadante sería transferido a un nuevo recipiente para la amplificación de PCR. Este sistema se denomina captura/desplazamiento (ver, por ejemplo, la Figura 1).

La secuencia de captura también fue conjugada a fosfatasa alcalina con el fin de supervisar y optimizar el sistema de captura/desplazamiento siguiendo la actividad de la enzima. Esta disposición de las secuencias de ADN demostró la captura y liberación de las partículas de avidina y los pocillos de microtitulación.

Sorprendentemente, se descubrió que la secuencia de ADN desplazador superaba en rendimiento a la secuencia de PNA en amortiguador salino isotónico, mientras que podía afirmarse lo contrario en condiciones de salinidad baja. La adición de 1 μM de ADN desplazador a la fosfatasa alcalina inmovilizada a través de ADN biotinilado de doble hebra fue liberada completamente en la solución en cuestión de segundos. El sistema fue igualmente eficiente cuando se aplicó al ensayo de inmuno-PCR. Las condiciones de desplazamiento utilizando ADN fueron idénticas a las condiciones de lavado anteriores, y compatibles con PCR. La captura/desplazamiento tuvo como resultado una reducción evidente del fondo, sin afectar a la señal.

Cinética de Desplazamiento: la Fosfatasa Alcalina fue conjugada a un oligonucleótido de captura de 15 bases (GTGCTTCCTC TTTCT (SEQ ID NO:8)) a través de un brazo de enlace de amino 5' (C12) utilizando disuccidimidil suberato. El ADN fue hibridizado a un oligonucleótido de anclaje complementario de 22 bases (5'-GACACACAGA AAGAGGAAGC AC (SEQ ID NO:9)) etiquetado con biotina a través de un brazo de enlace de amino 5', lo cual dio como resultado una fosfatasa alcalina etiquetada con biotina a través de un enlace de ADN parcialmente de doble hebra. El conjugado de fosfatasa alcalina/ADN fue disuelto en PBS con un contenido de 1 MM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , y 0.1% BSA. Se lavaron cincuenta microgramos de micropartículas paramagnéticas avidiniladas (Streptavidina BioMag, Polysciences, Inc., Warrington PA, 18976) con el mismo amortiguador, y fueron combinadas con 2.5 μg de conjugado de fosfatasa alcalina/ADN en 0.5 ml de amortiguador. Se apreció que aproximadamente la mitad de la actividad enzimática estaba unida a las micropartículas, tal como determinó el seguimiento del cambio en la densidad óptica a 405 nm en presencia de 1 mg/ml de para-nitrofenil fosfato disuelto en 2.4 M dietanolamina y 57 μM de MgCl_2 , pH 10. Las partículas fueron lavadas 4 veces en el amortiguador y

divididas en tres cantidades iguales. La liberación de actividad enzimática de las micropartículas en la solución fue supervisada como una función de tiempo a continuación de la adición de oligonucleótido de desplazamiento o ácido nucleico proteínico (PNA) (5'-CTTCCTCTTTCTGTGTGT (cadena de ADN: SEQ ID NO: 6 y cadena de PNA: SEQ ID NO:11)).

Tabla 1

	Tiempo (min)	Actividad Enzima Soluble
Control (sin adición)	5	1.3%
	10	1.4%
	20	1.4%
	30	1.5%
Adición de PNA	1	50%
	3	65%
	5	80%
	10	90%
	20	94%
	30	97%
Adición de ADN	1	82%
	3	91%
	5	97%
	10	98%
	20	98%
	30	98%

Esta observación se repitió varias veces utilizando Fosfatasa Alcalina conjugada a (5'-GCTACTTGAC TTCGAGTGCT TCCTCTTTCT (SEQ ID NO:5))/ (GACACACAGA AAGAGGAAGC AC biotina 5'(SEQ ID NO:9)) y eliminada con el mismo desplazador a 1 μ M. En todos los casos, casi el 100% de la actividad de la enzima unida fue desplazada de nuevo a la solución al cabo de 5 minutos.

La cinética de desplazamiento también puede observarse con conjugados de anticuerpo a PSA desplazado otra vez a la solución. La presencia de cantidades bajas de anticuerpo en la solución es determinada por ELISA. El anticuerpo contra PSA es capturado en las placas revestidas de PSA, y a continuación se reviste con un HRP-Ab secundario. La actividad de HRP es proporcional a la presencia del primer anticuerpo.

Las placas de microtitulación recubiertas con avidina (Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene Strip Plate with SuperBlock Blocking Buffer, Pierce, Rockford, IL 61105) fueron incubadas durante 30 minutos con 10 nM de Ab anti-PSA (no etiquetado, etiquetado con biotina directamente, o conjugado al híbrido de oligonucleótido de anclaje de captura/biotinilado). Los pocillos fueron lavados tres veces en PBS que contenía 0.05% Tween. El conjugado de anticuerpo fue desplazado por la adición de 1 μ M de oligonucleótido desplazador y el PNA correspondiente en 10 mM Tris, pH 8, que contenía de 0 a 500 mM de sal. Los pocillos fueron vaciados y lavados como una función del tiempo de incubación. Se añadió anticuerpo anti-ratón etiquetado con HRP en los pocillos, y se dejó incubar durante 1.5 horas. De acuerdo con la actividad de HRP, se determinó que el anticuerpo anti-PSA se midió en 490 nm en presencia de OPD/Peróxido en un lector de placa de Molecular Devices Corp. Hay que señalar que, aunque en este ejemplo se utiliza PNA, las moléculas de ADN y ARN también pueden utilizarse como ácido nucleico desplazador.

La Figura 3 muestra que el híbrido de captura/anclaje es estable bajo las condiciones salinas del amortiguador. El conjugado de anticuerpo/ADN biotinilado permanece unido al pocillo, así como los controles. La Figura 4 muestra el efecto del desplazamiento de PNA en el conjugado de anticuerpo/ADN biotinilado unido. A una resistencia iónica baja, el desplazamiento de PNA es muy eficaz, eliminando el anticuerpo en unos pocos minutos. No resulta tan efectivo como en alta concentración

de sal. La Figura 5 muestra el desplazamiento con una molécula de ADN. Resulta muy efectivo en una alta concentración de sal, y no es efectivo en ausencia de sal.

Desplazamiento/Recaptura: en caso necesario, el concepto de captura/desplazamiento puede ser ampliado para incluir otra ronda de captura y liberación. Para probar esta hipótesis, se sintetizó una secuencia de captura más larga, de 30 bases, que contenía una segunda región complementaria a la secuencia de la segunda captura. El complejo inmune desplazado a la solución desde el primer soporte revestido de avidina sería recapturado mediante una hibridación de solución a una segunda secuencia biotinilada, seguida de la exposición a un soporte sólido de avidina fresca. Cada fase de captura/liberación mejora la sensibilidad, eliminando MAb informador-ADN no específico. La secuencia de ADN de captura para el sistema de captura/desplazamiento/recaptura se conjugó a fosfatasa alcalina y MAb de captura. Se analizó la eficacia del sistema siguiendo la actividad enzimática capturada, desplazada y recapturada en partículas paramagnéticas. A continuación, el conjugado de MAb fue incorporado al ensayo de inmuno-PCR. En realizaciones preferentes de la presente invención, solamente se explora una ronda de captura/desplazamiento. Para la presente invención, se utiliza captura/desplazamiento. Sin embargo, en caso necesario, en la presente invención pueden utilizarse fases adicionales de captura/desplazamiento.

Tabla 2: Secuencias para NADIA de Captura/Desplazamiento

<p>Secuencia de anclaje para Biotinilación : (29mer) (SEQ ID NO : 1) 5'NH₂- (C₁₂)-GAGCTCGATC GTCCAGTCT GAAGTCCTA 3' 9470 g/mol; e = 2.75E5 ; 1 od = 34.4 µg/ml o 3.64 µM</p>
<p>Secuencia de captura para etiquetado de anticuerpo (22 mer) (SEQ ID NO : 2) 5'NH₂- (C₁₂)-TAGGACTTCA GACTGGGACG AT 3' 7261 g/mol; e = 2.18E5 ; 1 od = 33.2 µg/m o 4.58 µM</p>
<p>Secuencia de desplazador (27 mer) (SEQ ID NO : 3) 5'GGACTTCAGA CTGGGACGAT CGAGCTC 3' 8897 g/mol; e = 2.60E5 ; 1 od = 34. 2 µg/ml o 3.85 µM</p>
<p>1ª captura (SEQ ID NO : 4) 3'CACGAAGGAG AAAGACACAC AG 5'- (C12)-NH₃-biotina MW = 9574, e = 2.59E5, 1 OD = 37 µg/ml o 3.86 µM</p>
<p>30 mer (SEQ ID NO : 5) Captura Ab-5'NH₃-(C12)-GCTACTTGAC TTCGAGTGCT TCCTCTTTCT</p>
<p>Eliminación de PNA (SEQ ID NO : 11) 5'CTTCCTCTTT CTGTGTGT 3'</p>
<p>2ª captura 3'CGATGAACTG AAGCTCAC- (C 12) NH₂ 5'-biotina o 5'NH₃- (C₁₂)-CACTCGAA GTCAAGTAGC (SEQ ID NO : 7) MW = 5782, e = 1.785E5, 1OD = 32.4 µg/ml o 5.6 , µM</p>

REIVINDICACIONES

1. Un kit para detectar un analito de ácido no nucleico en un ensayo de inmuno-PCR sándwich por desplazamiento, que comprende:

(i) un primer contenedor que contiene un anticuerpo de captura unido a un soporte sólido con un puente de ácido nucleico que consta de dos hebras de ácido nucleico por lo menos parcialmente complementarias, una de las cuales está unida a un soporte sólido;

(ii) un segundo contenedor que tiene un conjugado del mismo anticuerpo o de un anticuerpo diferente y una molécula de marcador de ácido nucleico; y

(iii) un tercer contenedor que contiene un ácido nucleico desplazador que tiene una secuencia por lo menos parcialmente complementaria a una de las hebras del puente de ácido nucleico.

2. Un kit para detectar un analito de ácido no nucleico en un ensayo de inmuno-PCR sándwich por desplazamiento, que comprende:

(i) un primer contenedor que comprende moléculas de ADN activadas químicamente utilizando un compuesto de reticulación que va a ser unido de forma covalente a una proteína o anticuerpo de enlace de ligando, en que la proteína o anticuerpo de enlace de ligando es capaz de unir de forma específica el analito de ácido no nucleico, en que las moléculas de ADN comprenden (a) una primera hebra de un puente de ácido nucleico, y (b) una primera hebra de una molécula de ADN marcador, en que dichas dos hebras son distintas y no complementarias entre sí;

(ii) un segundo contenedor que comprende moléculas de ADN complementarias, en que las moléculas de ADN complementarias comprenden: (a)

moléculas de ADN conjugadas a un ligando, en que las moléculas de ADN son sustancialmente complementarias a la primera hebra del puente de ácido nucleico, (b) moléculas de ADN sustancialmente complementarias a la primera hebra de la molécula de ADN marcador, y (c) moléculas de ADN de hebra de desplazador que son complementarias en su totalidad o en parte a la hebra del puente de ácido nucleico; y

(iii) direcciones para detectar un analito de ácido no nucleico utilizando el kit.

3. El kit de acuerdo con la reivindicación 2, en que las moléculas de ADN activadas son activadas con disuccinimidil suberato.

4. El kit de acuerdo con la reivindicación 2, en que las moléculas de ADN activadas son activadas con éster maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida disuccinimidil suberato.

5. El kit de acuerdo con la reivindicación 2, en que el ligando es biotina.

6. Un kit para etiquetar proteínas, polipéptidos o péptidos, que comprende:

(i) un primer contenedor que comprende moléculas de ADN activadas químicamente utilizando disuccinimidil suberato para ser unidas de forma covalente a una proteína o anticuerpo de unión de ligando, en que las moléculas de ADN son (a) una primera hebra de un puente de ácido nucleico, y (b) una primera hebra de una molécula de ADN marcador, en que dichas dos hebras son distintas y no complementarias entre sí; y

(ii) un segundo contenedor que comprende moléculas de ADN de hebra de desplazador que son complementarias en su totalidad o en parte a la hebra del puente de ácido nucleico; y

(iii) direcciones para etiquetar proteínas, polipéptidos o péptidos utilizando el kit.

(SEQ ID NO:1)

Avidina/Biotina (C12) - GAGCTCGATCGTCCCAGTCTGAAGTCCTA 3'
 |||||
 3' TAGCAGGGTCAGACTTCAGGAT - (C12) - Ab
 (SEQ ID NO:2)
 más

3' CTCGAGCTAGCAGGGTCAGACTTCAGG 5'
 (SEQ ID NO:3)

a

Avidina/Biotina (C12) - GAGCTCGATCGTCCCAGTCTGAAGTCCTA 3'
 |||||
 ||||| TAGCAGGGTCAGACTTCAGGAT - (C12) - Ab
 3' CTCGAGCTAGCAGGGTCAGACTTCAGG 5'

a

Avidina/Biotina (C12) - GAGCTCGATCGTCCCAGTCTGAAGTCCTA 3'
 |||||
 3' CTCGAGCTAGCAGGGTCAGACTTCAGG 5'
 más
 TAGCAGGGTCAGACTTCAGGAT - (C12) - Ab

FIG. 1A

Alk Phos-(C12)-GTGCTTCCTCTTTCT (SEQ ID NO:8)
 |||||
 3' CACGAAGGAGAAAGACACACAG-(C12) - Biotina/Avidina (SEQ ID NO:9)
 (PNA) 5' CTTCCCTCTTTCTGTGTGT (SEQ ID NO:11)

más

a

(PNA) 5' CTTCCCTCTTTCTGTGTGT
 Alk Phos-(C12)-GTGCTTCCTCTTTCT |||||
 |||||
 3' CACGAAGGAGAAAGACACACAG-(C12) - Avidina/Biotina

a

(PNA) 5' CTTCCCTCTTTCTGTGTGT
 |||||
 3' CACGAAGGAGAAAGACACACAG-(C12) - Avidina/Biotina
 Alk Phos-(C12)-GTGCTTCCTCTTTCT

más

FIG. 1B

Fig. 2

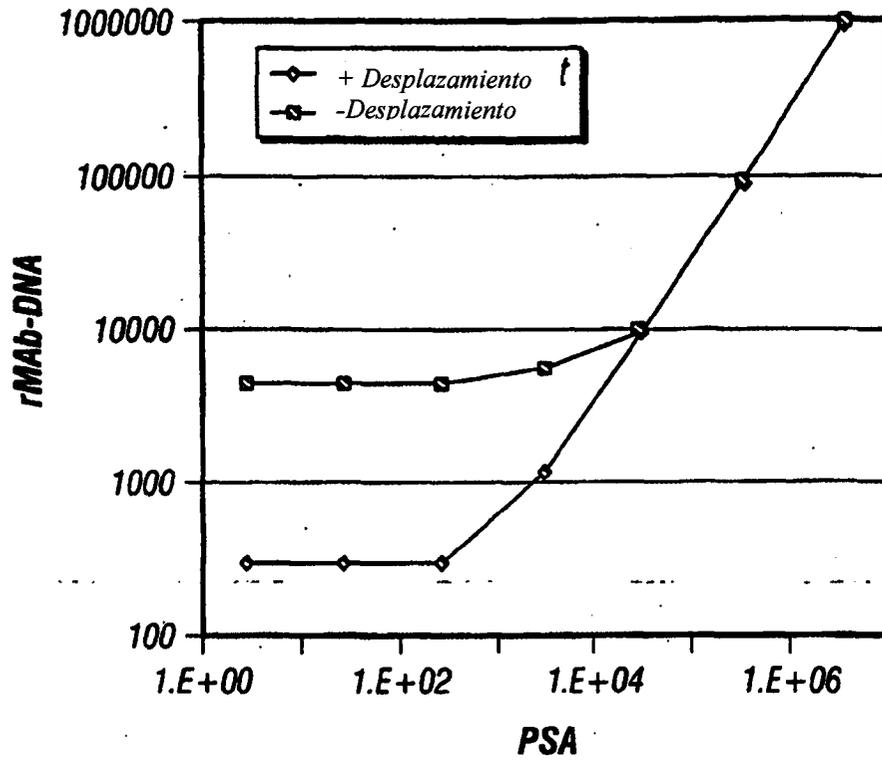


Fig. 3

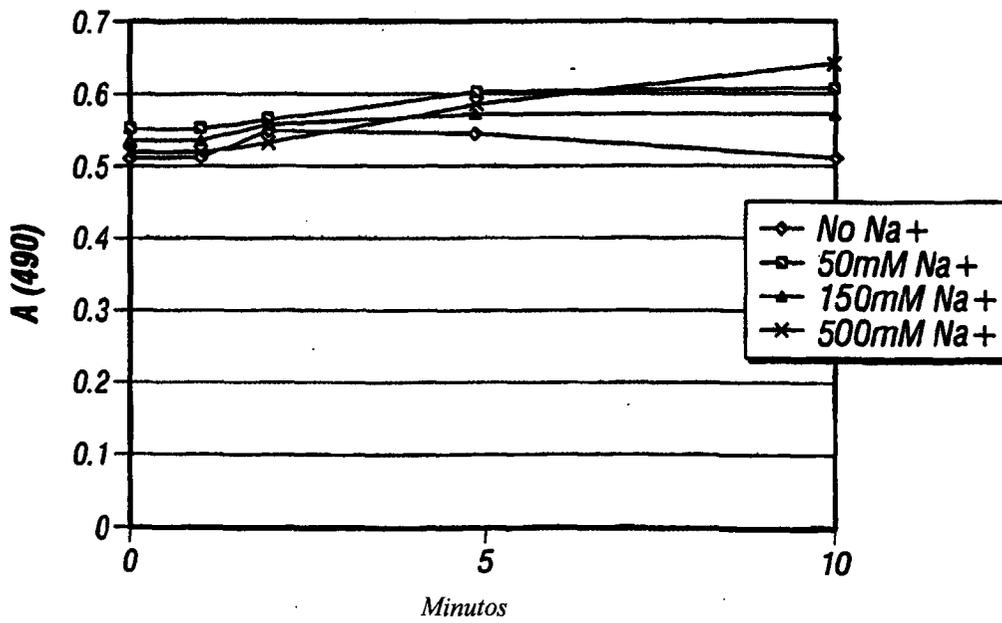


Fig. 4

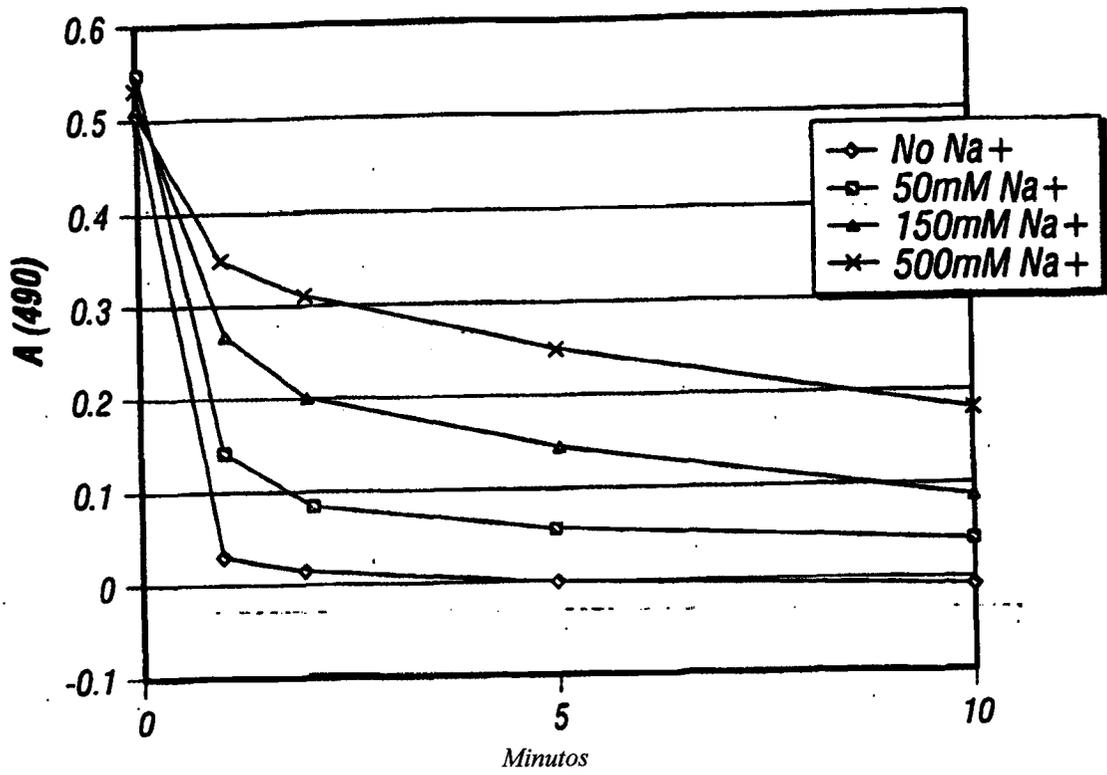
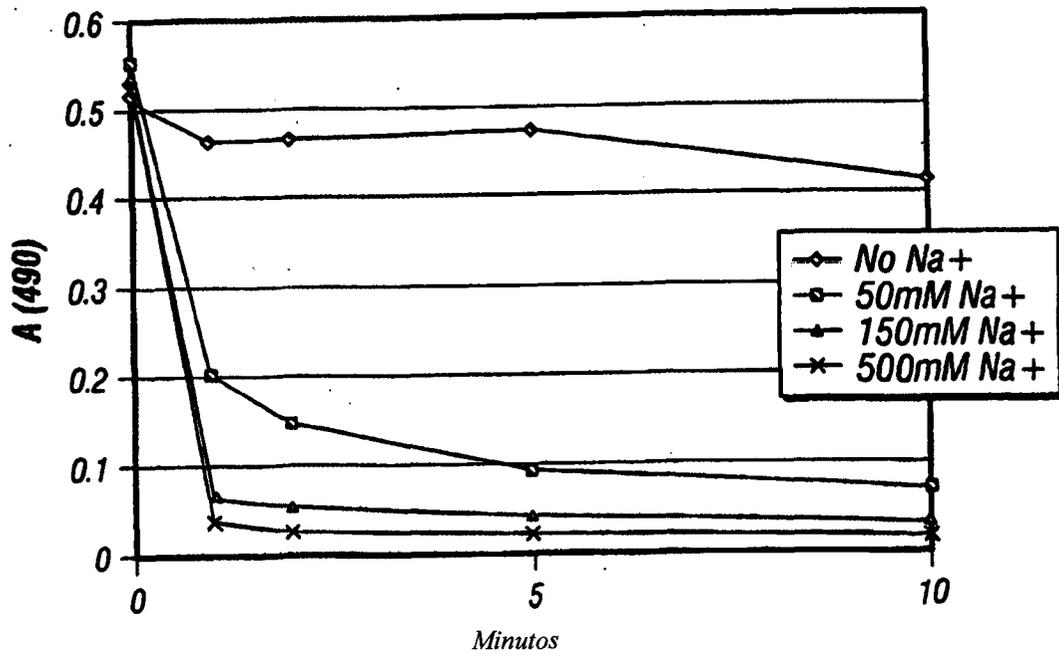
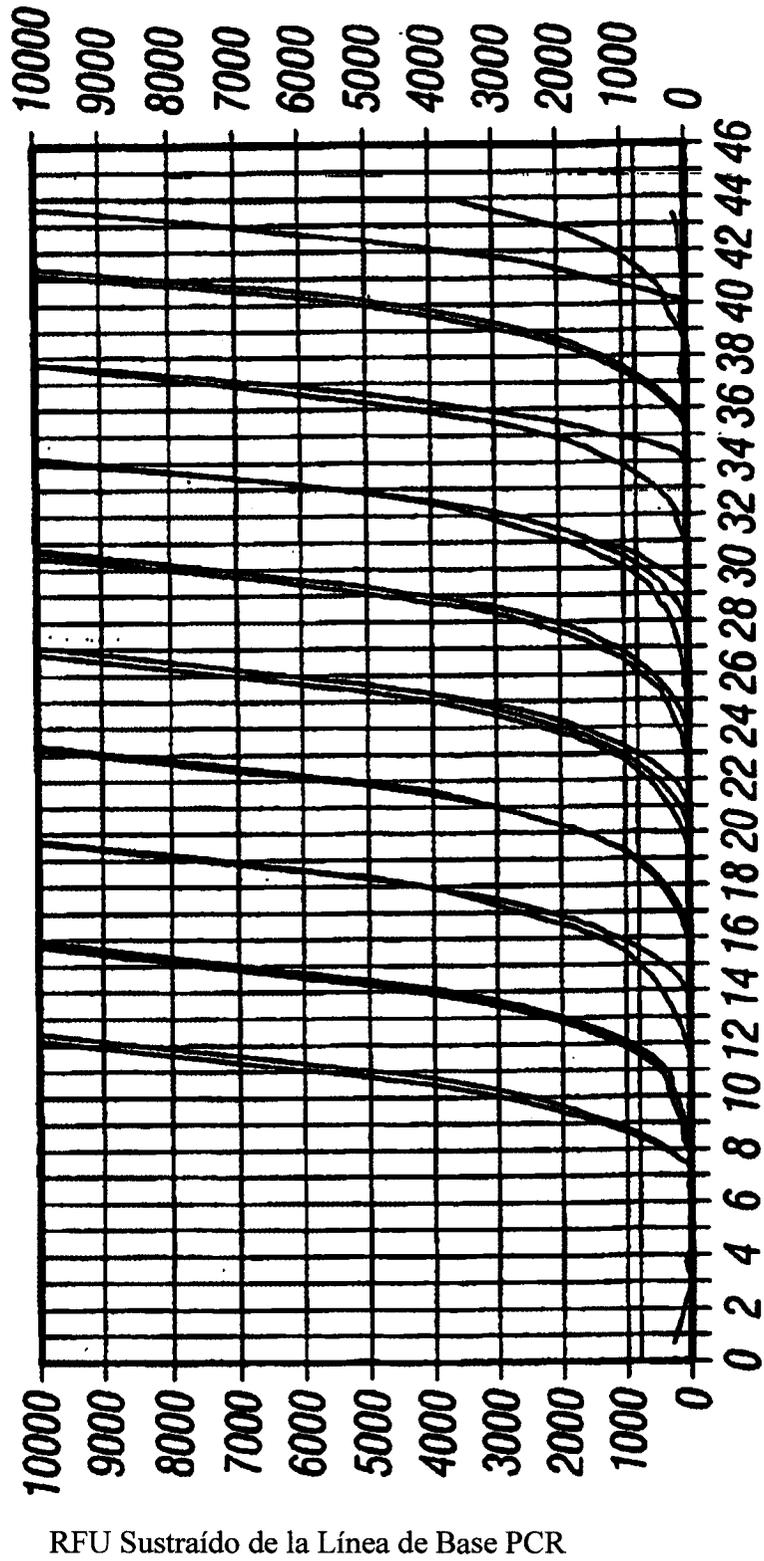


Fig. 5





Amplicación de PCB vs. Ciclo: 072202.cpd

FIG. 6A

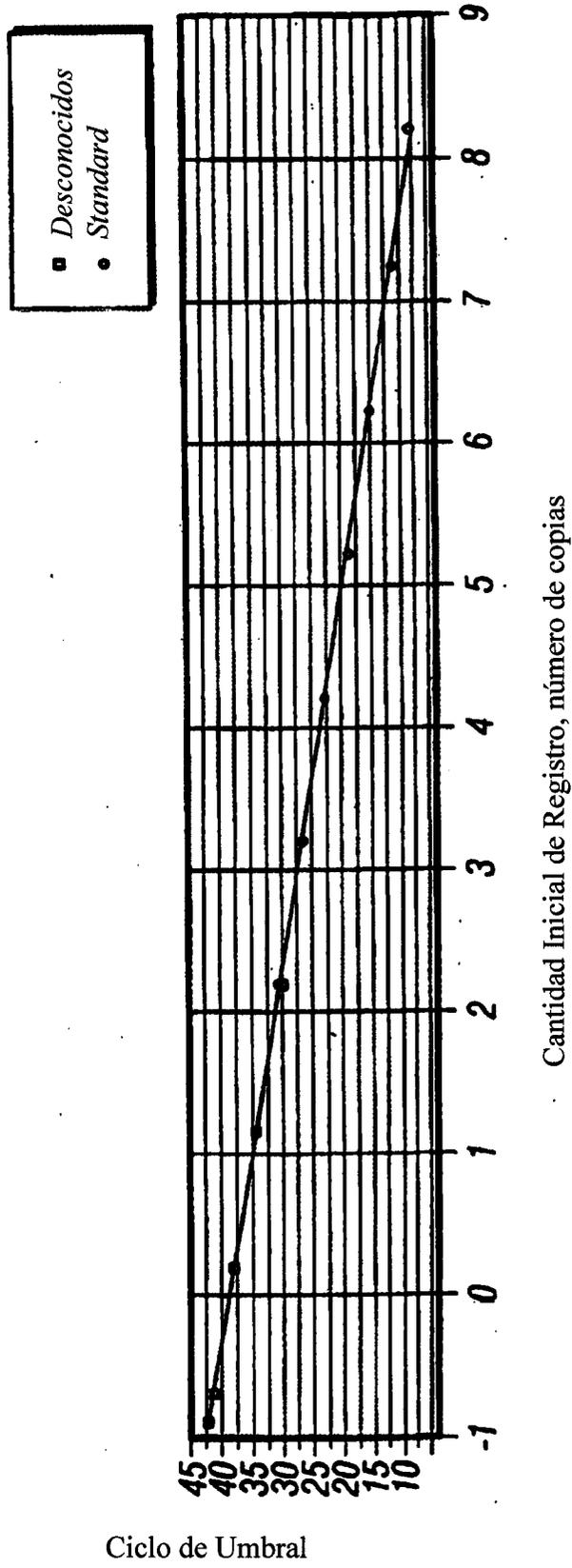


FIG. 6B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es para facilitar la comprensión del lector únicamente. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido un cuidado extremado a la hora de recopilar las referencias, no pueden descartarse errores u omisiones, y la EPO declina cualquier responsabilidad a este respecto.

- **Documentos de patente citados en la descripción:**

- EP 1249500 A [0007]
- US 5985548 A [0008] [0070]
- US 5888834 A [0010]
- US 5702896 A, Collins [0010]
- US 4376110 A [0027]
- US 4946778 A [0029]
- WO 0041524 A [0043] [0053]
- US 5270184 A [0043] [0053]
- US 5766849 A [0043] [0053]

- **Documentos no de patente citados en la descripción:**

- SANO et al. *Science*, 1992, vol. 258, 120-22 [0003]
- JOERGER et al. *Clin Chem*, 1995, vol. 41, 1371-77 [0006]
- HENDRICKSON et al. *Nucleic Acids Res*, 1995, vol. 23, 522-529 [0006]
- MORRISSEY et al. *Anal Biochem*, 1989, vol. 181, 345-359 [0010]
- MCKIE et al. *J. Immunol. Meth.*, 2002, vol. 261, 167175 [0011]
- KÖHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-7 [0027]
- KOSBOR et al. *Immunology Today*, vol. 4, 72 [0027]
- COTE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 2026-30 [0027]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0027]
- MORRISON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0028]
- TAKEDA et al. *Nature*, 1995, vol. 314, 452-54 [0028]
- BIRD. *Science*, 1988, vol. 242, 423-26 [0029]
- HUSTON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 85, 5879-83 [0029]
- WARD et al. *Nature*, 1989, vol. 334, 544-46 [0029]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-81 [0030]
- TYAGI ; KRAMER. *Nat Biotechnol*, 1996, vol. 14, 303-308 [0034]
- TYAGI et al. *Nat Biotechnol*, 2000, vol. 18, 1191-96 [0034]
- SAMBROOK ; RUSSELL. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2001 [0043]
- WU ; WALLACE. *Genomics*, 1989, vol. 4, 560 [0043]
- WU, D.Y. ; R.B. WALLACE. *Genomics*, 1989, vol. 4, 560 [0053]
- WALKER. *Sci*, 2002, vol. 296, 557-58 [0055]
- SUGAWARA et al. *Clin Chem. Act*, 2000, vol. 299, 45-54 [0070]
- SAITO et al. *Clin Chem.*, 1999, vol. 45 (5), 665-669 [0070]
- FURUYA et al. *J. Immunol. Methods*, 2000, vol. 238, 173-180 [0070]
- JOERGER et al. *Clin Chem*, 1995, vol. 41 (9), 1371-1377 [0070]
- HENDRICKSON et al. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 6115-28 [0070]
- JABLONSKI et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23 (3), 522-29 [0070]
- HERMANSON. *Bioconjugate Techniques*, 1996, 639-666 [0070]
- WALKER. *Science*, 2002, vol. 296, 557-58 [0079]