

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 564**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2007 E 07861621 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2069790**

54 Título: **Superficies de unión para ensayos de afinidad**

30 Prioridad:

**01.11.2006 US 863820 P**

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

**09.06.2015**

73 Titular/es:

**BECKMAN COULTER, INC. (100.0%)  
250 S. KRAEMER BOULEVARD  
BREA, CA 92821 , US**

72 Inventor/es:

**SOLDO, JOSHUA C. y  
SACKRISON, JAMES L.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 537 564 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**

Superficies de unión para ensayos de afinidad

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a soportes que tienen superficies de unión que están insaturadas o insaturadas y orientadas, incluidos soportes que tienen superficies de unión que contienen ligandos para usar en ensayos de afinidad. Aspectos particulares de la invención se refieren a superficies de unión que contienen biotina o biotina y un conector de ligando específico de biotina, tal como estreptavidina (SA). Se proporcionan superficies de unión para inmunoensayos, que incluyen superficies de unión que contienen antígenos o anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Otras realizaciones de la presente invención se refieren a superficies de soporte sólido bloqueadas y micropartículas dispersadas. Se proporcionan métodos para preparar y utilizar tales soportes.

**15 Antecedentes de la invención**

Se utilizan superficies de unión en una amplia variedad de aplicaciones que incluyen, por ejemplo, ensayos de afinidad. Las superficies de unión convencionales normalmente se preparan maximizando la cantidad de conectores de ligando por unidad de área superficial de la superficie de soporte en fase sólida. Aunque el método convencional proporciona una superficie de soporte con una elevada cantidad de conectores de ligando, maximizar únicamente el número de conectores de ligando sobre la superficie de soporte no siempre mejora el rendimiento de la superficie de unión. Algunas superficies de unión convencionales utilizadas en ensayos de afinidad maximizan la capacidad de unión depositando directamente un conector de ligando tal como un anticuerpo, o un conector de ligando específico de biotina tal como SA, sobre una fase sólida y bloqueando la fase sólida con albúmina de suero bovino (BSA) u ovoalbúmina. A pesar de que esto maximiza la capacidad de unión a antígeno o biotina de la superficie de unión, los respectivos anticuerpos o conectores de ligando específicos de biotina se acumulan sobre la superficie de unión sin una orientación específica, y las estrategias de bloqueo tradicionales no evitan ni atenúan necesariamente el desprendimiento de la superficie de unión de los anticuerpos o los conectores de ligando específicos de biotina. Además, el desprendimiento puede dar lugar a una baja sensibilidad del ensayo (relación señal-ruido por debajo del nivel óptimo), exactitud, precisión, estabilidad o factibilidad de producción, o combinaciones de las mismas. La acumulación y la orientación aleatoria en la superficie de unión puede disminuir la eficacia o capacidad de unión de la superficie de unión debido a impedimentos estéricos. En consecuencia, se necesitan superficies de unión y composiciones y métodos mejorados para preparar superficies de unión mejoradas que no dependan simplemente de maximizar la densidad de conectores de ligando sobre la superficie de unión.

35 El documento US-2004/0072262 se refiere a métodos y sistemas para detectar péptidos de unión MHC de clase 1.

El documento WO 2005/010026 se refiere a métodos para detectar la activación de células T mediante péptidos de unión MHC.

40 El documento US-6.638.728 se refiere a superficies recubiertas con una elevada capacidad de captar moléculas diana.

El documento DE-197 24 787 se refiere a superficies recubiertas con estreptavidina.

45 El documento US-4.480.042 se refiere a reactivos en forma de partícula con un índice de refracción elevado y con enlace covalente y su uso en inmunoensayos de dispersión de luz.

El documento US-5.728.588 se refiere al recubrimiento de superficies hidrófobas para volverlas resistentes a proteínas y permitir, simultáneamente, el anclaje covalente de ligandos específicos.

50 El documento EP-1.650.565 se refiere a la inhibición de la adsorción no específica de la superficie del material base.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona:

55 (1) Una superficie de unión insaturada en forma de micropartículas para un ensayo de afinidad, que consta de:

a) un soporte en forma de micropartícula;

60 b) acoplado covalentemente a una superficie del soporte, comprendiendo al menos un acoplador a soporte una proteína,

donde la proteína se selecciona del grupo compuesto por albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de ellos;

65 c) un ligando acoplado a la proteína,

donde el ligando está presente a una densidad de  $2 \times 10^{-2}$  hasta  $2 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte,

- 5 además, donde el ligando es biotina y donde la biotina está presente en una proporción molar de biotina respecto a proteína inferior o igual a 5:1; y
- 10 d) un copolímero en bloque en contacto con la superficie del soporte de ensayo, en donde la molécula del copolímero en bloque consta de un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por al menos dos grupos de cola hidrófilos, y donde el grupo de cabeza hidrófobo está en contacto con el soporte en forma de micropartícula.
- (2) La superficie de unión en forma de micropartículas de (1) en donde el ligando está presente a una densidad de
- 15 (a) de  $1,9 \times 10^{-2}$  a  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte,
- (b) de  $1,9 \times 10^{-2}$  a  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o
- 20 (c) de  $1,6 \times 10^{-2}$  a  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte.
- (3) La superficie de unión en forma de micropartículas de (1) en donde, en el copolímero en bloque, la longitud de las dos o más colas hidrófilas puede ser independientemente entre sí de 2 hasta 2,5 veces la longitud del grupo de cabeza hidrófobo.
- 25 (4) La superficie de unión en forma de micropartículas de (1) en donde el soporte de ensayo en forma de micropartículas consta de un polímero o copolímero orgánico que es hidrófobo.
- (5) La superficie de unión en forma de micropartículas de (1) en donde el soporte en forma de micropartículas consta de un material paramagnético o superparamagnético.
- 30 (6) La superficie de unión en forma de micropartículas de (1) en donde la proteína es BSA y el ligando es biotina, donde además
- 35 la biotina está presente a una densidad de  $1,9 \times 10^{-2}$  hasta  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte, y
- la BSA está presente a una densidad de  $1,6 \times 10^{-2}$  a  $2,9 \times 10^{-2}$  micromoles de BSA por metro cuadrado de soporte.
- (7) La superficie de unión en forma de micropartículas de (3) que contiene además un conector de ligando que es al menos bivalente que está acoplado con la biotina.
- 40 (8) La superficie de unión en forma de micropartículas de (7) en donde el conector de ligando se selecciona del grupo consistente en avidina, estreptavidina (SA), neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos, preferiblemente en donde el conector de ligando es estreptavidina.
- 45 (9) La superficie de unión en forma de micropartículas de (7) que contiene además un resto de captura asociado con el conector de ligando.
- (10) La superficie de unión en forma de micropartículas de (9) en donde el resto de captura está biotinilado.
- 50 (11) La superficie de unión en forma de micropartículas de (3) en donde las moléculas del copolímero en bloque constan cada una de un polímero donde el grupo de cabeza hidrófobo es un bloque de óxido de polipropileno y los grupos de cola hidrófilos son cada uno bloques de óxido de polietileno.
- 55 (12) Una dispersión en una solución acuosa de una multitud de micropartículas de (3) y un copolímero en bloque que tiene un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por al menos dos grupos de cola hidrófilos.
- (13) La dispersión de micropartículas de (12) en donde el soporte de ensayo en forma de micropartículas consta de un polímero o copolímero orgánico que es hidrófobo.
- 60 (14) La dispersión de micropartículas de (12) en donde el soporte en forma de micropartículas consta de un material paramagnético o superparamagnético.
- (15) La dispersión de micropartículas de (12) en donde la proteína se selecciona del grupo compuesto por BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina, o mezclas de los mismos.
- 65

(16) La dispersión de micropartículas de (12) que consta además de un conector de ligando que es al menos bivalente que está acoplado con la biotina.

(17) La dispersión de micropartículas de (12) en donde el conector de ligando se selecciona del grupo compuesto por avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos, preferiblemente en donde el conector de ligando es estreptavidina.

(18) La dispersión de micropartículas de (12) que contiene además un resto de captura asociado con el conector de ligando.

(19) La dispersión de micropartículas de (12) en donde el resto de captura está biotinilado.

Se describen superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas, métodos para preparar superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas, y métodos para preparar componentes de superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas. También se proporcionan métodos y composiciones para superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas para ensayos de afinidad, tales como, por ejemplo, inmunoensayos.

En otro aspecto, en este documento se describen métodos y composiciones para preparar un resto de captura insaturado o insaturado y orientado para un inmunoensayo, donde el resto de captura está insaturado o insaturado y orientado debido a la unión con una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada. En una realización específica, el resto de captura consta de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, donde el resto de captura está inmovilizado sobre la superficie de unión insaturada o insaturada y orientada mediante asociación con un ligando inmovilizado sobre un acoplador a soporte, donde el acoplador a soporte está inmovilizado sobre un soporte en fase sólida. En una realización específica, la inmunoglobulina o el fragmento de la misma está biotinilado, la inmunoglobulina o el fragmento de la misma biotinilado está asociado con un conector de ligando específico de biotina (grupo de unión a biotina), y el conector de ligando específico de biotina está asociado con biotina anclada al soporte directamente o mediante un acoplador a soporte. En una realización específica, el acoplador a soporte consta de una proteína, y el soporte en fase sólida consta de una micropartícula.

En otro aspecto, en este documento se describe un método para realizar un inmunoensayo utilizando un soporte que tiene una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada; donde el método comprende el uso de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma para captar un analito, donde la inmunoglobulina o el fragmento de la misma está insaturada y orientada sobre la superficie de unión. En varias realizaciones, la naturaleza insaturada o insaturada y orientada de la inmunoglobulina o el fragmento de la misma se determina mediante la naturaleza insaturada o insaturada y orientada de la superficie de unión con la que está unida la inmunoglobulina o el fragmento de la misma.

En otro aspecto, en este documento se describe un soporte que tiene una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada que contiene ligandos acoplados con el soporte, tanto directamente como indirectamente mediante acoplamiento con un acoplador a soporte que está acoplado al soporte, donde los ligandos están presentes a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o de aproximadamente  $0,5 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o alternativamente los ligandos están presentes a una densidad de aproximadamente  $0,5 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $10 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por miligramo (mg) de micropartículas, o de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $5,5 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por mg de micropartículas. En varias realizaciones, los acopladores a soporte están presentes en el soporte de ensayo a una densidad de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado a aproximadamente  $7,5 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado de soporte de ensayo. En varias realizaciones, los ligandos están asociados con conectores de ligando, donde los conectores de ligando están presentes a una densidad de menos de aproximadamente  $0,4 \times 10^{-2}$  a menos de aproximadamente  $8 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado de soporte de ensayo.

Las realizaciones descritas en este documento van dirigidas a tener un resto de captura presente sobre el soporte de ensayo a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  micromoles por metro cuadrado a aproximadamente  $2,0 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado de soporte de ensayo. En varias realizaciones, la superficie de unión consta además de un grupo de captura, donde el resto de captura está presente a una densidad de menos de aproximadamente  $2 \times 10^{-3}$  a menos de aproximadamente  $4 \times 10^{-2}$  micromoles de resto de captura por metro cuadrado de soporte. En una realización específica, el ligando (por ejemplo, biotina) está presente a una densidad de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, el conector de ligando (por ejemplo, un grupo de unión a biotina tal como SA) está presente a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $5,0 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado de soporte, o de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-2}$  a menos de aproximadamente  $4,6 \times 10^{-2}$  micromoles de conector de ligando por metro cuadrado de soporte, y la unidad de captura (por ejemplo, una unidad de captura biotinilada como por ejemplo un anticuerpo biotinilado específico del analito) está presente a una densidad de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $1,4 \times 10^{-2}$  micromoles de unidad de captura por metro cuadrado de soporte. En al menos una realización descrita en este documento, el acoplador a soporte es opcional. En este tipo de realización, el ligando podría ser biotina o un derivado de la misma.

En una realización específica, el ligando consta de biotina o un derivado de la misma. En otra realización específica, el conector de ligando consta de un grupo de unión a biotina, o un fragmento del mismo, tal como, por ejemplo, avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos. En varias realizaciones, el resto de captura consta de uno o más de un anticuerpo, un fragmento de unión de un anticuerpo, un receptor, un ligando de un receptor, una hormona, un receptor de una hormona, una enzima, un sustrato de una enzima, un oligonucleótido de una hebra, un polinucleótido de una hebra, un oligonucleótido de dos hebras, un polinucleótido de dos hebras, un antígeno, un péptido o una proteína. En varias realizaciones, los ligandos están acoplados con el soporte mediante acopladores a soporte, y los acopladores a soporte están a su vez acoplados con el soporte. En una realización específica, los acopladores a soporte constan de proteínas. En una realización específica, la proteína es BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos. En una realización específica, el soporte es una micropartícula. En una realización específica, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1 \times 10^2$  a aproximadamente  $5 \times 10^1$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o alternativamente, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $2 \times 10^2$  a aproximadamente  $2 \times 10^1$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte. En otra realización específica, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1,9 \times 10^2$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^1$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte. En otra realización específica, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1,6 \times 10^2$  a aproximadamente  $6,6 \times 10^2$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte. En otra realización específica, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1,6 \times 10^2$  a aproximadamente  $3,2 \times 10^2$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte. En otra realización específica, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1,6 \times 10^2$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^1$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte.

En varias realizaciones, la superficie de unión contiene un ligando y conector anclado al ligando y un resto de captura anclado al conector de ligando, donde el resto de captura está presente a una densidad, en varias realizaciones, de aproximadamente un 75% de la densidad del ligando, de aproximadamente un 50% de la densidad del ligando y de aproximadamente un 25% de la densidad del ligando.

En una realización específica, el ligando consta de biotina, la biotina está acoplada con el soporte mediante una proteína acopladora a soporte seleccionada de entre BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos, la biotina está anclada a un conector de ligando que contiene un grupo de unión a biotina seleccionado de entre avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos, y el grupo de unión de biotina está anclado a un resto de captura biotinilado, donde el resto de captura se selecciona del grupo compuesto por uno o más de un anticuerpo, un fragmento de unión de un anticuerpo, un receptor, un ligando de un receptor, una hormona, un receptor de una hormona, una enzima, un sustrato de una enzima, un oligonucleótido de una hebra, un oligonucleótido de dos hebras, un polinucleótido de una hebra, un polinucleótido de dos hebras, un antígeno, un péptido o una proteína.

En otro aspecto, en este documento se describe un soporte que tiene una superficie de unión insaturada y orientada que contiene: una multitud de acopladores a soporte dispuestos sobre el soporte y ligandos acoplados con los acopladores a soporte; donde los ligandos están insaturados y orientados sobre la superficie de modo que proporciona ligandos estéricamente accesibles. En una realización específica, los ligandos están asociados con conectores de ligandos bivalentes o multivalentes capaces de asociarse específicamente con los ligandos, y la superficie de unión está sustancialmente libre de ligando libre no unido.

En varias realizaciones, los acopladores a soporte están acoplados con una cantidad de aproximadamente  $1,9 \times 10^2$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^1$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte.

Los acopladores a soporte pueden acoplarse con el soporte mediante una asociación covalente o no covalente. En varias realizaciones, los acopladores a soporte están covalentemente acoplados con el soporte. En las realizaciones en las que los acopladores a soporte están covalentemente acoplados con el soporte, puede utilizarse cualquier química de enlace adecuada conocida en la materia para anclar el acoplador a soporte al soporte. Los grupos de unión adecuados incluyen, sin estar limitados a los mismos, anclaje mediante uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo compuesto por carboxilo, hidroxilo tosilo, epoxi, aldehído, amina, amida, hidrazida, isotiocianato, maleimida y sulfhidrilo. En una realización específica, el acoplador a soporte está covalentemente acoplado con el soporte utilizando una reacción con tosilo para el anclaje.

Los acopladores a soporte pueden constar de cualquier sustancia adecuada que pueda acoplarse con un soporte y también con un ligando. El acoplamiento con el soporte y el acoplamiento con el ligando puede ser covalente. Los acopladores a soporte adecuados incluyen, sin estar limitados a los mismos, macromoléculas tales como, por ejemplo, proteínas y otros polímeros. En varias realizaciones, el acoplador a soporte consta de una proteína. La proteína puede ser, por ejemplo, un monómero, un dímero, un multímero, o una proteína de fusión. En realizaciones específicas, la proteína consta de al menos una albúmina tal como, por ejemplo, BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

En varias realizaciones, los ligandos constan de biotina. Los reactivos de biotina adecuados para anclar biotina a una superficie de soporte incluyen reactivos de marcaje de biotina reactivos frente a aminas tales como, por ejemplo, sulfo-NHS-biotina, sulfo-NHS-LC-biotina, sulfo-NHS-LC-LC-biotina, sulfo-NHS-SS-biotina, NHS-PEO<sub>4</sub>-biotina, NHS-biotina, NHS-LC-biotina, NHS-LC-LC-biotina, PFP-biotina, TFP-PEO-biotina o NHS-iminobiotin trifluoroacetamida, reactivos de marcaje de

5 biotina reactivos frente a sulfhidrilo tales como, por ejemplo, maleimida-PEO<sub>2</sub>-biotina, biotina-BMCC, PEO-yodoacetil biotina, yodoacetil-LC-biotina o biotina-HPDP, reactivos de marcaje de biotina reactivos frente a carboxilos tales como, por ejemplo, biotina PEO-amina o biotina PEO-LC-amina, reactivos de marcaje de biotina reactivos frente a carbohidratos tales como, por ejemplo, biocitín hidrazida, biotín hidrazida o biotín-LC-hidrazida, o reactivos de marcaje de biotina fotorreactiva tales como, por ejemplo, psoraleno-PEO-biotina. En una realización específica, el ligando consta de biotina y está anclado al soporte o al acoplador a soporte que utiliza el reactivo de marcaje de biotina reactivo frente a aminas sulfo-NHS-LC-biotina.

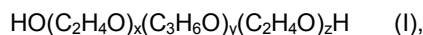
10 En realizaciones en las que los ligandos constan de biotina, la superficie de unión sobre el soporte puede contener además un conector de ligando asociado con la biotina. En determinadas realizaciones, el conector de ligando consta de un grupo de unión a biotina. En varias realizaciones, el grupo de unión a biotina consta de proteína, por ejemplo, al menos una proteína de unión a biotina tal como avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos. El grupo de unión a biotina también podría constar de una proteína de fusión tal como, por ejemplo, avidina fusionada con una proteína de unión diferente.

15 En varias realizaciones, los acopladores a soporte constan de una proteína y el ligando consta de biotina, y la proteína está biotinilada con una baja proporción de carga de biotina, de forma que los acopladores a soporte tienen una proporción de incorporación inferior o igual a 5 moles de biotina por mol de acoplador a soporte. En una realización específica, la proteína es BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

20 En varias realizaciones, cuando la superficie de unión sobre el soporte consta de un grupo de unión a biotina, la superficie de unión sobre el soporte también consta de un resto de captura biotinilado asociado con un grupo de unión a biotina. El resto de captura biotinilado puede constar de un espaciador, por ejemplo, estando el espaciador entre el grupo biotina y el grupo de captura. El resto de captura biotinilado puede constar de cualquier resto de captura adecuado según la sustancia que se debe captar. Los restos de captura adecuados incluyen al menos uno de un anticuerpo, un fragmento de unión de un anticuerpo, un receptor, un ligando de un receptor, una hormona, un receptor de una hormona, una enzima, un sustrato de una enzima, un oligonucleótido de una hebra, un oligonucleótido de dos hebras, un polinucleótido de una hebra, un polinucleótido de dos hebras, un antígeno, un péptido o una proteína.

25 En varias realizaciones, la superficie de unión sobre el soporte también consta de un copolímero en bloque que contiene un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por al menos dos colas hidrófilas, donde el grupo de cabeza hidrófobo está en contacto con el soporte.

30 La longitud de las colas hidrófilas puede ser, independientemente entre sí, de aproximadamente 2 a aproximadamente 2,5 veces la longitud del grupo de cabeza. El copolímero en bloque puede constar de una estructura de fórmula general I, teniendo un bloque de óxido de polipropileno y un bloque de óxido de polietileno,



35 donde x e y se seleccionan de forma que el bloque de óxido de polipropileno se asocia con el soporte. En una realización específica, x es de aproximadamente 100 a aproximadamente 135, y es de aproximadamente 40 a aproximadamente 75 y z es de aproximadamente 100 a aproximadamente 135. En otras realizaciones, x es de aproximadamente 110 a aproximadamente 125, y es de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 y z es de aproximadamente 110 a aproximadamente 125. En varias realizaciones, el copolímero en bloque tiene un peso molecular medio de aproximadamente 12.700 dalton (Da) a 17.400 Da; o un peso molecular medio de aproximadamente 9000 a aproximadamente 18.000 Da. En realizaciones específicas, el copolímero en bloque tiene un peso molecular medio de aproximadamente 9840 a aproximadamente 14.600 Da. En una realización específica, el copolímero en bloque tiene un peso molecular medio de aproximadamente 14.600 Da. En otra realización específica, el copolímero en bloque tiene un peso molecular medio de aproximadamente 12.600 Da.

40 En varias realizaciones, el soporte consta de un polímero o copolímero orgánico. En varias realizaciones, el polímero o copolímero orgánico es hidrófobo. Los polímeros adecuados incluyen, pero de forma no excluyente, poliestireno, poli(divinilbenceno), copolímero estireno-acilato, copolímero estireno-butadieno, copolímero estireno-divinilbenceno, poli(estireno-oxietileno), polimetil metacrilato, poliuretano, poli glutaraldehído, polietilenimina, polivinilpirrolidona, N,N'-metilen bis acrilamida, poliolefina, polietileno, polipropileno, polivinilcloruro, poliacrilonitrilo, polisulfona, poli(etersulfona), materiales pirolizados, copolímeros en bloque, y copolímeros de los anteriores, siliconas o sílice. En una realización específica, el soporte consta de estireno y divinilbenceno, y está recubierto con una capa de poliuretano.

45 En varias realizaciones, utilizar un polímero o copolímero que sea hidrófobo dará lugar a un soporte con un ángulo de contacto con agua de más de aproximadamente 60 grados. En varias realizaciones, utilizar un polímero o copolímero que sea hidrófobo dará lugar a un soporte con un ángulo de contacto con agua de más de aproximadamente 70 grados.

50 En varias realizaciones, el soporte consta de una micropartícula. En una realización específica, la micropartícula consta de un material paramagnético o superparamagnético tal como, por ejemplo, óxido de hierro ferromagnético Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> o Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Los términos "paramagnético" y "superparamagnético" se refieren a materiales que experimentan una fuerza en un gradiente de campo magnético, pero que no se magnetizan de forma permanente. En una realización específica, el soporte consta de hierro en forma de maghemita, o Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. En varias realizaciones, el

diámetro medio de la micropartícula está en el intervalo de 100 nm a 22.900 nm. En una realización específica, el diámetro medio de la micropartícula está en el intervalo de 750 nm a aproximadamente 3000 nm. En otra realización específica, el diámetro medio de la micropartícula está en el intervalo de 950 nm a aproximadamente 1150 nm.

5 En otro aspecto, se proporciona un soporte modificado para un ensayo de afinidad que consta de: un soporte que consta de uno o más materiales seleccionados del grupo compuesto por poliestireno, poli(divinilbenceno), copolímero estireno-acilato, copolímero estireno-butadieno, copolímero estireno-divinilbenceno, poli(estireno-oxietileno), polimetilmetacrilato, poliuretano, poliglutaraldehído, polietilenimina, polivinilpirrolidona, N,N'-metilén bis acrilamida, poliolefina, polietileno, polipropileno, polivinilcloruro, poli(acrilonitrilo), polisulfona, poli(etersulfona), materiales pirrolizados, copolímeros en bloque, y copolímeros de los anteriores, siliconas o sílice; una proteína covalentemente anclada al  
10 soporte, donde la proteína consta de biotina, y donde hay menos de 5 moles de biotina acoplados por mol de proteína; un grupo de unión a biotina asociado con la biotina, donde el grupo de unión a biotina es al menos bivalente; un resto de captura biotinilado asociado con el grupo de unión a biotina, donde el resto de captura biotinilado se selecciona del grupo compuesto por al menos uno de un anticuerpo, un fragmento de unión de un anticuerpo, un receptor, un ligando de un receptor, una hormona, un receptor de una hormona, una enzima, un sustrato de una enzima, un oligonucleótido de una hebra, un oligonucleótido de dos hebras, un polinucleótido de una hebra, un polinucleótido de dos hebras, un antígeno, un péptido o una proteína; un copolímero en bloque que está en contacto con el soporte, donde el copolímero en bloque consta de un grupo de cabeza de óxido de polipropileno flanqueado por colas de óxido de polietileno, donde el grupo de cabeza de óxido de polipropileno está en contacto con el soporte, y donde la longitud de las colas de óxido de polietileno es independientemente entre sí de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 2,5 veces la longitud del  
20 grupo de cabeza de óxido de polipropileno, y donde el peso molecular medio del copolímero en bloque es de aproximadamente 9840 Da a aproximadamente 17.400 Da. El soporte modificado puede constar de una micropartícula. En una realización específica, la micropartícula consta de un material paramagnético o superparamagnético tal como Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, y el diámetro medio de la micropartícula está en el intervalo de 950 nm a 1150 nm. En una realización específica, el resto de captura biotinilado consta de una inmunoglobulina o fragmento de la misma.

25 En otro aspecto, se describe un método para recubrir un soporte que comprende: combinar ligandos y acopladores a soporte en una proporción de carga de ligando respecto a acopladores a soporte de forma que se obtiene una mezcla de complejos ligando::acoplador a soporte donde los complejos ligando::acoplador a soporte están al menos sustancialmente libres de ligando libre; y anclar covalentemente a un soporte los complejos ligando::acoplador a soporte. En una realización específica, la proporción de carga de ligandos respecto a acopladores a soporte es inferior o igual a 8 moles de ligando:1 mol de acoplador a soporte. Alternativamente, la proporción de carga de ligandos respecto a acopladores a soporte es inferior o igual a 4 moles de ligando:1 mol de acoplador a soporte.

35 En una realización específica, los ligandos del método constan de biotina, donde el ligando consta de un reactivo de marcaje de biotina reactivo frente a aminos tal como sulfo-NHS-LC-biotina.

40 En varias realizaciones, los acopladores a soporte constan de una proteína y el ligando consta de biotina, y la proteína está biotinilada en una baja proporción de carga de biotina, de forma que los acopladores a soporte tienen una proporción de incorporación inferior o igual a 5 moles de biotina por mol de acoplador de soporte. En una realización específica, la proteína es BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

45 En otro aspecto, se describe un método para recubrir micropartículas que comprende: exponer las micropartículas a un dispersante para formar una dispersión, donde las micropartículas constan de superficies de unión que contienen ligandos y acopladores a soporte que están acoplados para dar complejos ligando::acoplador a soporte y el dispersante consta de un copolímero en bloque que tiene un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por grupos de cola hidrófilos; y exponer la dispersión a conectores de ligando que se asocian con los ligandos de los complejos ligando::acoplador a soporte.

50 En una realización específica del método de recubrimiento, el ligando consta de biotina y está acoplado al soporte o al acoplador a soporte con un reactivo de marcaje de biotina reactivo frente a aminos tal como sulfo-NHS-LC-biotina. En varias realizaciones, los acopladores a soporte constan de proteína, como se ha descrito previamente para soportes que tienen una superficie insaturada o insaturada y orientada. En una realización específica, la proteína consta de BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

55 En varias realizaciones del método de recubrimiento, el conector de ligando consta de un grupo de unión a biotina. En una realización específica, el grupo de unión a biotina es al menos bivalente y consta de al menos uno de entre avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos.

60 En varias realizaciones, el método de recubrimiento también comprende asociar un resto de captura biotinilado con el grupo de unión a biotina. En una realización específica del método de recubrimiento, el resto de captura biotinilado consta de al menos uno de entre un anticuerpo, un fragmento de unión de un anticuerpo, un receptor, un ligando de un receptor, una hormona, un receptor de una hormona, una enzima, un sustrato de una enzima, un oligonucleótido de una hebra, un oligonucleótido de dos hebras, un polinucleótido de una hebra, un polinucleótido de dos hebras, un antígeno, un péptido o una proteína. En una realización específica, el resto de captura biotinilado contiene un espaciador.

65 En otro aspecto, se describe un método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, que comprende: preparar una mezcla de grupos de asociación a analito con grupos de llenado del espacio para

5 formar una mezcla diluida; y exponer la mezcla a un soporte de ensayo bajo unas condiciones suficientes para que los grupos de asociación a analito y los grupos de llenado del espacio se acoplen con el soporte y formen una superficie insaturada o insaturada y orientada que está insaturada respecto al número de grupos de asociación a analito que están acoplados con la superficie de soporte. En este documento, un grupo de asociación a analito puede ser cualquier molécula, tal como una proteína, anticuerpo o ácido nucleico, que cuando está unida a la superficie de soporte se asocia directa o indirectamente mediante una molécula de unión con un analito de interés; es decir, forma parte de la superficie de unión. En este documento, un grupo de llenado del espacio puede ser cualquier molécula, tal como una proteína, anticuerpo o ácido nucleico, que cuando está unida a la superficie de soporte no se asocia ni directa ni indirectamente mediante una molécula de unión con un analito de interés. El grupo de llenado del espacio no forma parte de la superficie de unión, sino que tiene la función de ocupar el espacio sobre la superficie de soporte y evitar la unión de un exceso de grupos de asociación a analito.

15 En otro aspecto, se describe un método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, que consta de: diluir una mezcla de complejos ligando::acoplador a soporte con acopladores a soporte sin ligandos para formar una mezcla diluida; y exponer la mezcla diluida a un soporte bajo unas condiciones suficientes para que los complejos ligando::acoplador a soporte se acoplen con el soporte y formen una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada.

20 En varias realizaciones del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, donde el soporte consta de una micropartícula, la superficie de unión insaturada tiene de aproximadamente  $0,5 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $10 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por miligramo (mg) de micropartículas, de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $5,5 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por mg de micropartículas, o de aproximadamente  $2 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $4 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por mg de micropartículas. En realizaciones específicas del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, donde el soporte consta de una micropartícula, la superficie de unión insaturada o insaturada y orientada tiene de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $5,5 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por mg de micropartículas, o de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $4,9 \times 10^{-4}$  micromoles de ligando por mg de micropartículas.

30 En realizaciones específicas del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, el soporte es rugoso y la superficie de unión insaturada o insaturada y orientada tiene de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $2,0 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado. Alternativamente, la superficie de unión tiene de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado. En otras realizaciones específicas del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, el soporte es liso y la superficie de unión insaturada o insaturada y orientada tiene de aproximadamente  $3,3 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado. En otras realizaciones específicas del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, la superficie de unión rugosa insaturada o insaturada y orientada tiene de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de acoplador a soporte por metro cuadrado, y la superficie de unión lisa insaturada o insaturada y orientada tiene de aproximadamente  $2,7 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-2}$  micromoles de acoplador a soporte por metro cuadrado. El término "rugoso" incluye una morfología en forma de coliflor o porosa. El término "liso" se refiere a una morfología sustancialmente lisa y sustancialmente esférica. Para micropartículas con el mismo diámetro, la superficie de soporte "rugosa" tendrá más área superficial de soporte que la superficie de soporte "lisa" debido a la mayor superficie de soporte que ofrecen los surcos, hoyos o poros de la superficie de soporte rugosa. Los micromoles reales de acoplador a soporte, ligando, conector de ligando, grupo de captura, etc. se encontrarán en algún punto entre las áreas superficiales de soporte rugoso y liso calculadas, puesto que no toda el área superficial del soporte rugoso estará estéricamente disponible para el anclaje del ligando, o del acoplador a soporte.

50 En varias realizaciones del método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, el acoplador a soporte consta de proteína, como se ha descrito previamente para el soporte que tiene una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada. En una realización específica, la proteína consta de BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

55 En otro aspecto, se describe un método para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada sobre un soporte, que comprende: preparar una mezcla de complejos ligando::acoplador a soporte en cualquier proporción de carga de ligando respecto a acoplador a soporte; diluir la mezcla de complejos ligando::acoplador a soporte con acoplador a soporte que no esté formando un complejo con el ligando para dar lugar a una mezcla diluida; y exponer la mezcla diluida a un soporte bajo unas condiciones suficientes para que los complejos ligando::acoplador a soporte y el acoplador a soporte se acoplen con el soporte y formen una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada. Entonces, el soporte que contiene el ligando puede tratarse según cualquier método adecuado descrito en este documento.

60 El acoplador a soporte puede constar de uno o más de entre una proteína o polímero no proteico. En varias realizaciones, el ligando está formando un complejo con el acoplador a soporte mediante grupos funcionales sobre el acoplador a soporte. Una fracción del número de grupos funcionales sobre uno o más acopladores a soporte puede eliminarse o neutralizarse antes de exponer el acoplador a soporte al ligando, reduciendo así el número de ligandos que pueden formar un complejo con el acoplador a soporte. Todos o solo algunos de los acopladores a soporte expuestos al ligando en la preparación de la mezcla de complejos ligando::acoplador a soporte pueden tener uno o más grupos funcionales neutralizados.



En otro aspecto, en este documento se describe una superficie de unión para un inmunoensayo, donde la superficie de unión consta de una multitud de ligandos que son capaces de unirse al conector de ligando que puede unirse al resto de captura de interés. Los ligandos de la superficie de unión están insaturados o insaturados y orientados sobre un soporte, y los ligandos están o bien (a) anclados directamente al soporte o bien (b) anclados mediante un acoplador a soporte y el acoplador a soporte está anclado al soporte. En varias realizaciones, la superficie de unión está sustancialmente libre de ligandos libres (es decir, no unida). En una realización específica, el soporte consta de una micropartícula, del orden de aproximadamente una micra a aproximadamente cinco micras de diámetro, el ligando consta de biotina y la biotina está formando un complejo con un acoplador a soporte que consta de proteína. En realizaciones específicas, el ligando consta de biotina, el conector de ligando consta de una proteína de unión a biotina, el acoplador a soporte consta de BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos, y la BSA, ovoalbúmina, fragmento de BSA, fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos están biotinilados mediante una biotinilación de baja proporción de carga. En una realización específica, la proteína de unión a biotina es SA, y un anticuerpo biotinilado está presente sobre la superficie de unión recubierta con SA, donde el anticuerpo biotinilado se selecciona de forma que pueda captar un analito de interés en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo competitivo o tipo sándwich. La superficie de unión sobre el soporte del inmunoensayo puede prepararse utilizando cualquier método adecuado descrito en este documento.

En otro aspecto, se describe un soporte que tiene una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada que consta de: una multitud de acopladores a soporte dispuestos sobre el soporte; y ligandos acoplados con los acopladores a soporte; donde los acopladores a soporte están presentes sobre el soporte a una densidad de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $7,1 \times 10^{-2}$  micromoles por metro cuadrado del soporte. En varias realizaciones, el acoplador a soporte consta de una proteína. En una realización específica, la proteína es BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos. En varias realizaciones, el ligando consta de biotina. En una realización específica, la biotina está presente a una densidad de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte. En varias realizaciones, la superficie de unión contiene un conector de ligando capaz de asociarse específicamente con los ligandos. En varias realizaciones, el conector de ligando está presente a una densidad de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $4,6 \times 10^{-2}$  micromoles de conector de ligando por metro cuadrado de soporte. En varias realizaciones, el conector de ligando es avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos. En varias realizaciones, la superficie de unión contiene además un resto de captura capaz de asociarse específicamente con el conector de ligando. En varias realizaciones, el resto de captura está presente a una densidad de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $1,4 \times 10^{-2}$  micromoles de resto de captura por metro cuadrado de soporte. En una realización específica, el resto de captura consta de una inmunoglobulina o fragmento de la misma.

En otro aspecto, se proporciona un soporte que tiene una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada que consta de: una multitud de acopladores a soporte dispuestos sobre el soporte; y ligandos acoplados con los acopladores a soporte; donde los acopladores a soporte están presentes sobre el soporte a una densidad de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $2,1 \times 10^{-4}$  micromoles de acoplador a soporte por mg del soporte. En varias realizaciones, el ligando consta de biotina. En una realización específica, la biotina está presente a una densidad de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $4,9 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de soporte. En varias realizaciones, la superficie de unión contiene un conector de ligando capaz de asociarse específicamente con los ligandos. En varias realizaciones, el conector de ligando está presente a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $1,4 \times 10^{-4}$  micromoles de conector de ligando por mg de soporte. En varias realizaciones, el conector de ligando es avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos. En varias realizaciones, la superficie de unión contiene además un resto de captura capaz de asociarse específicamente con el conector de ligando. En varias realizaciones, el resto de captura está presente a una densidad de aproximadamente  $2,1 \times 10^{-5}$  a aproximadamente  $4,1 \times 10^{-5}$  micromoles de resto de captura por mg de soporte. En una realización específica, el resto de captura consta de una inmunoglobulina biotinilada o fragmento de la misma.

En otro aspecto, se describe una superficie de unión sobre un soporte, donde la superficie de unión se une específicamente a no más de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de soporte. En una realización específica, el soporte consta de micropartículas y se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-5}$  a no más de aproximadamente  $4,0 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de micropartículas. En una realización específica, el soporte consta de micropartículas y se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $7,5 \times 10^{-5}$  a aproximadamente  $3,5 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de micropartículas. En otra realización específica, el soporte consta de micropartículas y se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $3,0 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de micropartículas. En varias realizaciones, el soporte consta de biotina anclada al soporte (directamente o mediante un acoplador a soporte) asociada con un grupo de unión a biotina, tal como, por ejemplo, SA, y las capacidades de unión a biotina anteriores se refieren a la capacidad del grupo de unión a biotina (por ejemplo, SA) de unirse a biotina libre.

En otro aspecto, se describe una superficie de unión sobre un soporte, donde la superficie de unión se une específicamente a no más de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-1}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte. En una realización específica, el soporte se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $3,0 \times 10^{-4}$  a no más de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-1}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte. En una realización específica, el soporte se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $8,9 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $1,2 \times 10^{-1}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte. En una realización específica, el soporte se une específicamente a una cantidad de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $9,9 \times 10^{-2}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte. En

varias realizaciones, el soporte consta de biotina anclada al soporte (directamente o mediante un acoplador a soporte) asociada con un grupo de unión a biotina, tal como, por ejemplo, SA, y las capacidades de unión a biotina anteriores se refieren a la capacidad del grupo de unión a biotina (por ejemplo, SA) de unirse a biotina libre.

5 A menos que se haga constar de otro modo, o algo diferente esté implícito en la descripción, cualquiera de las realizaciones descritas en relación con cualquier método o composición descritas en este documento puede utilizarse junto con cualquiera de las demás realizaciones descritas en este documento.

**Breve descripción de las figuras**

10 La Fig. 1A ilustra un proceso de preparación de una SA insaturada y orientada sobre una superficie de unión de una micropartícula paramagnética (PMP).

La Fig. 1B es una continuación del proceso ilustrado en la Fig. 1A.

15 La Fig. 2 ilustra una realización de la invención que consta de un superficie de soporte sólida; BSA o ovoalbúmina anclada covalentemente a la superficie de soporte; biotina anclada covalentemente a la BSA o ovoalbúmina; estreptavidina, neutravidina o avidina asociada con la biotina; y un anticuerpo biotinilado asociado con la estreptavidina, neutravidina o avidina.

20 La Fig. 3 ilustra algunas orientaciones posibles de la molécula de biotina sobre una molécula de BSA en un método de biotinilación de baja proporción de carga.

La Fig. 4 ilustra el recubrimiento de una fase sólida con BSA biotinilada de baja proporción de carga para hacer una superficie de unión insaturada.

25 La Fig. 5 ilustra el uso de copolímeros en bloque como agentes de bloqueo para superficies de soporte en fase sólida.

La Fig. 6 ilustra el uso de copolímeros en bloque como agentes de dispersión para superficies de unión que contienen biotina.

30 La Fig. 7 ilustra el recubrimiento de una superficie de unión biotinilada, bloqueada con un copolímero en bloque, con SA.

La Fig. 8 ilustra la aplicación de varios restos de captura biotinilados a una superficie de unión recubierta con SA sobre una superficie de soporte en fase sólida preparada según la invención.

35 La Fig. 9A ilustra una superficie de unión convencional o estándar en forma de micropartículas recubierta con SA recubierta con un anticuerpo biotinilado o fragmento Fab.

La Fig. 9B ilustra una micropartícula recubierta con SA insaturada y orientada recubierta con un anticuerpo biotinilado o un fragmento Fab.

40 La Fig. 10, en los cuadros A y B, ilustra el área aumentada de superficie capaz de unirse asociada con el uso de una etapa de dispersión de la invención.

45 La Fig. 11 ilustra el análisis de desprendimiento de biotina de un soporte sólido de biotina-BSA recubierto con SA tras 3 días a 4 °C o 37 °C.

La Fig. 12 muestra los datos en forma de tabla de los estudios de reproducibilidad del proceso (factibilidad de producción) del Ejemplo 6.

50 La Fig. 13 muestra los datos en forma de tabla de otros estudios de reproducibilidad del proceso (factibilidad de producción) del Ejemplo 6.

La Fig. 14A muestra los datos en forma de tabla de los estudios de estabilidad mejorada del Ejemplo 7.

55 La Fig. 14B es una continuación de la tabla de la Fig. 14A, que muestra los datos de los estudios de estabilidad mejorada del Ejemplo 7.

La Fig. 15A ilustra los resultados del análisis de desprendimiento.

60 La Fig. 15B es otra ilustración de los resultados del análisis de desprendimiento.

La Fig. 16A muestra los datos en forma de tabla de los cálculos de densidad superficial de unión real del Ejemplo 11, para varios lotes de micropartículas preparados según las realizaciones de la invención.

La Fig. 16B muestra los datos en forma de tabla de los cálculos de densidad superficial de unión real de micropartículas preparadas según las realizaciones de la invención, derivados de los datos de micropartículas utilizando una hipótesis de rugosidad.

5 La Fig. 16C muestra más datos en forma de tabla de los cálculos de área superficial de unión suponiendo una superficie de soporte lisa, para varios lotes de micropartículas preparados según las realizaciones de la invención.

La Fig. 16D muestra datos en forma de tabla de los cálculos de densidad superficial de unión suponiendo una superficie de soporte lisa preparada según las realizaciones de la invención, derivados de los datos de micropartículas.

10

La Fig. 17 es una ilustración esquemática de la diferencia entre una superficie insaturada de la invención y una superficie insaturada y orientada de la invención.

### Descripción detallada

15

La presente invención se basa al menos en parte en la constatación de que diseñar superficies de unión: (a) asociando una cantidad de ligando inferior que la de saturación proporciona complejos que contienen restos de captura que están escasamente dispersos por la superficie de unión del soporte en una orientación espacial accesible y, de forma opcional, (b) colocando aleatoriamente ligandos y, a su vez, otros grupos componentes de complejos que contienen restos de captura, en una orientación estructural (física) lineal o casi lineal, puede proporcionar superficies de unión con calidades más deseables para realizar ensayos, tales como ensayos de afinidad (*por ejemplo*, inmunoensayos o ensayos con ácidos nucleicos), que diseñar superficies de unión simplemente abarrotando la superficie de soporte aumentando la densidad de ligandos.

20

Los métodos convencionales para preparar superficies de unión normalmente pretenden maximizar la cantidad de ligando por unidad de área de soporte sin tener en cuenta la accesibilidad y/u orientación de los ligandos, lo cual da lugar con frecuencia a una acumulación de ligandos sobre el soporte. Maximizar los ligandos por unidad de área sobre una superficie de unión puede llevar a la degradación del rendimiento de la superficie de unión debido, al menos en parte, a efectos estéricos. La degradación del rendimiento también puede ser debida al desprendimiento del exceso de ligando de la superficie de unión.

25

En este documento, acoplado con, o sus equivalentes gramaticales, significa una unión o interacción covalente o no covalente entre dos grupos. El término acoplado con no pretende connotar una orientación o dirección del acoplamiento.

30

En este documento, el término “proteína de fusión” abarca proteínas recombinantes (tales como proteínas quiméricas), proteínas híbridas y proteínas derivadas sintéticamente. Su uso es conocido en la materia.

35

Las superficies insaturadas o insaturadas y orientadas según la invención incluyen superficies de unión que se construyen acoplado una cantidad de ligando menor que la de saturación sobre un soporte (por ejemplo, mediante anclaje directo al soporte o mediante anclaje a un acoplador a soporte que está anclado al soporte). Una superficie de unión que está “insaturada” respecto al ligando es una superficie de unión que tiene una densidad de ligando por unidad de área superficial de soporte por debajo de la máxima o una densidad de ligando por unidad de peso de soporte por debajo de la máxima. En una realización específica de la presente invención, los ligandos de la superficie de unión insaturada están orientados en el espacio. En este documento, el término orientado en el espacio, o sus equivalentes gramaticales, se refiere a grupos que están dispersos por una distancia o área. En otras palabras, los grupos están orientados o repartidos sobre la superficie de soporte de forma que sustancialmente no está en contacto con el vecino más cercano.

40

Una densidad de ligando por unidad de área superficial de soporte “por debajo de la máxima” se refiere a una superficie de unión que no está saturada respecto al número de ligandos que pueden estar presentes sobre la superficie de soporte. Por ejemplo, una superficie de soporte que está saturada con ligandos tiene el máximo porcentaje de ligando que puede colocarse sobre la superficie de soporte en unas condiciones determinadas, representado por un 100% (*por ejemplo*, un complejo determinado ligando::acoplador a soporte, donde el acoplador a soporte está saturado con ligando y el complejo se dispone a la máxima densidad posible sobre un soporte en unas condiciones que promueven el máximo anclaje del complejo ligando::acoplador a soporte al soporte).

50

Las superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas pueden ser particularmente deseables para superficies de unión que se emplean en inmunoensayos. La mayoría de inmunoensayos emplean una superficie de unión sobre un soporte. En muchas de estas aplicaciones, el soporte es una micropartícula o una placa de microtitulación, donde el grupo que capta el analito, por ejemplo, el antígeno, se añade sobre otras moléculas para formar complejos que contienen el resto de captura que se une al analito. Un ejemplo no limitante de esto es un inmunoensayo que tiene una inmunoglobulina inmovilizada sobre una micropartícula. La inmunoglobulina puede inmovilizarse directamente sobre el soporte, o la inmunoglobulina puede acoplarse (*por ejemplo*, covalentemente) a otras moléculas que están, a su vez, inmovilizadas sobre el soporte. En este documento se describe la reparación de una superficie de unión insaturada para ambas situaciones. Se proporcionan ejemplos detallados para la situación en la que la inmunoglobulina, o un fragmento de la misma, no está directamente anclada al soporte, sino que está asociada con otros grupos que están anclados al soporte.

60

El término “acoplado” incluye (a) unión covalente (por ejemplo, mediante uno o más enlaces carbono-carbono, enlaces carbono-nitrógeno, enlaces carbono-oxígeno, etc., tanto directa como indirectamente) y (b) unión no covalente (tanto indirecta como directamente).

5 Se pueden acoplar covalentemente entidades que se sabe que interaccionan específicamente entre ellas. Un ejemplo no limitante de entidades que se sabe que interaccionan específicamente y que pueden acoplarse covalentemente es un antígeno y su anticuerpo específico, las cuales pueden hacerse anclar covalentemente mediante, por ejemplo, reacción de acoplamiento.

10 Se pueden acoplar covalentemente entidades que no interaccionan específicamente entre ellas. Un ejemplo no limitante de entidades que no se sabe que interaccionen específicamente entre ellas y que pueden acoplarse covalentemente es SA y BSA, las cuales pueden hacerse anclar covalentemente mediante, por ejemplo, reacción de acoplamiento.

15 Ejemplos de unión no covalente incluyen enlaces de afinidad, iónicos, van der Waals (por ejemplo, fuerzas dipolo/dipolo o London), de hidrógeno (por ejemplo, entre estructuras dobles de polinucleótidos) e interacciones hidrófobas. Cuando la asociación es no covalente, la asociación entre las entidades es preferiblemente específica. Ejemplos no limitantes de asociaciones no covalentes específicas incluyen la interacción de unión entre biotina y una proteína de unión a biotina tal como avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos; la unión de un Fab biotinilado, una inmunoglobulina biotinilada o un fragmento de los mismos, 20 una molécula pequeña biotinilada (tal como, por ejemplo, una hormona o un ligando de un receptor), un polinucleótido biotinilado, una macromolécula biotinilada (por ejemplo, una proteína o un polímero natural o sintético) a una proteína de unión a biotina tal como avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos; la unión de un sustrato con su enzima; la unión de una glicoproteína con una lectina específica de la glicoproteína; la unión de un ligando con un receptor específico del ligando; la unión de un anticuerpo con un antígeno contra el cual se ha creado el anticuerpo; y formación de estructuras dobles entre un polinucleótido y un polinucleótido complementario o sustancialmente complementario, etc.

Se proporcionan ejemplos particulares de una micropartícula que tiene una proteína biotinilada (complejo ligando::acoplador a soporte) anclada a la micropartícula, donde la proteína biotinilada está recubierta de SA (unidad 30 de unión a biotina) y luego la micropartícula recubierta de SA-proteína biotinilada se recubre con una inmunoglobulina biotinilada o un fragmento biotinilado de la misma (resto de captura biotinilado) el cual se usa para captar un analito en un ensayo o para unirse a otra inmunoglobulina o fragmento de la misma que se utiliza para captar un analito en un ensayo (*por ejemplo*, IgG de cabra x ratón biotinilada se utiliza para captar un antígeno1 x IgG de ratón, el cual se utiliza para captar antígeno1). La naturaleza insaturada de la proteína biotinilada sobre la superficie de soporte se refleja en el recubrimiento con SA, el cual también está insaturado debido a la naturaleza 35 insaturada de la biotina con la cual se asocia, lo cual conlleva la insaturación de la inmunoglobulina biotinilada (o el fragmento de inmunoglobulina biotinilada) que capta el analito, o la insaturación de la inmunoglobulina biotinilada (o fragmento de inmunoglobulina biotinilada) que capta la inmunoglobulina o fragmento adicionales que capta el analito.

40 En varias realizaciones de la presente invención, el ligando puede tener enlace covalente con el acoplador a soporte o enlace no covalente con el acoplador a soporte. En una realización específica, el ligando tiene un enlace covalente con el acoplador a soporte y el conector de ligando es al menos bivalente. En otra realización específica, el ligando es biotina y tiene un enlace covalente con el acoplador a soporte y el conector de ligando es al menos un grupo bivalente, tal como estreptavidina, avidina o neutravidina, o un fragmento de estreptavidina, un fragmento de avidina, 45 un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos. En realizaciones en las que el conector de ligando es al menos bivalente, acoplar covalente el ligando al acoplador a soporte puede proporcionar una superficie de unión más estable, ya que se reduce o suprime el desprendimiento del exceso de ligando.

En otras realizaciones, acoplar covalentemente el ligando al acoplador a soporte es opcional. Por ejemplo, cuando el 50 ligando es un fragmento de anticuerpo con un único sitio de unión, el ligando no puede acoplarse no covalentemente al acoplador a soporte.

Como consecuencia, la invención incluye métodos y composiciones para proporcionar una cantidad insaturada de un resto de captura para un inmunoensayo, donde el resto de captura está insaturado debido a la unión a una superficie 55 de soporte insaturada. En varias realizaciones, el resto de captura puede utilizarse para captar otros restos de captura. Por ejemplo, un soporte recubierto de biotina-BSA (complejo ligando::acoplador a soporte), recubierto de SA (conector de ligando), que está recubierto de una IgG de ratón x cabra biotinilada puede recubrirse además con, por ejemplo, IgG x TSH, que puede entonces utilizarse para calcular analito TSH.

60 La densidad de los componentes sobre una superficie de soporte puede expresarse de diversas formas. Para soportes en forma de partículas, tal como, por ejemplo, micropartículas, es conveniente analizar la densidad de un componente de la superficie de unión en términos de unidad de peso de micropartícula, por ejemplo, micromoles del componente (por ejemplo, ligandos, tal como biotina; conectores de ligando, tal como SA; restos de captura, tal como IgG biotinilada específica del analito; etc.) por mg de micropartículas. Para soportes que no son partículas, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación, es conveniente analizar la densidad del componente en términos de 65 área superficial del soporte, tales como, por ejemplo, micromoles de conector de ligando por metro cuadrado. La

densidad del componente sobre una superficie de soporte puede expresarse para un ligando (por ejemplo, la biotina de las micropartículas de biotina-BSA de los ejemplos, en términos de unión a biotina) o cualquier componente que se añade sobre la superficie de soporte (por ejemplo, en las micropartículas de biotina-BSA de los ejemplos, en términos de SA unida a la micropartícula, o inmunoglobulina biotinilada específica del analito unida a SA).

5 Debido a la cantidad inferior a la de saturación del ligando acoplado (directa o indirectamente mediante, por ejemplo, una proteína) al soporte, las sucesivas capas de conectores de ligando estarán insaturadas, y la densidad de los conectores de ligando encima de la capa de ligando anclado al soporte comprenderá una densidad sucesivamente más pequeña (por ejemplo, micromoles sucesivamente más pequeños por mg de micropartícula o por metro cuadrado). Por tanto, para el ejemplo de una micropartícula biotinilada según la invención, la densidad de SA sobre la superficie de soporte será inferior a la densidad del acoplador a soporte BSA, la cual será inferior a la densidad del ligando biotina (estimado antes de la adición de SA) sobre la superficie de soporte.

15 Como consecuencia, en varias realizaciones para un soporte en forma de partículas tal como una micropartícula de aproximadamente 1,0 micras de diámetro, o para un soporte que no está en forma de partículas (por ejemplo, una placa de microtitulación), donde el acoplador a soporte es significativamente mayor que el ligando (por ejemplo, un acoplador a soporte de albúmina tiene un P.M. de aproximadamente 66.000 Da, y un ligando biotina tiene un P.M. de aproximadamente 244 Da), la densidad del conector de ligando (por ejemplo SA) es de aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 90% inferior que la densidad del complejo ligando::acoplador a soporte (por ejemplo, biotina-BSA), en varias realizaciones aproximadamente un 30% hasta aproximadamente un 70% inferior que la densidad del complejo ligando::acoplador a soporte, y en varias realizaciones de aproximadamente un 40% hasta aproximadamente un 60% inferior que la densidad del complejo ligando::acoplador a soporte. En una realización específica, el conector a ligando consta de un grupo de unión a biotina, tal como, por ejemplo, SA y el ligando consta de biotina acoplada con un acoplador a soporte, tal como, por ejemplo, BSA u ovoalbúmina o mezclas de los mismos, o un fragmento de BSA u ovoalbúmina o mezclas de los mismos.

25 En varias realizaciones, un grupo de captura, anclado a un conector de ligando, en las que el conector a ligando está a su vez asociado con un ligando, también está insaturado. La densidad del resto de captura sobre la micropartícula o el soporte que no está en forma de partícula en varias realizaciones es de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 90% inferior que la densidad del conector de ligando, en varias realizaciones de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 70% inferior que la densidad del conector de ligando, y en varias realizaciones de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 60% inferior que la densidad del conector de ligando.

35 Otra forma de expresar el nivel de saturación es en comparación con la cantidad máxima de ligando que puede acoplarse al soporte. En varias realizaciones, una superficie de soporte que está insaturada respecto al ligando tendrá menos del 100% de ligando acoplado. Por ejemplo, el porcentaje de ligando sobre la superficie de soporte puede ser de aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 90% de la cantidad máxima de ligando que puede colocarse sobre la superficie de soporte. O el porcentaje de ligando sobre la superficie de soporte puede ser de aproximadamente un 20% hasta aproximadamente un 80% de la cantidad máxima de ligando que puede colocarse sobre la superficie de soporte. O el porcentaje de ligando sobre la superficie de soporte puede ser de aproximadamente un 30% hasta aproximadamente un 70% de la cantidad máxima de ligando que puede colocarse sobre la superficie de soporte. El porcentaje óptimo de ligando sobre la superficie de soporte (siendo el máximo número de ligandos el 100%) es el porcentaje (o intervalo de porcentaje) de ligando que proporciona la mejor relación señal-ruido, la menor disociación de ligando de la superficie de unión, la mayor estabilidad (a la temperatura o temperaturas relevantes para la aplicación) y una varianza relativamente baja en los estudios de validación en comparación con superficies de unión convencionales (*por ejemplo*, inferior a un 10%, más preferiblemente un 5% o inferior). Como se explica en otra parte de la presente aplicación, el acoplador a soporte es adicional. Por ejemplo, el ligado puede ser biotina, o un derivado de la misma, que está acoplada a la superficie de soporte en fase sólida.

50 Debido a la cantidad inferior a la de saturación del ligando que está acoplado (directa o indirectamente mediante, por ejemplo, una proteína) al soporte, las sucesivas capas de conectores de ligando y restos de captura estarán insaturadas, y la densidad de las sucesivas capas de conector de ligando y resto de captura encima de la capa de ligando acoplado al soporte constará de densidades sucesivamente más pequeñas (*por ejemplo*, micromoles sucesivamente más pequeños por mg de micropartícula o por metro cuadrado). Por tanto, para el ejemplo de una micropartícula biotinilada según la invención, la densidad de la IgG biotinilada (resto de captura biotinilado) sobre la superficie de soporte será inferior que la densidad de SA (grupo de unión a biotina), la densidad de SA sobre la superficie de soporte será inferior que la densidad del acoplador a soporte BSA (biotina-BSA), la cual será inferior que la densidad de la biotina (biotina-BSA; densidad de biotina estimada antes de la adición de SA) sobre la superficie de soporte.

60 En una realización específica, la superficie contiene biotina (biotina-BSA) a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  a aproximadamente  $5 \times 10^{-2}$  micromoles de biotina por mg de micropartículas, o alternativamente a una densidad de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $4,9 \times 10^{-4}$  micromoles de biotina por mg de micropartículas. En otras realizaciones, la superficie contiene BSA (biotina-BSA) a una densidad de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $4,9 \times 10^{-4}$  micromoles de BSA por mg de micropartículas, contiene SA a una densidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-4}$  a aproximadamente  $1,4 \times 10^{-4}$  micromoles de SA por mg de micropartículas, o contiene IgG biotinilada a una densidad de aproximadamente  $2,1 \times 10^{-5}$  a aproximadamente  $4,1 \times 10^{-5}$  micromoles de IgG biotinilada por mg de micropartículas. En una realización específica, una superficie de soporte rugosa contiene biotina (biotina-BSA) a

una densidad de aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de biotina por metro cuadrado, contiene BSA (biotina-BSA) a una densidad de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $2,9 \times 10^{-2}$  micromoles de BSA por metro cuadrado, contiene SA a una densidad de aproximadamente  $1,2 \times 10^{-2}$  a aproximadamente  $1,9 \times 10^{-2}$  micromoles de SA por metro cuadrado, y contiene IgG biotinilada a una densidad de aproximadamente  $2,5 \times 10^{-3}$  a aproximadamente  $5,5 \times 10^{-3}$  micromoles de IgG biotinilada por metro cuadrado.

5 Un soporte que consta de una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada que emplea cualquier ligando puede prepararse según los métodos y las composiciones de este documento. Por ejemplo, una superficie de unión a oligonucleótidos o polinucleótidos puede estar insaturada mediante unión (directa o a través de un acoplador a superficie) de un oligonucleótido o polinucleótido a una superficie a dos o tres o cuatro o más proporciones de carga seleccionadas de oligonucleótido o polinucleótido respecto al soporte o acoplador a soporte. Una proporción de carga conveniente con la que empezar es una proporción de carga conocida en la materia y luego disminuir la proporción de carga en pasos (*por ejemplo*, a la mitad, a un octavo, a un dieciseisavo, etc.), puesto que las proporciones de carga en la materia se seleccionan generalmente para maximizar la cantidad de ligando sobre la superficie de soporte. Cuando el oligonucleótido o polinucleótido está anclado a la superficie de soporte, se puede medir la eficiencia de la unión utilizando cualquier método adecuado conocido en la materia (*por ejemplo*, cuantificación de fluorescencia unida para un oligonucleótido o polinucleótido fluorescente complementario al oligonucleótido o polinucleótido ligando). Una proporción de carga adecuada de oligonucleótido o polinucleótido ligando respecto a acoplador a soporte o soporte se determina midiendo la cantidad de señal generada por la superficie (*por ejemplo*, por fluorescencia unida a oligonucleótido o polinucleótido complementario) para una cantidad fija de superficie de unión (*por ejemplo*, gramos de micropartículas de 1 micra recubiertas con el ligando oligonucleótido o polinucleótido). Se obtiene un nivel deseable de saturación cuando la proporción de la cantidad de señal respecto al peso de micropartículas (siendo todas las demás variables aproximadamente constantes) es la máxima. Este procedimiento general puede utilizarse para evaluar el nivel deseado de saturación sobre cualquier superficie de unión deseada. En este documento, un oligonucleótido es un ácido nucleico de aproximadamente 30 bases de longitud o menos y un polinucleótido es un ácido nucleico de aproximadamente 30 bases de longitud o más.

10

15

20

25 El porcentaje óptimo de ligando sobre la superficie de unión para una aplicación dada puede determinarlo cualquier experto en la materia utilizando el mismo tipo de métodos descritos en este documento para las aplicaciones basadas en biotina. Por ejemplo, si se emplea un oligonucleótido o polinucleótido como ligando en lugar de biotina, el oligonucleótido o polinucleótido puede acoplarse con un acoplador a superficie (*por ejemplo*, una proteína o nucleoproteína), y una fase sólida adecuada puede recubrirse con el oligonucleótido o polinucleótido y su acoplador a soporte. Pueden realizarse estudios de estabilidad, desprendimiento o disociación, señal-ruido y de validación de forma análoga a los descritos en este documento para obtener la cantidad óptima de ligandos por unidad de área superficial de la superficie de unión (*por ejemplo*, 10% hasta 90% del máximo, 20% hasta 80% del máximo, 30% hasta 70% del máximo, etc.). Un método conveniente sería maximizar primero la cantidad de oligonucleótido o polinucleótido por unidad de área superficial y luego emplear los métodos descritos en este documento (*por ejemplo*, a varias proporciones de carga molar baja de oligonucleótidos o polinucleótidos respecto al acoplador a soporte en la preparación de complejos ligando:acoplador a soporte) para preparar una superficie insaturada y orientada, y comparar los resultados de estabilidad, disociación, señal-ruido y de validación de las distintas preparaciones.

30

35

40 Orientar un ligando sobre una superficie incluye orientar físicamente el ligando, es decir, ajustar la colocación del ligando respecto a su entorno. Una superficie de unión que contiene una cantidad máxima de ligandos por acoplador a soporte normalmente da lugar a que muchos ligandos no sean estéricamente accesibles y a la competencia entre ligandos adyacentes poco distanciados para obtener moléculas de interés para unirse a los ligandos del complejo. En este documento, orientación física (estructural), o sus equivalentes gramaticales, significa que un grupo se manipula de forma que la mayoría de grupos estén orientados de cara a una dirección en particular. En una realización de la presente invención, el grupo está orientado de modo que el sitio de reconocimiento o el sitio de unión está sustancialmente orientado hacia fuera de la superficie de soporte. En otra realización de la invención, los grupos orientados físicamente están asociados de dos en dos.

45

50 La orientación puede conseguirse mediante los métodos de este documento para cualquier par ligando:acoplador a soporte. Un método para orientar un ligando sobre una superficie de unión es preparar complejos ligando:acoplador a superficie (se proporcionan en este documento ejemplos de complejos de biotina-BSA) a proporciones de carga molar bajas de ligando respecto a acoplador a soporte. Como se describe en otra parte de este documento, el objetivo de utilizar proporciones de carga molar bajas de ligando respecto a acopladores a soporte es preparar complejos con un número controlado de ligandos acoplados por acoplador a soporte. Conseguir un número controlado de ligandos (es decir, por debajo del máximo) por acoplador a soporte puede conllevar una mejor accesibilidad estérica de los ligandos sobre la superficie, menos interacción entre ligandos adyacentes, una distancia más uniforme (de media) entre los ligandos sobre la superficie de unión y una estabilidad mejorada proporcionando una superficie que está sustancialmente libre de ligandos libres (por ejemplo, evitar o atenuar desprendimiento de ligando).

55

60 Las composiciones y métodos de la invención incluyen mejoras para estudiar parámetros de rendimiento que incluyen sensibilidad (relación señal-ruido), exactitud, precisión de ensayo (ensayos cuantitativos), reproducibilidad de ensayo (ensayos cualitativos) y estabilidad, y para estudiar parámetros de producción tales como la reproducibilidad del proceso de producción de micropartículas paramagnéticas (factibilidad de producción de PMP) o combinaciones de los mismos. Se incluyen en la invención composiciones y métodos para: moléculas conjugadas de biotina insaturadas o insaturadas y orientadas utilizadas en ensayos de afinidad (por ejemplo, anticuerpo biotinilado insaturado o insaturado y orientado utilizado como anticuerpo de captura en fase sólida en ensayos tipos sándwich y competitivos); reducción del ruido o fondo de ensayo asociado con una unión no específica o interferencia heterófila; señal de ensayo aumentada debido a

65

- dispersión de micropartícula mejorada (área superficial disponible y tasa de colisión aumentadas; distancia de difusión de ensayo reducida); señal de ensayo aumentada debido a insaturación o insaturación y orientación de SA (libertad estérica para unir moléculas conjugadas a biotina pequeñas y grandes, mejorando así la eficiencia de unión); señal de ensayo aumentada debido a la insaturación o insaturación y orientación de moléculas conjugadas a biotina (libertad estérica para captar o unir conectores de analito grandes o pequeños (restos de captura biotinilados) y/o analitos), conector de analito mejorado (resto de captura biotinilado) y/o actividad específica de reconocimiento de analito y conector de analito (resto de captura de analito); estabilidad de producto mejorada (eficiencia de bloqueo mejorada y desprendimiento de SA de la superficie reducida); y/o robustez de inmunoensayo y reproducibilidad de proceso aumentadas debido a la optimización del proceso utilizado para preparar SA insaturada o insaturada y orientada sobre una superficie de micropartícula. En varias realizaciones, la relación señal-ruido de una superficie de soporte insaturada o insaturada y orientada puede mejorarse titulando diferentes niveles de conector de ligando (*por ejemplo*, SA) respecto a ligando (*por ejemplo*, biotina), y/o titulando diferentes niveles de resto de captura (*por ejemplo*, anticuerpo biotinilado) respecto a conector de ligando (*por ejemplo*, SA), para conseguir una relación señal-ruido óptima.
- 15 En una realización basada en una micropartícula recubierta con BSA biotinilada de baja proporción de carga bloqueada con el copolímero en bloque Pluronic® F108 (comercializado por BASF), dispersada con Pluronic® F108 y recubierta con SA, la relación señal-ruido óptima y la capacidad de enlace de IgG en inmunoensayos se obtienen utilizando cargas de anticuerpo biotinilado desde 3 hasta 6 microgramos de IgG biotinilada por mg de micropartículas. No existe un cambio significativo en la relación señal-ruido de la capacidad de unión de IgG con cargas de IgG por encima de 20 10 microgramos de IgG biotinilada por mg de micropartículas. Cargas de IgG inferiores a 3 microgramos de IgG biotinilada por mg de micropartículas dan lugar a una disminución significativa de la relación señal-ruido y la capacidad de unión de IgG y se acerca a cero a medida que la carga de anticuerpo se aproxima a cero.
- Aunque la discusión y los ejemplos de este documento, y las figuras asociadas, presentan realizaciones de la invención que emplean biotina como ligando, la invención no está limitada a superficies de unión que tienen biotina. Lo que se describe en este documento puede generalizarse a cualquier superficie de unión cuyos ligandos puedan estar insaturados o insaturados y orientados utilizando los métodos y las composiciones descritas. La descripción que sigue de superficies de unión que tienen biotina como ligando se utiliza para ilustrar determinadas composiciones y métodos para preparar superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas.
- 30 Asimismo, como se describe en otra parte de esta especificación, el acoplador a soporte es opcional. Por tanto, el acoplador a soporte es sólo una realización de la invención y la descripción del acoplador a soporte no debe interpretarse como limitante de la presente invención.
- 35 Se proporcionan superficies de unión que contienen ligandos insaturados y orientados. Las superficies de unión pueden utilizarse para crear una superficie de restos de captura adecuados para captar cualquier molécula de interés. La naturaleza insaturada y la orientación de los ligandos sobre la superficie permite la colocación de otros componentes, tales como restos de captura, cuya disposición sobre la superficie de unión refleja la naturaleza insaturada y la orientación de los ligandos subyacentes.
- 40 Se proporcionan complejos ligando::acoplador a soporte que, en varias realizaciones, se preparan empleando una proporción de carga molar baja de ligando respecto a acoplador a soporte de forma que hay un número por debajo del máximo de ligandos dispuestos sobre el acoplador a soporte según los métodos descritos en este documento, y de forma que se reduce el desprendimiento. Estos complejos se utilizan para crear una superficie de unión insaturada y orientada de la invención. Las realizaciones que utilizan una proporción de carga baja de ligando respecto a acoplador a soporte a la hora de preparar los complejos ligando::acoplador a soporte pueden ser particularmente útiles cuando se utilizan conectores de ligando bivalentes o multivalentes (tal como, por ejemplo, cuando el ligando es biotina y una proteína de unión a biotina bivalente o multivalente tal como SA es el conector de ligando).
- 45 Se proporcionan agentes de dispersión y métodos para preparar micropartículas que constan de superficies de unión, así como métodos para preparar micropartículas con superficies de unión, por ejemplo, empleando copolímeros en bloque tales como los copolímeros en bloque Pluronic® en la dispersión de micropartículas recubiertas de biotina (ligando) antes de añadir los grupos de unión a biotina tales como SA (conector de ligando). Los copolímeros en bloque Pluronic® específicos que pueden utilizarse aquí, y sus pesos moleculares medios, incluyen F108 (aproximadamente 12.700-17.400 Da, media de aproximadamente 14.600 Da) y F127 (aproximadamente 9.840-14.600 Da, media de aproximadamente 12.600 Da). La longitud del bloque de cada Pluronic® descrito en este documento es, según el fabricante, aproximada, puesto que la longitud del bloque exacta variará con los lotes. A menos que se especifique lo contrario o resulte evidente a partir de contexto, los pesos moleculares de los copolímeros en bloque se expresan en forma de pesos moleculares medios.
- 50 Se presentan métodos para preparar moléculas biotiniladas estables (*por ejemplo*, biotina BSA y biotina-ovoalbúmina) para su uso en el recubrimiento de superficies utilizadas para captar moléculas que tienen dos o más dominios de unión a biotina (*por ejemplo*, avidina, SA y neutravidina). Estas son, a su vez, útiles para unir restos de captura biotinilados que pueden captar otras moléculas de interés en ensayos de unión (*por ejemplo*, para anticuerpos biotinilados, las moléculas de interés son antígenos; para moléculas pequeñas biotiniladas, las moléculas de interés pueden ser enzimas, anticuerpos o proteínas de unión que se unen a las moléculas pequeñas; etc.). Se proporcionan ejemplos particulares para emplear BSA biotinilada de baja proporción de carga mediante el uso de una

proporción de carga molar baja de biotina al biotinilar BSA, para su uso en el recubrimiento de un soporte para capturar SA. Entonces, la SA puede formar un complejo con un resto de captura biotinilado adecuado.

5 Se presentan métodos para recubrir moléculas biotiniladas sobre un soporte para captar, orientar y asociar una cantidad inferior a la de saturación de una molécula que tiene dos o más dominios de unión a biotina (por ejemplo, avidina, SA o neutravidina). Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran una deposición de biotina-BSA de baja proporción de carga molar sobre una superficie de PMP utilizada para captar, orientar y asociar una cantidad inferior a la de saturación de SA.

10 Se presentan métodos que utilizan copolímeros como agentes de bloqueo para soportes recubiertos con moléculas biotiniladas y/o no biotiniladas. Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran el uso del copolímero tribloque Pluronic® F108 como agente de bloqueo para PMP con biotina-BSA de baja proporción de carga.

15 Se presentan métodos para utilizar copolímeros en bloque como agentes de dispersión para micropartículas recubiertas con moléculas biotiniladas y/o no biotiniladas. Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran el uso de Pluronic® F108 como agente de dispersión para PMP recubiertas con biotina-BSA de baja proporción de carga.

20 Se presentan métodos para utilizar copolímeros en bloque como agentes de dispersión para micropartículas recubiertas con moléculas biotiniladas, durante la deposición de moléculas que contienen dos o más dominios de unión a biotina (*por ejemplo*, avidina, SA y neutravidina). Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran el uso de Pluronic® F108 como agente de dispersión durante la deposición de SA sobre una superficie de PMP recubierta con biotina-BSA de baja proporción de carga (*por ejemplo*, añadiendo Pluronic® F108 para preparar una monodispersión de micropartículas de biotina-BSA de baja proporción de carga antes de añadir SA).

25 Se presentan métodos para depositar, orientar y asociar una cantidad inferior a la de saturación de una molécula que consta de dos o más sitios de unión a biotina (*por ejemplo*, avidina, SA o neutravidina) a una superficie biotinilada. Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran la deposición, la orientación y la asociación de una cantidad inferior a la de saturación de SA sobre la superficie de PMP recubierta con biotina-BSA de baja proporción de carga.

30 Se presentan métodos para asociar una cantidad inferior a la de saturación de, y opcionalmente para orientar, moléculas conjugadas con biotina sobre una superficie. Se proporcionan ejemplos particulares que ilustran la deposición, la orientación y la asociación de una cantidad inferior a la de saturación de conjugados que contienen biotina (*por ejemplo*, anticuerpos biotinilados, fragmentos Fab, moléculas pequeñas, moléculas grandes, moléculas portadoras, etc.) sobre la superficie de PMP específicamente recubierta con SA (es decir, insaturada y orientada) para su uso en ensayos de afinidad tales como, por ejemplo, inmunoensayos.

35 Los ensayos de afinidad incluyen ensayos que determinan la presencia o la ausencia de un analito en una muestra, y/o cuantifican la cantidad de analito en una muestra, directa o indirectamente, en base a una interacción específica o relativamente específica entre el analito y una molécula que se une preferentemente al analito. Los ensayos de afinidad incluyen ensayos que dependen, al menos en algún aspecto, de una afinidad de unión específica o relativamente específica de una entidad por otra. Los ensayos de afinidad incluyen, pero de forma no excluyente, ensayos que dependen de una interacción de unión entre un receptor y un ligando, una enzima y su sustrato, un polinucleótido y su complemento o complemento sustancial, una molécula pequeña y una proteína de unión que se une a la molécula pequeña con especificidad, etc. Los inmunoensayos incluyen ensayos que dependen de la interacción entre, por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo que reconoce el antígeno. Los inmunoensayos también incluyen, por ejemplo, ensayos que emplean un anticuerpo o fragmento del mismo para unir un antígeno de interés de la muestra. Los ensayos de afinidad también incluyen, por ejemplo, ensayos competitivos y ensayos de tipo sándwich. Estos ensayos incluyen aquellos que dependen de una interacción de un antígeno unido a una superficie para detectar un anticuerpo de interés de una muestra, y aquellos que dependen de una interacción de un anticuerpo unido a una superficie o fragmento del mismo para detectar un antígeno de interés de una muestra. En este documento, los antígenos no están limitados a polipéptidos o proteínas, sino que también pueden incluir moléculas pequeñas (tales como, por ejemplo, haptenos) y anticuerpos (por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos como antígenos para generar otros anticuerpos que los reconozcan). En general, en este documento antígeno incluye cualquier analito de interés de una muestra que se somete a un inmunoensayo con un anticuerpo o fragmento del mismo utilizando las composiciones o los métodos de la invención.

55 Una aplicación de determinadas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento se presentan en las Figs. 1A y 1B para el caso particular de orientar y asociar una cantidad inferior a la de saturación de SA sobre una superficie de PMP. Se proporciona una explicación más detallada de las distintas etapas de este proceso en otra parte de este documento.

60 Se proporciona una descripción general de un proceso para preparar una superficie insaturada y orientada para el caso de una superficie que consta de BSA biotinilada capaz de unir SA, la cual, a su vez, es capaz de unir un resto de captura biotinilado tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma. La mayor parte de la discusión y los ejemplos proporcionados analizan un sistema biotina/SA, aunque la invención no está limitada a superficies biotiniladas.

65 Debería tenerse en cuenta que puesto que la discusión y los ejemplos emplean biotina, y la biotina se emplea normalmente para unir un grupo de unión a biotina bivalente o multivalente (tal como, por ejemplo SA), el hecho de emplear un grupo de



unión a biotina multivalente presenta determinados problemas que posiblemente no se den con muchas superficies de unión que no emplean un conector de ligando multivalente. Uno de estos problemas es que cuando se utiliza una micropartícula biotinilada recubierta con SA, el desprendimiento de biotina con enlace no covalente puede interferir con el rendimiento de la superficie de unión (*por ejemplo*, la biotina libre puede disociarse y formar un complejo con la SA). En tal caso, este fenómeno puede reducirse realizando una biotilación de baja proporción de carga de la BSA, en lugar de biotilar la BSA con un gran exceso arbitrario de biotina, porque la biotilación de baja proporción de carga puede reducir la cantidad de biotina con enlace no covalente que se asocia con la BSA.

Además, cuando se recubre un soporte con un grupo multivalente, como por ejemplo SA sobre una micropartícula, puede producirse agregación durante el recubrimiento con SA. Esto es debido a que cada molécula de SA se une a más de una molécula de biotina. SA es una proteína tetramérica con un peso molecular de aproximadamente 56.000 Da y es un ejemplo específico de una molécula biológica que tiene dos o más dominios de unión a biotina. La interacción avidina-biotina es la interacción no covalente más fuerte conocida entre proteína y ligando, y cada una de las cuatro subunidades de SA puede unirse a biotina con una constante de unión  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ . La estructura terciaria de SA da lugar a que sus cuatro dominios de unión a biotina estén localizados en caras opuestas de la molécula. Si uno de los dominios de unión a biotina de SA se une a una superficie biotinilada, al menos dos de los tres dominios de unión a biotina desocupados todavía estarán estéricamente disponibles para unirse a restos de captura biotinilados. Avidina y neutravidina son otros ejemplos de proteínas tetraméricas que tienen cuatro dominios de unión a biotina; se distinguen de SA en su pl, solubilidad y propiedades de unión no específicas.

Cuando la superficie biotinilada se expone a SA, la SA libre se unirá con la biotina de la superficie, pero la SA unida con la superficie puede luego unirse a la biotina unida con otra micropartícula. De esta forma, se pueden formar agregados grandes de micropartículas. Esto puede tratarse creando una monodispersión de micropartículas en la etapa de adición de SA.

En pocas palabras, el proceso de preparación de una superficie de biotina-BSA sobre una partícula empieza con una biotilación de baja proporción de carga de BSA. Entonces, la BSA biotinilada de baja proporción de carga se acopla con las PMP mediante anclaje covalente de las aminas primarias de la BSA de la biotina-BSA a los grupos funcionales de la superficie de las PMP. Las PMP biotiniladas resultantes se suspenden en un Pluronic® adecuado durante un tiempo (etapa de bloqueo), se lavan y entonces se aíslan. A continuación, las PMP biotiniladas se suspenden en un Pluronic® adecuado (una etapa de dispersión mejorada) y se añade SA. Las micropartículas se incuban a temperatura ambiente durante un tiempo, se lavan y entonces se aíslan. Una vez aisladas, se pueden añadir moléculas biotiniladas adecuadas (tales como restos de captura biotinilados) para cualquier aplicación de ensayo.

La etapa de bloqueo arriba mencionada utilizando un Pluronic® adecuado minimiza uniones artefactuales no específicos que implican los sitios de unión de la superficie de unión insaturada de la invención que, de no ser así, están desocupados (Figs. 5 y 7) y a la vez permiten las asociaciones específicas necesarias para generar los complejos basados en ligandos de la invención. Este tipo de bloqueo fomenta la accesibilidad espacial (estérica) de los complejos basados en ligando de la invención, ya que sus grupos se asocian y facilitan una orientación estructural lineal de cada complejo basado en ligando de la invención cuando se forma, aumentando así la probabilidad de que cada complejo resultante que contiene una unidad de captura de la invención sirva para optimizar los parámetros de rendimiento del ensayo, los cuales incluyen, a modo de ejemplo que no debe interpretarse como excluyente, la relación señal-ruido. Asimismo, e igual que es válido para los inmunoensayos en general, una etapa de bloqueo también minimiza la unión no específica que puede describirse como acontecimientos de unión artefactual en un inmunoensayo que implica sus componentes y/o superficies de soporte que da lugar a subproductos no deseables que pueden afectar de forma adversa los parámetros de rendimiento de ensayo, los cuales incluyen, a modo de ejemplo que no debe interpretarse como excluyente, la relación señal-ruido. Los efectos adversos de estos acontecimientos de unión manufacturación sobre la relación señal-ruido pueden manifestarse en una señal reducida, un ruido aumentado o ambos. Por último, puesto que las asociaciones específicas tanto con la superficie de soporte como con la superficie de unión están optimizadas, al minimizarse las asociaciones no específicas con estas superficies, se minimiza al mismo tiempo el desprendimiento de los componentes basados en ligandos de la invención de las superficies de soporte y de unión de micropartículas o microplacas. Por estas razones, la etapa de bloqueo con un Pluronic® adecuado da lugar a mejoras de rendimiento y producción que afectan favorablemente la sensibilidad del ensayo (relación señal-ruido), la exactitud del ensayo, la precisión del ensayo (ensayos cuantitativos), la reproducibilidad del ensayo (ensayos cualitativos), la estabilidad del ensayo, o la reproducibilidad del proceso de fabricación de PMP (factibilidad de producción de PMP) o combinaciones de los mismos.

El paso de dispersión arriba mencionado utilizando un Pluronic® adecuado antes de la adición de SA, durante el proceso de preparación de una superficie de biotina-BSA sobre una micropartícula, atenúa la agregación de micropartículas y simultáneamente aumenta el área superficial que está expuesta sobre la micropartícula (Figs. 6 y 10), dejando así el mínimo número de complejos basados en ligandos sobre una superficie de micropartícula no disponible para la unión. Esta inhibición de la agregación mediada por Pluronic® es útil para aplicaciones que incluyen, pero que no pretenden estar limitadas a las mismas, mejorar la factibilidad de producción de PMP (reproducibilidad de proceso de PMP) y mejorar el rendimiento de ensayos y kits en los que se utilizan PMP. La factibilidad de producción de PMP se mejora cuando el nivel de agregación de micropartículas de un lote a otro de PMP se puede controlar antes, durante y tras un proceso de fabricación de PMP. Tras el proceso de fabricación de PMP, el rendimiento de los ensayos que utilizan este tipo de PMP puede optimizarse por medios que incluyen, pero de forma no excluyente, exponer las micropartículas a una solución que contiene Pluronic® antes de la adición de la muestra durante un inmunoensayo y/o exponer las micropartículas a una solución que contiene Pluronic® antes de la adición del sustrato durante un inmunoensayo. Por estas razones, el paso de

dispersión mejorado con un Pluronic® adecuado da lugar a mejoras de rendimiento y producción que afectan favorablemente la sensibilidad del ensayo (relación señal-ruido), la exactitud del ensayo, la precisión del ensayo (ensayos cuantitativos), la reproducibilidad del ensayo (ensayos cualitativos), la estabilidad del ensayo, o la reproducibilidad del proceso de fabricación de PMP (factibilidad de producción de PMP) o combinaciones de los mismos.

5 El proceso se ilustra en las Figs. 1A y 1B para determinadas realizaciones que emplean PMP tosilactivadas Dynal® MyOne™ de 1,0 µm de tamaño uniforme (< 5% de CV) (no se requiere activación superficial adicional) (Invitrogen Corporation), BSA biotinilada de baja proporción de carga (4 reactivo de biotina:1 BSA), copolímero tribloque Pluronic® F108 (sintético, no biológico; BASF), SA21 SA-PLUS™ (congelado, nunca liofilizado; ProZyme®), imanes para separar y lavar las micropartículas (intercambio de tampón). Un proceso con micropartícula implica concentración de 25 mg PMP/ml, agitación mecánica y sonicación para resuspender y dispersar las micropartículas para resuspensiones de proceso, agitación mecánica para incubaciones de proceso, incubaciones a temperatura elevada (38-42 °C) y temperatura ambiente, reacciones con tosilo para acoplar covalentemente la BSA biotinilada con los grupos tosilo de la superficie de la micropartícula mediante los grupos amino primarios de la BSA, copolímero tribloque Pluronic® F108 para bloqueo de la superficie de la micropartícula (eliminar proteína absorbida pasivamente, minimizar la unión no específica de proteínas a la superficie de la micropartícula), copolímero tribloque Pluronic® F108 para monodispersión de PMP y acoplamiento secundario (afinidad) de la SA con el intermedio de PMP de biotina-BSA en presencia del copolímero tribloque Pluronic® F108 (atenúa la agregación de micropartículas durante el proceso de acoplamiento de SA).

20 Una forma conveniente de considerar el principio que está detrás de la biotinilación de baja proporción de carga en la preparación de superficies insaturadas o insaturadas y orientadas es considerar el proceso de biotinilación a través de la lente de una distribución de Poisson. Los principios subyacentes a la ilustración que sigue se pueden aplicar a todos los pares de ligando y acoplador a soporte (no únicamente biotina y BSA). Se cree que el complejo ligando::acoplador a soporte preparado utilizando una baja proporción de carga de ligando respecto a acoplador a soporte da lugar a una orientación más favorable de la molécula de ligando cuando el acoplador a soporte de ligando está depositado sobre un soporte. Esta orientación más favorable de las moléculas de ligando contribuye a la accesibilidad estérica del recubrimiento en el soporte. Únicamente para ilustrar el principio, y no a modo de limitación alguna a un acoplador a soporte o ligando particulares, en este documento se ilustra utilizando BSA biotinilada. La ilustración que sigue sirve para cualquier ligando y acoplador a soporte donde el acoplador a soporte sea capaz de asociarse con más de un ligando. Para ligandos y acopladores a soporte distintos de biotina y BSA, se puede determinar una proporción de carga de ligando respecto a acoplador a soporte como se ha hecho para BSA y biotina en el Ejemplo 1 (ver Tabla 1) seleccionando una proporción de carga que proporcione una estabilidad deseable, determinando una sustitución media (X) y considerando el efecto de la orientación en una distribución adecuada, por ejemplo, una distribución de Poisson.

35 En el caso de la biotinilación de BSA, existen un gran número de sitios posibles en la secuencia de aminoácidos de BSA que pueden biotinilarse utilizando el reactivo de biotinilación reactivo con aminas primarias sulfo-NHS-LC-biotina. La lisina, un aminoácido que contiene una amina primaria libre, se encuentra 59 veces en la secuencia de aminoácidos de BSA. Sin embargo, solo aproximadamente de 30 a 35 aminas primarias de lisina de la BSA están disponibles para reaccionar con reactivos de biotinilación reactivos con aminas. Por ejemplo, las aminas N-terminales puede que estén enterradas, o bloqueadas, dentro de la estructura terciaria de la BSA. Solo las aminas primarias que se encuentran en la superficie de la molécula (*por ejemplo*, parte superior, parte inferior, lados, surcos, receptáculos, etc.) están disponibles para la biotinilación. Se ha determinado empíricamente (ver Ejemplo 1) que biotinilar BSA a una proporción de carga molar de 4 moles de sulfo-NHS-LC-biotina por mol de BSA da lugar a una media de aproximadamente 1,63 moléculas de biotina por molécula de BSA (ver Tabla 1).

45 Para la biotinilación de BSA, suponiendo una reacción aleatoria de sulfo-NHS-LC-biotina con las moléculas de BSA (4 moles de sulfo-NHS-LC-biotina por 1 mol de BSA) y una sustitución media ( $\lambda$ ) de 1,63 biotinas por molécula de BSA, la distribución de moléculas de BSA biotiniladas puede aproximarse utilizando una distribución de Poisson (ver Fig. 3: un 20% de BSA tiene 0 biotinas; un 32% de BSA tiene 1 biotina; un 26% de BSA tiene 2 biotinas; un 14% de BSA tiene 3 biotinas; un 6% de BSA tiene 4 biotinas; un 2% de BSA tiene 5 biotinas; y < 1% de BSA tiene 6 biotinas. Como se ilustra en la Fig. 3, la distribución de Poisson revela que al menos un 50% de los complejos biotina-BSA tienen un número inferior o igual a tres biotinas por acoplador a soporte (*es decir*, BSA) en la proporción de carga molar seleccionada de biotina:BSA. La distribución también revela que en la proporción de carga molar seleccionada, de 0 a seis biotinas están conjugadas por molécula de BSA.

55 La BSA biotinilada de baja proporción de carga puede acoplarse covalentemente con un soporte porque la BSA tiene aproximadamente de 30 a 35 aminas primarias disponibles para reacción con aminas primarias y una distribución de Poisson predice que de 0 a seis aminas primarias de BSA están conjugadas con biotina siguiendo la biotinilación de baja proporción de carga. Por tanto, aproximadamente de 24 a 35 aminas primarias todavía están disponibles para acoplarse covalentemente con cada molécula de BSA a un soporte mediante reacciones con aminas primarias (*por ejemplo*, tosilo, epoxi, carbodiimida, etc.). Las múltiples aminas primarias disponibles pueden mejorar la eficiencia de acoplamiento de BSA a un grupo funcional del soporte, y puede mejorar la estabilidad mediante puntos de anclaje múltiples (es decir, más de un enlace covalente soporte-BSA por molécula de BSA).

65 Según las instrucciones del fabricante del reactivo de biotinilación (Pierce Chemical Co., Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook, M. Savage y col., 2ª Ed., 1992, página 34), una proteína biotinilada con 2,5 moles de biotina por mol de proteína también puede dar lugar a una distribución de Gauss (en forma de campana) entre el conjunto de proteínas.

A pesar de que algunas proteínas del conjunto pueden no tener biotina incorporada, la mayoría tendrían 2-3 moles de biotina incorporada, y una fracción muy pequeña del conjunto puede que tenga 5 moles de biotina incorporada. Puesto que la biotina puede conjugarse con cualquier amina primaria disponible, es muy posible producir diferentes conjugados biotina-BSA con biotina conjugada a diferentes aminas disponibles en cada molécula de BSA.

Una ilustración de cómo puede utilizarse la BSA biotinilada de baja proporción de carga se muestra en la Fig. 4, la cual muestra el acoplamiento de biotina-BSA de baja proporción de carga a una fase sólida en forma de micropartículas tosilactivadas de 1,0 micras con grupos funcionales superficiales (*esto es*, ácido carboxílico, tosilactivado, epoxi, *etc.*) utilizados para unir covalentemente el amino primario de biotina-BSA o grupos funcionales sulfhidrilo. El soporte resultante está insaturado y orientado respecto a la biotina sobre su superficie.

Puesto que el conjugado de biotina-BSA (complejo ligando::acoplador a soporte) puede tener diferentes números de biotina por molécula de BSA, y la orientación de la molécula de BSA y localización de las biotinas superficiales son aleatorias, el conjugado biotina-BSA se acoplará con la superficie de soporte de forma que aquellas biotinas que se extienden en la solución quedan estéricamente disponibles como una superficie de unión, y aquellas biotinas que están de cara a la superficie de soporte no quedan estéricamente disponibles como superficie de unión.

La mayoría de micropartículas comerciales se basan en poliestireno, y la absorción a la superficie de la micropartícula se produce pasivamente (*por ejemplo*, por interacción hidrófoba y/o iónica) y no específicamente. Aunque se muestra una micropartícula activada con tosilo, el soporte puede activarse con cualquier grupo funcional adecuado (*por ejemplo*, ácido carboxílico, epoxi, *etc.*) que pueda unirse covalentemente a los grupos funcionales de biotina-BSA (*por ejemplo*, los grupos amino primarios o grupos sulfhidrilo de BSA). Si todas las aminas épsilon de la superficie de las moléculas de BSA tiene un pK idéntico, la distribución de biotina sobre la superficie de la BSA debería ser de Gauss (Pierce Chemical Co., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, M. Savage y col., 2ª Ed., 1992, página 34). La Fig. 4 ilustra una superficie insaturada preparada asociando covalentemente biotina-BSA con una sustitución media ( $\lambda$ ) de 1,63 biotinas por molécula de BSA a un soporte de 1,0 micras. Como puede verse en la ilustración, la insaturación se consigue, al menos en parte, recubriendo el soporte con BSA biotinilada de baja proporción de carga.

Otro método para conseguir una superficie de unión insaturada sobre un soporte comprende preparar complejos ligando::acoplador a soporte a una proporción de carga molar seleccionada de ligando respecto a acoplador a soporte, preparar una preparación diluida de los complejos resultantes ligando::acoplador a soporte y recubrir el soporte utilizando la preparación diluida de complejos ligando::acoplador a soporte en el proceso de asociar los complejos ligando::acoplador a soporte con el soporte. Para superficies biotiniladas, las cuales se unen a un grupo al menos bivalente, la proporción de carga molar seleccionada es preferiblemente una proporción de carga molar baja de biotina respecto a acoplador a soporte para reducir la degradación del rendimiento debido a desprendimiento. En este método, la proporción de carga baja no es responsable del carácter insaturado del soporte resultante, puesto que la naturaleza insaturada de los ligandos acoplados con el soporte se consigue limitando la concentración de los complejos ligando::acoplador a soporte por unidad de área sobre el soporte, en lugar de limitando la cantidad de ligandos por acoplador a soporte. Por tanto, por ejemplo, con este método se puede conjugar BSA con biotina a unas proporciones de carga molares en exceso de 4 moles de biotina por mol de BSA, aunque la biotinilación se lleva a cabo preferiblemente a una proporción de carga baja de biotina para reducir la cantidad de biotina unida no covalentemente a la superficie de unión.

Aunque en muchas circunstancias sería indeseable y/o ineficiente biotinilar BSA (o acoplar cualquier ligando con cualquier acoplador a soporte) a proporciones de carga molar elevadas de ligando respecto a acoplador a soporte (por ejemplo, a una proporción de carga molar de aproximadamente 20 o más moles de reactivo de biotinilación por mol de BSA), con este método, los complejos ligando::acoplador a soporte (por ejemplo, biotina-BSA) preparados a estas proporciones de carga tan elevadas pueden también utilizarse para preparar una superficie de unión insaturada. Por tanto, sin tener en cuenta la limitación de la sustitución media ( $\lambda$ ) de ligandos por acoplador a soporte (por ejemplo, biotinas por BSA), limitar la saturación de ligandos sobre un soporte puede conseguirse limitando la concentración de complejos ligando::acoplador a soporte en la reacción que acopla los complejos ligando::acoplador a soporte al soporte. La magnitud de la saturación puede controlarse, además, por ejemplo, controlando la velocidad de la reacción, por ejemplo, controlando la temperatura de la reacción (*por ejemplo*, refrigerando para acoplamientos endotérmicos, o calentando para acoplamientos exotérmicos), seleccionando una reacción de acoplamiento más lenta o menos reactiva, limitando el tiempo de reacción, *etc.*

Como se ha indicado arriba, la mayoría de micropartículas comerciales se basan en poliestireno. Se conoce la absorción pasiva de proteína en estas superficies mediante, por ejemplo, interacción hidrófoba y/o iónica. Utilizar agentes de bloqueo tales como, por ejemplo, al menos un Pluronic®, se discute en este documento para mejorar la unión no específica. Estos agentes, como se revela en detalle en otra parte de este documento, también son útiles en la preparación de preparaciones monodispersas o sustancialmente monodispersas de micropartículas que contienen superficies de unión.

El uso de copolímeros en bloque como agentes de bloqueo para fases sólidas, y para el caso particular de utilizar un copolímero en bloque Pluronic® como agente de bloqueo para micropartículas con BSA biotinilada de baja proporción de carga, se ilustra en la Fig. 5. La ilustración es para Pluronic® F108 (P.M.  $\approx$ 13.518 Da; equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) = 27), el cual bloquea la superficie de polímero hidrófoba expuesta de la fase sólida y desplaza, elimina o arranca proteína absorbida pasivamente sin eliminar la proteína anclada covalentemente. Entonces la superficie sigue siendo hidrófila debido a la presencia de hidroxilos superficiales en las colas de Pluronic®.

Puede utilizarse cualquier copolímero en bloque que tenga la capacidad de asociarse con la superficie de soporte y también extender una cola relativamente hidrófila hacia el medio circundante. Los copolímeros tribloque (tales como, por ejemplo, Pluronic® F108 de BASF) tienen un único grupo de cabeza hidrófobo de polipropileno (PPO) de aproximadamente 17 a aproximadamente 69 unidades de monómero de longitud, y dos colas hidrófilas de polietileno (PEO) de 1 a aproximadamente 129 unidades de monómero de longitud cada una. El equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de los copolímeros tribloque está directamente relacionado con la longitud o el tamaño del grupo de cabeza de PPO y las colas de PEO, y el valor HLB puede ser de 1 (insoluble en agua) a 29 (muy soluble en agua). Si el grupo de cabeza de PPO tiene al menos una longitud de 56 unidades de monómero, el grupo de cabeza del copolímero tribloque no solo puede actuar de sonda hidrófoba y unirse fuertemente a una superficie hidrófoba, sino que puede competir y desplazar cualquier molécula de la misma superficie hidrófoba. Si ambas colas de PEO tienen al menos una longitud de 105 unidades de monómero, se extenderán hacia la solución alejándose de la superficie en fase sólida. Los grupos hidroxilo al extremo de cada cola de PEO proporcionan un microentorno hidrófilo, puesto que las colas son lo bastante largas y pueden moverse libremente de un lado a otro en la solución, y las colas de hidroxilo actúan de barrera estérica para evitar la absorción o la reabsorción pasiva de proteína en la superficie de soporte en fase sólida.

En base al área superficial disponible teórica, suponiendo una superficie lisa de una micropartícula esférica de 0,82 a 1,03 micras con una densidad de 1,5 g/cm<sup>3</sup> (38,83 hasta 48,77 cm<sup>2</sup> por mg de micropartícula), y el área superficial interfacial teórica de una molécula de Pluronic® F127 (15,1 hasta 20,0 nm<sup>2</sup>), se calcula que la monocapa teórica de Pluronic® F127 sobre la superficie de la micropartícula es de de aproximadamente 4,05 x 10<sup>-4</sup> a aproximadamente 5,43 x 10<sup>-4</sup> nmol de Pluronic® F127 por mg de micropartícula. El análisis fluorométrico de Pluronic® F127 marcado con 5-(4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína (5-DTAF) indicó que de aproximadamente 3,68 x 10<sup>-4</sup> a aproximadamente 8,37 x 10<sup>-4</sup> nmol de Pluronic® F127 se unen por microgramo de una micropartícula esférica de 0,82 a 1,03 micras.

Se utilizó un análisis hemocitométrico para determinar la concentración mínima de Pluronic® F108, Pluronic® F127 y Tetronic® 908 necesaria para alterar completamente todos los agregados de PMP basadas en poliestireno y dar lugar a una monodispersión de micropartículas. Los estudios de optimización de la concentración indicaron que Pluronic® F108 crea una monodispersión de micropartículas de solo monómeros y dímeros a concentraciones de aproximadamente 5 mM (0,007% p/v) a aproximadamente 500 mM (0,67% p/v). Pluronic® F127 da lugar a monómeros, dímeros y trímeros de micropartículas de aproximadamente 6,67 mM (0,009% p/v) a aproximadamente 33,33 mM (0,043% p/v), y monómeros, dímeros y grandes agregados de aproximadamente 50 mM (0,064% p/v) a aproximadamente 667 mM (0,850% p/v). Sin embargo, Tetronic® 908 da lugar a agregados en la mayoría de concentraciones ensayadas. Pluronic® F108 actúa de agente de bloqueo de PMP de biotina-BSA a concentraciones de aproximadamente 0,4% p/v a aproximadamente 0,6% p/v. En otras realizaciones de la presente invención, se añade Pluronic® F108 a una concentración de aproximadamente 0,1% p/v a aproximadamente 1,0% p/v, o de aproximadamente 0,5% p/v a aproximadamente 0,75% p/v.

El uso de copolímeros en bloque como agentes de dispersión para micropartículas recubiertas con moléculas biotiniladas antes de añadir moléculas de unión a biotina que tienen dos o más dominios de unión a biotina se ilustra en la Fig. 6 para una realización específica utilizando Pluronic® F108 como agente de dispersión antes de añadir SA a una micropartícula recubierta con biotina. En la ilustración que se muestra, el Pluronic® F108 se utiliza tanto para promover la monodispersión como para bloquear uniones no específicas a la superficie. La adición de una molécula de unión a biotina al menos bivalente se muestra en presencia o ausencia de Pluronic® F108. En ausencia de Pluronic® F108 las micropartículas pueden agregarse durante la adición de la molécula de unión a biotina. En presencia de Pluronic® F108 las micropartículas están monodispersas durante y después de la adición de la molécula de unión a biotina.

Se prefiere una etapa de dispersión en determinadas circunstancias para obtener resultados óptimos porque, por ejemplo, las micropartículas biotiniladas que presentan biotina-BSA que están combinadas con grupos de unión a biotina que tienen dos o más dominios de unión a biotina (por ejemplo, avidina, SA o neutravidina) presentan una propensión a agregarse o aglomerarse debido al entrecruzamiento de las micropartículas biotiniladas mediante los dos o más dominios de unión a biotina de cada grupo de unión a biotina.

Las micropartículas biotiniladas, por ejemplo, recubiertas con conectores de ligando sintéticos o biológicos (grupos de unión a biotina) que contienen dos o más dominios de unión a biotina por grupo de unión a biotina tienen una propensión a agregarse o aglomerarse debido a la unión de un dominio de unión accesible y desocupado de un grupo de unión a biotina de una micropartícula biotinilada con una biotina (ligando) accesible y no unida de otra micropartícula biotinilada. La agregación de micropartículas puede atenuarse titulando lentamente (es decir, adición gota a gota) las micropartículas biotiniladas en una solución en agitación continua que contiene una concentración muy elevada o un exceso molar de grupos de unión a biotina (por ejemplo, avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina o un fragmento de neutravidina). Este método puede atenuar la agregación de micropartículas saturando las biotinas superficiales de las micropartículas con moléculas de unión a biotina antes de que pueda producirse un entrecruzamiento. Sin embargo, el método de titulación no es muy rentable ni robusto, puesto que existen múltiples parámetros a controlar, y puede ser bastante caro debido al coste de determinados grupos de unión a biotina, pero puede dar lugar a una monodispersión de micropartículas después de recubrir con el grupo de unión a biotina seleccionado.

Utilizar un copolímero en bloque tal como un Pluronic® F108 puede ser una mejor alternativa al método de titulación lenta mencionado arriba. Pluronic® F108 (un copolímero tribloque fabricado por BASF) tiene un único grupo de cabeza hidrófobo de

polipropileno (PPO) de aproximadamente 56 unidades de monómero de longitud y dos colas hidrófilas de polietileno (PEO) de una longitud de aproximadamente 129 unidades de monómero. Los grupos de cabeza de PPO de Pluronic® F108 actúan de sondas hidrófobas y se unen fuertemente a zonas o sitios hidrófobos de proteínas o superficies de soporte en fase sólida tales como superficies de soporte en forma de micropartícula. Como consecuencia, puede utilizarse Pluronic® F108 para alterar la agregación de micropartículas debido a interacciones con las proteínas superficiales (*es decir*, interacciones hidrófobas o iónicas con proteínas). Las colas de PEO proporcionan microentornos hidrófilos y pueden actuar de barreras estéricas para evitar la reasociación de proteínas debido a interacción hidrófoba o iónica. Como consecuencia, una vez que las micropartículas se tratan con Pluronic® F108 son muy hidrófilas y están monodispersas en solución.

Una realización de la presente invención proporciona ensayos de afinidad mejorados que implican micropartículas. En esta realización, se prepara una población de micropartículas dispersas, tal como una población monodispersa de micropartículas, utilizando un copolímero en bloque tal como Pluronic® F108 o F127. Entonces, las micropartículas dispersas se incorporan en un ensayo de afinidad convencional. Puesto que las micropartículas están dispersas, el ensayo de afinidad tendrá una mayor sensibilidad (relación señal-ruido), mayor exactitud de ensayo, mayor precisión de ensayo (ensayos cuantitativos) y mayor reproducibilidad de ensayo (ensayos cualitativos).

Una ilustración del uso de un copolímero en bloque en una etapa de dispersión para el caso específico de Pluronic® F108 y micropartículas recubiertas con SA se muestra en la Fig. 6 y la Fig. 7.

La Fig. 7 muestra micropartículas recubiertas con BSA biotinilada de baja proporción de carga y bloqueadas con Pluronic® F108 que están dispersas o resuspendidas en Pluronic® F108 al 0,4% hasta 0,6% (p/v%). Una vez que las micropartículas biotiniladas están monodispersas, se añade SA para recubrir las micropartículas biotiniladas. Puesto que SA (P.M. de aproximadamente 56 kDa) es ligeramente menor que BSA (P.M. de aproximadamente 66 kDa), es probable que solo una molécula de SA pueda unirse estéricamente con una molécula de biotina-BSA (incluso si la BSA tiene múltiples biotinas accesibles). Además, no todas las moléculas de BSA tienen una biotina disponible (ver discusión de la distribución de Poisson, arriba). Por tanto, el número total de moléculas de SA capturadas sobre la superficie de unión será menor que el número total de moléculas de BSA acopladas con la superficie de soporte, y SA estará insaturada (habrá una cantidad inferior a la máxima cantidad de moléculas de SA por unidad de área superficial) sobre la superficie de unión (ver Ejemplo 11).

Una vez que una superficie de soporte está recubierta con moléculas biotiniladas sintéticas o biológicas (complejos ligando::acoplador a soporte), puede utilizarse para captar o para captar y orientar una cantidad inferior a la de saturación de un conector de ligando sintético o biológico (grupo de unión de biotina) que contiene dos o más dominios de unión a biotina. Suponiendo que los dominios de unión a biotina están localizados en extremos o caras opuestas, o aproximadamente opuestas, de cada grupo de unión a biotina, al menos uno de sus dominios de unión a biotina se unirá con una biotina en fase sólida, mientras que el dominio de unión a biotina restante que es contrario, o aproximadamente contrario, estará disponible para unirse con un resto de captura biotinilado (por ejemplo, anticuerpo o antígeno biotinilados).

Como se ha discutido arriba, las micropartículas biotiniladas pueden recubrirse con un conector de ligando sintético o biológico (grupo de unión a biotina) que contiene dos o más dominios de unión sin agregación de micropartículas dispersando las micropartículas biotiniladas en Pluronic® F108 (copolímero tribloque) a de aproximadamente el 0,4% a aproximadamente el 0,6% antes de la adición del grupo de unión a biotina o titulando lentamente (*por ejemplo*, gota a gota) las micropartículas biotiniladas en una solución en agitación continua que contiene una concentración muy elevada o un exceso molar de grupos de unión a biotina.

En la práctica, las micropartículas dispersas en Pluronic® F108 se recubrieron con BSA biotinilada de baja proporción de carga a concentraciones de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1,0% (p/v %), o alternativamente de aproximadamente 0,4% a aproximadamente 0,6% (p/v %). Una vez biotiniladas, las micropartículas se trataron y dispersaron en una solución de Pluronic® F108 de aproximadamente el 0,4% a aproximadamente el 0,6% (p/v%), se pudieron añadir niveles o cantidades bajos de SA a las micropartículas biotiniladas sin la formación de agregados o aglomeraciones de micropartículas. Este proceso dio lugar a una monodispersión de micropartículas tras el recubrimiento del grupo de unión a biotina específico (por ejemplo, SA). El proceso es mucho más rentable que el método de titulación de micropartículas descrito arriba, y es un método robusto y reproducible para recubrir micropartículas biotiniladas con conectores de ligando sintéticos o biológicos (grupos de unión a biotina) que contienen dos o más dominios de unión a biotina.

Por tanto, en al menos una realización, el copolímero en bloque puede emplearse a concentraciones de aproximadamente 0,1% p/v a aproximadamente 1,0% p/v, o de aproximadamente 0,4% a aproximadamente 0,6% (p/v %) tanto para reducir la unión no específica como para ayudar a promover una monodispersión de micropartículas.

Un objetivo de crear una superficie de unión insaturada y orientada es proporcionar unos fundamentos, o base, para añadir componentes para un ensayo de afinidad. Puesto que el complejo ligando::acoplador a soporte subyacente construido según la invención está insaturado y orientado, cualquier componente que se añada sobre este complejo ligando::acoplador a soporte reflejará su naturaleza insaturada y orientación. Un ejemplo de una estructura de este tipo se muestra en la Fig. 8.

La Fig. 8 muestra la deposición de restos de captura biotinilados sobre una superficie de unión en forma de micropartículas específica de biotina que se preparó (1) recubriendo la superficie con BSA biotinilada de baja proporción de carga; (2) bloqueando la superficie con el copolímero tribloque Pluronic® F108, (3) dispersando las micropartículas en Pluronic®

F108 antes de la adición del grupo de unión a biotina sintético o biológico (por ejemplo, SA) que contiene dos o más dominios de unión a biotina; y (4) añadiendo SA a la superficie. La micropartícula recubierta con SA resultante puede utilizarse para orientar y captar una cantidad de no saturación de cualquier resto de captura biotinilado de interés.

5 La Fig. 8 muestra cómo se utiliza la micropartícula recubierta con SA para orientar y captar una cantidad de no saturación de determinados restos de captura biotinilados de interés que incluyen (A) fragmentos Fab de anticuerpos (la ausencia de la región Ig Fc puede disminuir o atenuar problemas de unión no específica); (B) inmunoglobulinas (anticuerpos policlonales y/o monoclonales); y (C, D y E) moléculas pequeñas, medianas y/o grandes, respectivamente, tanto si son sintéticas como biológicas. Cualquiera de los restos de captura biotinilados de interés  
10 puede constar de un espaciador, por ejemplo, entre la molécula y el grupo biotina.

Los espaciadores pueden ser particularmente útiles en el caso de moléculas biotiniladas que sean relativamente pequeñas. Puesto que los dominios de unión a biotina de la molécula de SA están contenidos 9 Angstroms por debajo de la superficie, las moléculas pequeñas biotiniladas (*por ejemplo*, aquellas que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1000 Da) pueden no ser detectables por trazadores de inmunoensayo más grandes (conectores detectables) debido a impedimentos estéricos. Puede obtenerse una mayor capacidad de unión y una mayor sensibilidad de detección utilizando derivados de biotina que tengan brazos espaciadores anclados a ellos, o conjugando la molécula pequeña a una molécula biotinilada más grande (*es decir*, una molécula portadora).  
15

20 En la medida en que son útiles, las directrices para distinguir moléculas pequeñas de moléculas medianas o grandes pueden expresarse de la siguiente forma: en general se considera que las moléculas pequeñas tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5000 Da; en general se considera que las moléculas medianas tienen un peso molecular de aproximadamente 5000 o más a aproximadamente 150.000 Da; en general se considera que las moléculas grandes son aquellas cuyo peso molecular es de aproximadamente 150.000 Da.

25 En las Figs. 9A y 9B se ilustran determinados aspectos de la invención en la preparación de micropartículas con superficies de unión según la invención.

30 Las Figs. 9A y 9B ilustran la orientación y la deposición de una cantidad inferior a la cantidad de saturación de anticuerpos biotinilados, o fragmentos Fab biotinilados, sobre micropartículas de unión a biotina (*por ejemplo*, micropartículas recubiertas con SA) preparadas según la invención.

Las PMP recubiertas con SA según la invención puede mejorar la sensibilidad de inmunoensayo (aumentan la relación señal-ruido), puesto que la fase sólida de unión a biotina puede utilizarse para orientar y captar una cantidad inferior a la de saturación de resto de captura biotinilado tal como, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos Fab biotinilados específicos del analito. La sensibilidad del ensayo se ve mejorada porque una disminución del número total de moléculas de SA por área de superficie de soporte de cada micropartícula recubierta con SA da lugar a una capacidad de unión reducida del anticuerpo de captura biotinilado, pero a un rendimiento de unión mejorado del anticuerpo de captura biotinilado debido a una libertad estérica mejorada. Es decir, la finalidad de proporcionar una cantidad inferior a la máxima de moléculas de SA en la superficie es mejorar la libertad estérica de cada molécula de SA para que se una a restos de captura biotinilados grandes (*por ejemplo*, anticuerpos biotinilados) y mejorar la eficiencia de unión de cada molécula de SA.  
40

La Fig. 9A ilustra una superficie de micropartículas convencional o estándar recubierta con SA, donde SA está directamente dispuesta sobre la superficie de micropartículas mediante aminas primarias u otras reacciones de acoplamiento, y la superficie se bloquea utilizando BSA. En este tipo de superficie convencional o estándar, la molécula de SA no está específicamente insaturada u orientada en la superficie; es decir, el anclaje es aleatorio. Añadir un fragmento Fab o anticuerpo biotinilado da lugar a una superficie de unión que no está predominantemente insaturada u orientada puesto que la SA de la superficie está orientada de forma aleatoria. La acumulación de anticuerpo o Fab puede crear barreras estéricas (baja accesibilidad) y disminuir la eficiencia de captura del antígeno, en particular si el antígeno es una molécula grande.  
45

50 La Fig. 9B ilustra una superficie de unión de micropartículas recubierta con SA preparada según la invención. En esta superficie de unión, las moléculas de SA están insaturadas (una disminución en el total de moléculas de SA por unidad de área superficial de una micropartícula) y orientadas en la superficie. La superficie de soporte de la micropartícula está covalentemente recubierta con BSA biotinilada de baja proporción de carga y bloqueada con Pluronic® F108. Entonces, las micropartículas biotiniladas se dispersan en Pluronic® F108 antes de la adición de SA. El anclaje de SA es específico y no aleatorio.  
55

60 El fragmento Fab biotinilado o anticuerpo biotinilado anclado a la superficie de unión de la micropartícula con SA preparada según la invención está insaturado y orientado porque la molécula de SA también está insaturada y orientada en la superficie de unión. La orientación y la naturaleza menos que saturada del anticuerpo biotinilado o del fragmento Fab biotinilado promueve la eficiencia de captura del antígeno (analito) (se aumenta la señal), en particular si el antígeno es una molécula grande. Además, la superficie de la micropartícula es hidrófila debido al agente de bloqueo Pluronic® F108 y se minimiza o se elimina la unión no específica (se disminuye el ruido).

65 Otra característica de la invención se ilustra en la Fig. 10, la cual muestra el área de superficie disponible aumentada asociada con una monodispersión de micropartículas.

5 El cuadro A de la Fig. 10 ilustra que las micropartículas se agregan o aglutinan debido a interacciones superficiales micropartícula-micropartícula. Esta agregación disminuirá tanto (1) el área superficial de micropartículas disponible, ya que cualquier área dentro del agregado no está estéricamente disponible (accesible), como (2) la capacidad y eficiencia de unión del grupo de unión a biotina (*por ejemplo*, SA) en la superficie de unión, lo que da lugar a una señal de ensayo disminuida.

10 El cuadro B de la Fig. 10 ilustra que las micropartículas según la invención tienen una área superficial de unión aumentada, lo cual da lugar a una capacidad de unión mejorada y una eficiencia de unión mejorada del grupo de unión a biotina (*por ejemplo*, SA) en la superficie de unión, lo que da lugar a una señal de ensayo aumentada. Las micropartículas dispersas tienen más área superficial disponible total que las micropartículas agregadas o aglomeraciones de micropartículas y proporcionarán una cinética de ensayo mejorada debido a las tasas de colisión aumentadas y a la distancia de difusión del ensayo disminuida.

15 Las micropartículas según la invención se diseñan de forma que la superficie de unión de BSA biotinilada de baja proporción de carga se bloquea con un copolímero en bloque tal como el copolímero tribloque Pluronic® F108, y las micropartículas biotiniladas se dispersan en Pluronic® F108 antes de la adición de las moléculas de SA como se ha discutido arriba. Por supuesto, Pluronic® F108 es solo un ejemplo de esta realización. Se entiende que cualquier copolímero en bloque de esta invención puede utilizarse de esta forma.

20 Las micropartículas según la invención se prepararon utilizando biotina como ligando y o bien BSA o bien ovoalbúmina como acoplador a soporte. También se prepararon micropartículas recubiertas con SA, así como micropartículas con restos de captura específicos. Los resultados de estos estudios se discuten a continuación y en los ejemplos.

25 Se estudió el efecto de la variación de las proporciones de carga molares en las reacciones de biotinilación, y se presenta en el Ejemplo 1. Se realizó la biotinilación de BSA a varias proporciones de carga molares de biotina respecto a BSA en el intervalo de 3,4:1 a 30:1, se determinó el grado de biotinilación y se determinó la estabilidad a 4 °C y 37 °C durante tres días (ver Tabla 1). La disminución de la estabilidad refleja, al menos en parte, el desprendimiento o disociación de biotina o reactivo de biotina de los conjugados biotina-BSA (ver Fig. 11). Los resultados indican que la biotina-BSA preparada a proporciones de carga molares elevadas de biotina (*por ejemplo* 8:1, 15:1 y 30:1) muestran una estabilidad deficiente, pero cuando la proporción de carga molar de reactivo de biotina disminuye desde 30:1 hasta 4:1, la estabilidad mejora desde 4% hasta 100%. Por tanto, seleccionar una proporción de carga relativamente baja de ligando respecto a acoplador a soporte, y asociar el complejo ligando::acoplador a soporte a una fase sólida, da lugar a una superficie de unión más estable que las superficies de unión preparadas de forma convencional que tienen biotina como ligando.

35 Preparar una superficie de unión insaturada recubriendo una superficie de soporte con un complejo ligando::acoplador a soporte preparado a cualquier proporción de carga (en particular complejos ligando::acoplador a soporte preparados a una elevada proporción de carga de ligando respecto a acoplador a soporte) puede facilitarse mediante la adición de un dispersante adecuado al complejo ligando::acoplador a soporte tras su preparación, pero antes de que se deposite sobre la superficie de soporte. Se discuten en este documento dispersantes adecuados para este método. En este documento se proporciona una ilustración del uso de un agente de dispersión adecuado con biotina-BSA preparada a una baja proporción de carga de biotina con respecto a BSA para preparar una superficie insaturada, aunque el método que consiste en emplear un agente de dispersión no está limitado a recubrimientos biotinilados.

45 Se proporciona un método para preparar una superficie de unión insaturada utilizando un agente de dispersión adecuado para evitar la agregación de los soportes en fase sólida tales como, por ejemplo, micropartículas. Este método se basa, al menos en parte, en la observación de que es deseable una preparación de micropartículas relativamente dispersa (por ejemplo, aproximadamente monodispersa).

50 El método puede emplearse cuando puede producirse la agregación de micropartículas, por ejemplo, cuando el ligando es biotina y la biotina está recubierta con SA. El método de dispersión es particularmente útil cuando el conector de ligando es al menos bivalente, es decir, cuando un único grupo de unión a biotina, al menos bivalente, tal como SA puede entrelazar una biotina de una molécula de biotina-BSA de una micropartícula con una biotina de una molécula de biotina-BSA de otra micropartícula. En este documento se proporciona una ilustración del método de dispersión para una realización en la que el complejo ligando::acoplador a ligando es biotina-BSA, y el conector de ligando (grupo de unión a biotina) es SA, a continuación y en el Ejemplo 2. Sin embargo, como se ha explicado previamente, el método no está limitado a superficies de unión biotina/SA.

60 Se pueden utilizar agentes de dispersión tales como, por ejemplo, copolímeros en bloque en un método para preparar una superficie de unión insaturada. En la ilustración proporcionada aquí, los copolímeros en bloque se utilizan como agentes de dispersión para micropartículas recubiertas con complejos ligando::acoplador a soporte sintéticos o biológicos antes de la adición de grupos de unión a biotina sintéticos o biológicos (conectores de ligando) que contienen dos o más dominios de unión a biotina. En la ilustración proporcionada en este documento, se emplea el copolímero en bloque Pluronic® F108; sin embargo, el método no está limitado al copolímero en bloque particular de la ilustración.

65 En general, la Fig. 7 ilustra el recubrimiento de una superficie biotinilada, sintética o biológica, con grupos de unión a biotina sintéticos o biológicos (conectores de ligando) que contienen dos o más dominios de unión a biotina. Más específicamente,

la Fig. 7 ilustra la deposición de SA sobre una superficie de unión de micropartículas de BSA biotinilada de baja proporción de carga bloqueada con Pluronic® F108 y dispersada en Pluronic® F108 antes de la adición de SA.

Los métodos y composiciones proporcionadas en este documento pueden utilizarse para preparar un recubrimiento insaturado para una superficie de soporte en fase sólida, donde el recubrimiento consta de un complejo ligando::acoplador a soporte acoplado con una superficie de soporte, un conector de ligando (grupo de unión a biotina) asociado con el ligando del complejo ligando::acoplador a soporte, y un resto de captura (por ejemplo, un resto de captura biotinilado) asociado con el conector de ligando. El resto de captura puede seleccionarse de forma que facilite la captura de cualquier molécula de interés, tal como un analito. Una ilustración se proporciona abajo y en la Fig. 8 para un sistema biotina/SA, pero la invención no está limitada a un sistema biotina/SA.

Las superficies de unión insaturadas pueden diseñarse orientando y asociando una cantidad inferior a la de saturación de conectores de ligandos sintéticos o biológicos (grupos de unión a biotina) que contienen dos o más dominios de unión a biotina sobre una superficie de soporte. Las superficies pueden ilustrarse mediante un ejemplo que orienta y proporciona una cantidad inferior a la de saturación de SA sobre la superficie de micropartículas, por ejemplo, PMP. La Fig. 8 ilustra una superficie de unión insaturada y orientada preparada depositando restos de captura biotinilados sobre una superficie de unión de micropartículas de unión a biotina que se preparó (1) recubriendo la superficie con BSA biotinilada de baja proporción de carga; (2) bloqueando la superficie con el copolímero tribloque Pluronic® F108; (3) dispersando las micropartículas en Pluronic® F108 (antes de añadir los grupos de unión a biotina sintéticos o biológicos que contienen dos o más dominios de unión a biotina); y (4) añadiendo SA como grupo de unión a biotina. Como se muestra en la Fig. 8, las micropartículas recubiertas con SA pueden utilizarse para orientar y/o captar una cantidad inferior a la de saturación de restos de captura biotinilados, por ejemplo: (A) fragmentos Fab de anticuerpos (la ausencia de la región Ig Fc puede disminuir o atenuar problemas de unión no específica); (B) inmunoglobulinas (anticuerpos policlonales y/o monoclonales); y (C, D y E) moléculas pequeñas, medianas y/o grandes, respectivamente, tanto si son sintéticas como biológicas.

La Fig. 8 ilustra restos de captura biotinilados sobre una superficie de unión insaturada empleando un sistema biotina/SA. La BSA biotinilada de baja proporción de carga anclada a la superficie de una micropartícula se bloquea con el copolímero tribloque Pluronic® F108, las micropartículas se dispersan en Pluronic® F108 antes de la adición de SA, se añade SA y entonces se expone un resto de captura biotinilado deseado a la superficie insaturada recubierta con SA. Los ejemplos de restos de captura biotinilados que se muestran incluyen (de izquierda a derecha en la Fig. 8: fragmento Fab biotinilado (P.M. de aproximadamente 30.000 Da), anticuerpo biotinilado (IgG, P.M. de aproximadamente 150.000 Da); molécula pequeña biotinilada o molécula pequeña biotinilada con un brazo espaciador (por ejemplo, P.M. inferior a aproximadamente 5000 Da); molécula mediana biotinilada o molécula mediana biotinilada como un portador para una molécula pequeña (por ejemplo, P.M. de aproximadamente 5000 Da a aproximadamente 150.000 Da); molécula grande biotinilada (por ejemplo, P.M. de más de aproximadamente 150.000 Da). Como puede verse en la Fig. 8, la naturaleza insaturada y orientada de la biotina-BSA en la superficie del soporte en fase sólida se refleja en la superficie insaturada recubierta con SA, y también en un recubrimiento insaturado con restos de captura. Los grupos de cabeza hidrófobos de Pluronic® F108 se muestran asociados con la superficie de soporte, y los grupos de cola hidrófilos de Pluronic® F108 se muestran alejándose extendidos de la superficie de soporte.

Las superficies de unión insaturadas según la invención normalmente tienen una capacidad de unión inferior que las superficies de unión comerciales. Se proporciona un ejemplo empleando un sistema biotina/SA (ver Tabla 2, Ejemplo 2). Un soporte recubierto con menos moléculas de SA por unidad de área superficial tendrá inherentemente una menor capacidad de unirse a biotina, puesto que la superficie tendrá menos sitios de unión a biotina. La finalidad de proporcionar una cantidad inferior a la cantidad máxima de moléculas de SA sobre la superficies es mejorar la libertad estérica de cada molécula de SA para unirse a restos de captura biotinilados grandes (por ejemplo, anticuerpos biotinilados) y mejorar la eficiencia de unión de cada molécula de SA.

El Ejemplo 2 ilustra que tener una molécula orientada y en una cantidad inferior a la de saturación sobre una superficie de unión disminuye la capacidad de unión, pero aumenta la señal de ensayo, lo que da lugar a una superficie de unión mejor y más eficiente para un ensayo de afinidad. Las micropartículas según la invención presentan una capacidad de unión disminuida en comparación con productos análogos, estándar o convencionales, comerciales (ver, por ejemplo, Tabla 2), pero un rendimiento de ensayo mejorado (ver, por ejemplo, Tabla 3 y Tabla 4). Las relaciones señal-ruido aumentadas debido a una señal de fondo menor y a una respuesta de señal aumentada refleja un rendimiento de ensayo mejorado. En general, los resultados respaldan que la invención permite la producción de micropartículas recubiertas con SA con una capacidad de unión inferior que las micropartículas recubiertas con SA comerciales, pero un rendimiento de ensayo mejorado debido a la orientación y accesibilidad estérica de la estreptavidina sobre la superficie de las micropartículas y a un bloqueo innovador de la superficie de unión.

El Ejemplo 3 ilustra que las micropartículas preparadas según la etapa de dispersión de la invención dan lugar a una población monodispersa de micropartículas sustancialmente libre de agregados o aglomeraciones.

El Ejemplo 4 ilustra que las micropartículas según la invención, en una realización específica de una micropartícula recubierta con SA, a diferencia de las micropartículas convencionales, presentan unas características de relación señal-ruido más favorables debido a la naturaleza insaturada y a la orientación de la SA, un bloqueo superficial mejorado y una eficiencia de unión mejorada.



- 5 El Ejemplo 5 ilustra la reducción de uniones no específicas empleando micropartículas según la invención. La unión no específica en micropartículas según la invención se reduce incluso en ensayos en los que los analitos tienen una preferencia por asociarse con un recubrimiento sobre la fase sólida, tal como la preferencia de las hormonas tiroideas tal como T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina) por la BSA.
- 10 El Ejemplo 6 establece mediante estudios de validación que el proceso de la invención para recubrir un soporte es reproducible y fiable, característica que es deseable para los ensayos diagnósticos de afinidad.
- 15 El Ejemplo 7 muestra que las micropartículas según la invención presentan una estabilidad mejorada en múltiples lotes de validación, para la realización particular de micropartículas recubiertas con SA. El Ejemplo 8 establece que el desprendimiento de ligando de las micropartículas de la invención no es un problema, y el Ejemplo 9 muestra superficies de unión según la invención preparadas con ovoalbúmina en lugar de BSA.
- 20 Aunque gran parte de la discusión y muchos de los ejemplos describen la preparación de superficies insaturadas mediante recubrimiento de una superficie de soporte con un acoplador a soporte que tiene un ligando que forma complejo con él, donde el acoplador a soporte consta de una proteína, pueden conseguirse superficies de unión insaturadas o insaturadas y orientadas utilizando la invención de varias formas. Por ejemplo, el acoplador a soporte puede ser no proteico. por ejemplo, un polímero. El polímero puede estar funcionalizado para que reaccione y forme complejo con el ligando, o los pares polímero/ligando pueden seleccionarse de forma que los grupos funcionales presentes de forma natural en el polímero se unan con una funcionalidad del ligando en un conjunto de condiciones específicas. El número de grupos reactivos, o funcionales, del polímero puede controlarse mediante inactivación de algunos de los grupos reactivos, permitiendo así que se ancle menos ligando por molécula de polímero.
- 25 Los complejos polímero/ligando también pueden diluirse con polímero que no tenga ligando, y la mezcla diluida puede utilizarse para recubrir una superficie de soporte para preparar una superficie de unión insaturada o insaturada y orientada. Puede utilizarse un tipo de polímero o una mezcla de polímeros.
- 30 En consecuencia, en varias realizaciones la invención consta de un soporte que contiene una superficie de unión para un ensayo de afinidad, que contiene ligandos anclados a polímeros, donde los ligandos están insaturados o insaturados y orientados sobre la superficie. Entonces, el soporte que contiene el ligando puede tratarse según cualquier método adecuado descrito en este documento. En varias realizaciones, la superficie consta de una mezcla de polímeros sin ningún ligando anclado y polímeros con ligando anclado. En varias realizaciones, el soporte es una micropartícula, la superficie de unión está bloqueada con un copolímero en bloque, el ensayo es un inmunoensayo y el ligando se une a un conector de ligando al menos bivalente que a su vez puede unirse a un grupo de captura, tal como una inmunoglobulina modificada o no modificada o fragmento de la misma.
- 35 En determinadas realizaciones, un ligando puede acoplarse directamente sobre una superficie de soporte sin el uso de un acoplador a soporte. En estas realizaciones, una superficie de soporte que tiene grupos funcionales capaces de reaccionar con un ligando se expone al ligando en condiciones suficientes para que el ligando se ancle al soporte. En varias realizaciones, el anclaje es un enlace covalente entre un ligando activado y la superficie de soporte, la cual también puede estar activada. Puede conseguirse la insaturación del ligando controlando el número de ligandos que se anclan a la superficie de soporte. En varias realizaciones, la superficie de soporte consta de una multitud de grupos funcionales capaces de reaccionar con el ligando en un conjunto de condiciones dadas. La superficie de soporte puede tratarse de forma que se reduzca el número de grupos funcionales que son capaces de reaccionar con el ligando, o bien manipulando las condiciones de reacción o bien añadiendo un agente que reduzca el número de grupos funcionales sobre la superficie de soporte. Entonces, la superficie de soporte que contiene el ligando puede tratarse según cualquier método adecuado descrito en este documento.
- 40 En consecuencia, la presente invención también proporciona una superficie de soporte recubierta con un ligando, donde el ligando está insaturado sobre la superficie de la superficie de soporte. En varias realizaciones, la superficie de unión se bloquea con un copolímero en bloque, el ensayo es un inmunoensayo y el ligando se une a un conector de ligando al menos bivalente que a su vez se puede unir a cualquier grupo de captura, tal como una inmunoglobulina modificada o no modificada o fragmentos de la misma. En varias realizaciones, la densidad de ligando sobre la superficie de soporte está dentro de los intervalos descritos en este documento para las realizaciones que describen un ligando anclado a acopladores a soporte. Cualquier ligando adecuado puede utilizarse para anclarse directamente a la superficie de soporte, como, por ejemplo, inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas, oligonucleótidos y lectinas. Como en otras realizaciones, el ligando puede contener un enlazante, y el enlazante puede anclarse a la superficie de soporte.
- 45 En consecuencia, la presente invención proporciona una orientación y asociación de una cantidad inferior a la de saturación de un ligando tal como SA sobre una superficie de una micropartícula (por ejemplo, una PMP). Las superficies de unión a biotina comerciales (por ejemplo, Dynal® DYNABEADS™ MyOne Streptavidin T1 y DYNABEADS M-280 Streptavidin) están diseñadas para tener la máxima capacidad de unión a biotina. Las superficies de unión a biotina comerciales se producen normalmente mediante deposición directa de SA u otras moléculas de unión a biotina sobre una superficie de micropartícula. Por el contrario, la presente invención proporciona un recubrimiento con BSA biotinilada de baja proporción
- 50
- 55
- 60
- 65

de carga, bloqueo de las micropartículas de biotina-BSA con Pluronic® F108, dispersión de las micropartículas de biotina-BSA bloqueadas en Pluronic® F108 y finalmente recubrimiento de las micropartículas de biotina-BSA con SA.

5 Las micropartículas según la invención presentan unas características de relación señal-ruido más favorables debido a la insaturación y orientación, un bloqueo superficial mejorado y una eficiencia de unión mejorada. Esto se demuestra para micropartículas con BSA biotinilada de baja proporción de carga recubiertas con SA, como se muestra en los ejemplos.

10 Los métodos y composiciones de la invención pueden utilizarse junto con cualquier ensayo adecuado conocido en la materia, por ejemplo cualquier ensayo de afinidad o inmunoensayo adecuado conocido en la materia donde una superficie insaturada o insaturada y orientada puede utilizarse de forma ventajosa, incluidos, pero de forma no excluyente, ensayos de afinidad proteína-proteína, ensayos de afinidad proteína-ligando, ensayos de afinidad de ácidos nucleicos, ensayos de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFA), ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) e inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos directos o indirectos, ensayos competitivos, ensayos tipo sándwich, etc. Los formatos de ensayo adecuados incluyen, pero de forma no excluyente, ensayos y formatos empleados en los ejemplos de este documento.

20 Los métodos y composiciones de la invención pueden utilizarse junto con cualquier soporte, por ejemplo, un soporte sólido adecuado, conocido en la materia. Se discuten ejemplos de este tipo de soportes en fase sólida, pero la invención no está limitada a los soportes explícitamente discutidos. Por ejemplo, los soportes en fase sólida no están limitados a soportes en forma de partículas, a micropartículas, a micropartículas de poliestireno, a placas de microtitulación, a tubos recubiertos, etc. Otros soportes en fase sólida también pueden utilizarse con la invención, incluidos, pero de forma no excluyente, cualquier soporte conocido en la técnica que se utilice junto con ensayos de afinidad. Por ejemplo, pueden utilizarse soportes que consten de nitrocelulosa cocida con mylar y/o nailon. Pueden utilizarse soportes en fase sólida que consten de filtros o membranas, por ejemplo. Pueden utilizarse soportes en fase sólida que consten de microtubos, nanopartículas o nanotubos, por ejemplo, nanotubos de carbono. Los soportes en fase sólida pueden constar de micropartículas de cualquier tamaño y pueden utilizarse soportes en fase sólida que tengan una gran superficie plana.

30 Los métodos y composiciones de la invención pueden utilizarse junto con cualquier ensayo en el que se desee una relación señal-ruido mejorada. Por ejemplo, una superficie de unión según la invención que está insaturada y tratada con un copolímero en bloque adecuado tal como, por ejemplo, un Pluronic®, puede prepararse sobre un soporte en fase sólida plana o sustancialmente plana para su uso en un ensayo de flujo lateral y/o un ensayo de difusión. Un ejemplo de ensayo de flujo lateral es cuando la muestra se coloca sobre una superficie de unión (inmovilizada o no) y uno o más reactivos de análisis en fase líquida se hacen pasar por encima de la muestra (en un ensayo de difusión, por difusión por encima de la superficie), y el analito se detecta y/o cuantifica mediante una señal adecuada cuando entra en contacto con un reactivo de la fase líquida. Otro ejemplo de un ensayo de flujo lateral es cuando uno o más reactivos de análisis se colocan sobre una superficie de unión (inmovilizada o no) y una muestra en una fase líquida se hace pasar por encima del reactivo o reactivos de análisis (en un ensayo de difusión, por difusión por encima de la superficie), y el analito de la muestra se detecta y/o cuantifica mediante una señal adecuada cuando entra en contacto con el reactivo o reactivos de la superficie de unión. Otro ejemplo de un ensayo de flujo lateral es una tira reactiva que consta de una superficie de unión insaturada según la invención. Los ensayos de flujo lateral y/o de difusión no están limitados a líquidos que cruzan una superficie de unión de un soporte plano, estos ensayos incluyen líquidos que se mueven a través de una membrana o filtro, donde la membrana o filtro consta de una superficie de unión insaturada. En consecuencia, en varias realizaciones, se proporciona una superficie de unión para un ensayo de flujo lateral y/o un ensayo de difusión, así como métodos y composiciones para preparar una superficie de unión para un ensayo de flujo lateral y/o un ensayo de difusión, según cualquiera de las realizaciones descritas en este documento.

50 En otro aspecto, se proporciona el uso de cualquiera de los métodos y composiciones de este documento en un inmunoensayo. En varias realizaciones, se proporciona el uso en un inmunoensayo de un soporte que tiene una superficie de unión insaturada que contiene una multitud de acopladores a soporte dispuestos sobre el soporte y ligandos acoplados con los acopladores a soporte, donde los ligandos están insaturados y orientados sobre la superficie de modo que proporciona ligandos estéricamente accesibles. En una realización específica, una micropartícula que tiene una superficie de unión que consta de una proteína biotinilada (complejo ligando::acoplador a soporte), un grupo de unión a biotina al menos bivalente seleccionado entre avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina mezclas de los mismos asociado con el grupo biotina de la proteína biotinilada, y una inmunoglobulina biotinilada o un fragmento de la misma (resto de captura biotinilado) asociado con un grupo de unión a biotina al menos bivalente (conector de ligando) se utiliza en un inmunoensayo para un analito de interés, por ejemplo, un antígeno, de la muestra. En otra realización, el grupo de unión a biotina al menos bivalente que está asociado con el grupo biotina de la proteína biotinilada se asocia con un antígeno biotinilado o fragmento del mismo (resto de captura biotinilado) y la micropartícula se utiliza en un inmunoensayo para un analito de interés, por ejemplo, un anticuerpo, de la muestra. Las características de las composiciones y métodos para preparar composiciones, utilizadas en el inmunoensayo, incluyen cualquiera de las características (incluidas, por ejemplo, realizaciones específicas que declaman la densidad de los componentes de la superficie) descritas en este documento.

65 Los métodos, composiciones y kits de la invención pueden aplicarse para su uso con cualquier sistema de inmunoensayo adecuado. Son ejemplos no excluyentes de sistemas de inmunoensayo adecuados el sistema de inmunoensayo Access®, el sistema de inmunoensayo Access® 2, el sistema clínico Synchron LXi® 725, el sistema de inmunoensayo UniCel® DxI 800

Access®, el sistema de inmunoquímica IMMAGE® (todos de Beckman Coulter, Inc.) y el sistema Triage® (Biosite, Inc.). Un sistema de inmunoensayo en serie adecuado es el sistema de microensayo A<sup>2</sup>® Microassay (Beckman Coulter, Inc.).

5 Se especifica abajo una lista no limitante de sustancias que pueden actuar como uno, o alternativamente como el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de analito (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que deba diseñarse un ensayo de afinidad. Este tipo de sustancias pueden utilizarse, por ejemplo, como restos de captura (conectores de analito) o pueden utilizarse para generar restos de captura (*por ejemplo*, empleándolos como haptenos/antígenos para generar anticuerpos específicos) que puedan utilizarse con la invención. Los ensayos de afinidad, incluidos los inmunoensayos, pueden diseñarse según la invención para detectar la presencia y/o el nivel de estas sustancias cuando son analitos en una muestra. En una realización específica, los restos de captura de unión a analito de la invención pueden utilizarse para detectar estas sustancias como analitos de una muestra de la siguiente forma: los restos de captura pueden biotinilarse y asociarse con una superficie de soporte en fase sólida recubierta con SA según la invención (por ejemplo, con un recubrimiento de BSA biotinilada de baja proporción de carga, con SA encima del mismo) y utilizarse para captar estas sustancias. Alternativamente, las sustancias listadas abajo pueden biotinilarse y asociarse con una superficie de soporte en fase sólida recubierta con SA según la invención y utilizarse para captar moléculas que reaccionen con ella (tales como, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para las sustancias listadas, proteínas de unión o enzimas).

20 Una lista no limitante de sustancias que puede actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de ligando (grupo de captura) y analito incluye: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), CA19-9, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-t, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, sIL-2R, sIL-4R, sIL-6R, antígeno del núcleo del SIV, IL-1RA, TNF- $\alpha$ , IFN-gamma, GM-CSF; isoformas de PSA (antígeno específico de próstata) tales como PSA, pPSA, BPSA, inPSA, PSA sin formar complejo con  $\alpha_1$ -antiquimotripsina, PSA formando complejo con  $\alpha_1$ -antiquimotripsina, calicreínas de próstata tales como hK2, hK4, y hK15, ek-rhK2, Ala-rhK2, TWT-rhK2, Xa-rhK2, HWT-rhK2, y otras calicreínas; HIV-1 p24; ferritina, L ferritina, troponina I, BNP, leptina, digoxina, mioglobina, péptido natriurético tipo B o péptido natriurético cerebral (BNP), péptido natriurético atrial (ANP; hormona de crecimiento humana, fosfatasa alcalina esquelética, hormona estimulante del folículo humana, hormona luteinizante humana, prolactina; gonadotropina coriónica humana (*por ejemplo*, CG $\alpha$ , CG $\beta$ ); tiroglobulina; antitiroglobulina; IgE, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, antígeno protector de *B. anthracis*, antígeno letal de *B. anthracis*, antígeno de esporas de *B. anthracis*, LPS de *F. tularensis*, enterotoxina B de *S. aureus*, antígeno capsular F1 de *Y. pestis*, insulina, alfa fetoproteína (*por ejemplo*, AFP 300), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno CA 15.3, antígeno CA 19.9, antígeno CA 125, Ac HAV, Igm HAV, Ac HBc, Igm HBc, HIV1/2, Ac HBs, Ac HBs, Ac HCV, anti-p53, histamina; neopterinina; s-VCAM-1, serotonina, sFas, ligando de sFas, sGM-CSFR, s1CAM-1, timidina quinasa, IgE, EPO, Ac factor intrínseco, haptoglobulina, anticardiolipina, anti-dsDNA, anti-Ro, Ro, anti-La, anti-SM, SM, anti-nRNP, antihistona, anti-Scl-70, Scl-70, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anticientroméricos, SS-A, SS-B, Sm, U1-RNP, Jo-1, CK, CK-MB, CRP, albúmina modificada por isquemia, HDL, LDL, oxLDL, VLDL, troponina T, troponina I, microalbúmina, amilasa, ALP, ALT, AST, GGT, IgA, IgG, prealbúmina, antiestreptolisina, clamidia, CMV IgG, toxo IgG, toxo IgM, apolipoproteína A, apolipoproteína B, C3, C4, properdina, factor B, albúmina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\alpha_1$ -microglobulina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, anti-estreptolisina O, antitrombina-III, apolipoproteína A1, apolipoproteína B,  $\beta_2$ -microglobulina, ceruloplasmina, complemento C3, complemento C4, proteína C reactiva, DNasa B, ferritina, cadena ligera libre kappa, cadena ligera libre lambda, haptoglobina, inmunoglobulina A, inmunoglobulina A (CSF), inmunoglobulina E, inmunoglobulina G, inmunoglobulina G (CSF), inmunoglobulina G (orina), subclases de inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, inmunoglobulina M (CSF), cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, lipoproteína (a), microalbúmina, prealbúmina, properdina factor B, factor reumatoide, ferritina, transferrina (orina), rubeola IgG, anticuerpo tiroglobulina, toxoplasma IgM, toxoplasma IgG, IGF-I, proteína de unión a IGF(IGFBP)-3, hepsina, pim-1 quinasa, E-cadherina, EZH2, y a-metilcil-CoA racemasa, TGF-beta, IL6SR, GAD, IA-2, CD-64, neutrófilos CD-64, CD-20, CD-33, CD-52, isoformas de citocromo P450, s-VCAM-1, sFas, sICAM, antígeno de superficie de la hepatitis B, tromboplastina, HIV p24, HIV gp41/120, HCV C22, HCV C33, hemoglobina A1c, y GAD65, IA<sub>2</sub>.

50 Sustancias adecuadas que pueden actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de ligando (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que se debe diseñar el ensayo de afinidad, y que pueden utilizarse con la presente invención también incluyen grupos, tales como por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, específicos para cualquiera de las Preparaciones de Referencia Biológica Internacional de la OMS conservadas y, caracterizadas, y/o distribuidas por los Laboratorios Internacionales de la OMS para Estándares Biológicos (disponible en [http://www.who.int/bloodproducts/re\\_materials](http://www.who.int/bloodproducts/re_materials), actualizada a 30 de junio de 2005, las cuales listan sustancias que son bien conocidas en la materia).

60 Una lista parcial de estos estándares de referencia internacional, identificados por la sustancia seguida de un código en paréntesis de la OMS, incluye: tromboplastina recombinante humana (rTF/95), tromboplastina de conejo (RBT/90), anticuerpo estimulante de la tiroides (90/672), activador tisular del plasminógeno humano recombinante (98/714), uroquinasa de elevado peso molecular (87/594), antígeno prostático específico (96/668), antígeno prostático específico 90:10 (96/700); proteína C de plasma humano (86/622), proteína S de plasma humano (93/590), suero de artritis reumatoide (W1066), proteína amiloide A sérica (92/680), estreptoquinasa (00/464), trombina humana (01/580), tromboplastina combinada bovina (OBT/79), inmunoglobulina anti-D intravenosa de control positivo (02/228), anticuerpos de células de los islotes (97/550), lipoproteína a (IFCC SRM 2B), parvovirus humano B19 DNA (99/800), plasmina humana (97/536), inhibidor del activador del plasminógeno humano 1 (92/654), factor plaquetario 4 (83/505), activador de precalicreína (82/530), control de CJD en tejido cerebral humano y preparación 1 de CJD en tejido cerebral humano y

preparación 2 de CJD esporádica en tejido cerebral humano y variante de CJD en tejido cerebral humano (ninguno; todas están citadas en el Informe WHO TRS ECBS N.º 926, 53º informe, homogeneizados cerebrales), componentes complementarios de suero humano C1q, C4, C5, factor B, y complemento funcional completo CH50 (W1032), inmunoglobulina E de suero humano (75/502), inmunoglobulinas G, A y M de suero humano (67/86), albúmina de proteínas de suero humano, alfa-1-antitripsina, alfa-2-macroglobulina, ceruloplasmina, complemento C3, transferrina (W1031), inmunoglobulina anti-D intravenosa de control negativo (02/226), ARN de hepatitis A (00/560), antígeno superficial de hepatitis B subtipo adw2 genotipo A (03/262 y 00/588), ADN viral de hepatitis B (97/746), ARN viral de hepatitis C (96/798), antígeno p24 de HIV-1 (90/636), ARN de HIV-1 (97/656), genotipos de ARN de HIV-1 (conjunto de 10 I01/466), concentrado de fibrinógeno humano (98/614), fibrinógeno plasmático humano (98/612), hemoglobina A2 aumentada (89/666), hemoglobina F aumentada (85/616), cianuro de hemoglobina (98/708), heparina de bajo peso molecular (85/600 y 90/686), heparina no fraccionada (97/578), factor VIII de coagulación sanguínea y factor von Willebrand (02/150), concentrado de factor VIII de coagulación sanguínea humano (99/678), plasma de factor XIII de coagulación sanguínea humano (02/206), factores II, VII, IX, X de coagulación sanguínea humanos (99/826), concentrado de factores II y X de coagulación sanguínea humanos (98/590), antígeno carcinoembrionario humano (73/601), proteína C reactiva humana (85/506), ferritina humana recombinante (94/572), apolipoproteína B (SP3- 07), beta-2-microglobulina (B2M), beta-tromboglobulina humana (83/501), concentrado de factor IX de coagulación sanguínea humano (96/854), concentrado de factor IXa de coagulación sanguínea humano (97/562), factor V de Leiden de coagulación sanguínea humano, muestras de ADN humano de FV de tipo salvaje, homocigoto de FVL, heterocigoto de FVL (03/254, 03/260, 03/248), concentrado de factor VII de coagulación sanguínea humano (97/592), concentrado de factor VIIa de coagulación sanguínea humano (89/688), suero antisifilítico humano (HS), inmunoglobulina antitetánica humana (TE-3), concentrado antitrombina humano (96/520), antitrombina plasmática humana (93/768), suero de anti-tiroglobulina humano (65/93), suero de antitoxoplasmosis humano (TOXM), suero de antitoxoplasmosis humano (IgG) (01/600), inmunoglobulina de antivariola zoster humana (W1044), apolipoproteína A-1 (SP1-01), suero de antiinterferón beta humano (G038-501-572), suero antirubeola humano (66/202), suero antinuclear de ribonucleoproteína (W1063), suero (homogéneo) de factor antinuclear (66/233), suero (IgG) de antiparvovirus B19 (91/602), sueros tipos 1,2,3 de antipoliiovirus (66/202), inmunoglobulina antirrabia humana (RAI), inmunoglobulina antirubeola humana (RUBI-1- 94), suero antimúsculo liso (W1062), suero anti-ADN de dos hebras (Wo/80), suero anti-E completo de grupo sanguíneo humano (W1005), suero de *Echinococcus* humano (ECHS), inmunoglobulina antihepatitis A humana (97/646), inmunoglobulina antihepatitis B humana (W1042), suero antihepatitis E humano (95/584), antígeno-1a plaquetario antihumano (93/710), antígeno-5b plaquetario antihumano (99/666), suero antiinterferón alfa humano (B037-501-572), alfafetoproteína humana (AFP), ancrod (74/581), suero anti-A de grupo sanguíneo humano (W1001), suero anti-B de grupo sanguíneo humano (W1002), suero anti-C completo de grupo sanguíneo humano (W1004), reactivo anti-D (anti-Rh0) completo de grupo sanguíneo humano (99/836), suero anti-D (anti-Rh0) incompleto de grupo sanguíneo humano (W1006) e inmunoglobulina anti-D humana (01/572).

Otros ejemplos de sustancias adecuadas que pueden actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro del par de unión que consta de conector de analito (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que deba diseñarse un ensayo de afinidad, incluyen compuestos que pueden utilizarse como haptenos para generar anticuerpos capaces de reconocer los compuestos, e incluyen, pero de forma no excluyente, cualquier sal, éster o éter de los siguientes: hormonas, incluidas, pero de forma no excluyente, progesterona, estrógeno y testosterona, progestinas, corticoesteroides y dehidroepiandrosterona, y cualquier antígeno no proteico/no polipeptídico que estén listados en los estándares de referencia internacional de la OMS. Una lista parcial de estos estándares de referencia internacional, identificados por la sustancia seguida de un código en paréntesis de la OMS, incluye vitamina B12 (WHO 81.563), folato (WHO 95/528), homocisteína, transcobalaminas, T4/T3, y otras sustancias indicadas en el catálogo de la OMS de Preparaciones de Referencia Biológica Internacional de la OMS (disponible en la página web de la OMS, por ejemplo en la página [http://www.who.int/bloodproducts/ref\\_materials/](http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/), actualizada el 30 de junio de 2005). Los métodos y composiciones descritos en este documento pueden constar de uno o más de los estándares de referencia de la OMS mencionados arriba o una mezcla que contenga un estándar de referencia.

En al menos una realización, la presente invención proporciona una superficie de unión con dos o más unidades de captura distintas.

Otros ejemplos de sustancias que pueden actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de analito (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que se deba diseñar un ensayo de afinidad, incluyen drogas adictivas. Las drogas adictivas incluyen, por ejemplo, la siguiente lista de drogas y sus metabolitos (*por ejemplo*, metabolitos presentes en sangre, en orina y otros materiales biológicos), así como cualquier sal, éster, éter de los mismos: heroína, morfina, hidromorfona, codeína, oxycodona, hidrocodona, fentanilo, demerol, metadona, darvón, stadol, paregórico, buprenex; estimulantes tales como, por ejemplo, anfetamina, metanfetamina; metilamfetamina, etilamfetamina, metilfenidato, efedrina, pseudoefedrina, efedra, ma huang, metilendioxianfetamina (MDS), fentermina, fenilpropanolamina; amifenazol, bemigrida, benzfetamina, bromantan, clorfentermina, cropropamida, crotetamida, dietilpropión, dimetilamfetamina, doxapram, etamivan, fencanfamina, meclofenoxato, metilfenidato, niketamida, pemolina, pentetrazol, fendimetrazina, fenmetrazina, fentermina, fenilpropanolamina, picrotoxina, pipradol, prolintano, estriquina, sinefrina, fenciclidina y análogos tales como polvo de ángel, PCP, ketamina; relajantes tales como, por ejemplo, barbituratos, glutetimida, metaqualona, y meprobamato, metohexital, tiamilo, tiopental, amobarbital, pentobarbital, secobarbital, butalbital, butabarbital, talbutal, y aprobarbital, fenobarbital, mefobarbital; benzodiazepinas tales como, por ejemplo, estazolam, flurazepam, temazepam, triazolam, midazolam, alprazolam, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, halazepam, lorazepam, oxazepam, prazepam, quazepam, clonazepam, flunitrazepam; drogas GHB tales como ácido

gamma hidroxilbutírico y gamma butirólactona; glutetimida, metaqualona, meprobamato, carisoprodol, zolpidem, zaleplon; drogas cannabinoides tales como tetrahidracannabinol y análogos; cocaína, 3-4 metilendioxi metanfetamina (MDMA); alucinógenos tales como, por ejemplo, mescalina y LSD.

Otros ejemplos de sustancias que pueden actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de ligando (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que se debe diseñar el ensayo de afinidad, incluyen esteroides y otros fármacos asociados con la mejora del rendimiento, incluidos aquellos que normalmente se encuentran en mercados ilícitos, o empleados como ayuda ergogénica, tales como, por ejemplo, los siguientes compuestos y cualquier sal, éster o éter de los mismos: testosterona (incluidos sus ésteres con grupos tales como, por ejemplo, enantato, cipionato y propionato), dihidrotestosterona (DHT), tetrahydrogestrinona, nandrolona, nortestosterona, metenolona, estanozolol, metandrostenolona, metandienona, androstenediona (*por ejemplo*, 5 $\alpha$ -androstano-3,17-diona), androstenodiol tales como 1-androstenodiol (3 $\beta$ ,17 $\beta$ -dihidroxi-5 $\alpha$ -androst-1-eno), 4-androstenodiol (3 $\beta$ ,17b-dihidroxi-androst-4-eno), 5-androstenodiol (3 $\beta$ ,17b-dihidroxi-androst-5-eno), androstenodionas, tales como 1-androstenediona ([5 $\alpha$ -androst-1-en-3,17-diona), 4-androstenediona (androst-4-en-3,17-diona), 5-androstenediona (androst-5-en-3,17-diona), norandrostenodiona, 19-norandrostenodiol, 19-norandrostenodiona, norandrostenodiol, dehidroepiandrosterona (DHEA), boldenona, fluoximesterona, metandriol, metiltestosterona, oxandrolona, oximetolona, trembolona, clostebol, dehidroclorometiltestosterona, dromostanolona, epitrenbolona, gestrinona, mesterolona, metanodienona, metenolona, noretandrolona, oxandrolona, oximetolona, tetrahydrogestrinona (THG), trembolona, clenbuterol, y esteroides incluidos en el Acto de Control de Esteroides Anabólicos de 2004 (incorporados en este documento por referencia), incluidos 3 $\beta$ ,17b-dihidroxi-5 $\alpha$ -androstano; 3 $\alpha$ ,17b-dihidroxi-5 $\alpha$ -androstano; androstanodiona, bolasterona (7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimetil-17b-hidroxiandrost-4-en-3-ona), boldenona (17b-hidroxiandrost-1,4-dien-3-ona), calusterona (7 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dimetil-17b-hidroxiandrost-4-en-3-ona), clostebol (4-cloro-17b-hidroxiandrost-4-en-3-ona), dehidroclorometiltestosterona (4-cloro-17b-hidroxi-17 $\alpha$ -metil-androst-1,4-dien-3-ona), 4-dihidrotestosterona (17b-hidroxiandrostano-3-ona), drostanolona (17b-hidroxi-2 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano-3-ona), etilestrenol (17 $\alpha$ -etil-17b-hidroxiestr-4-eno), fluoximesterona (9-fluoro-17 $\alpha$ -metil-11 $\beta$ ,17b-dihidroxiandrost-4-en-3-ona), formebolona (2-formil-17 $\alpha$ -metil-11 $\alpha$ ,17b-dihidroxiandrost-1,4-dien-3-ona), furazabol (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxiandrostano[2,3-c]-furazan), 18 $\alpha$ -homo-17b-hidroxiestr-4-en-3-ona (13 $\beta$ -etil-17b-hidroxi-4-en-3-ona), 4-hidroxitestosterona (4,17b-dihidroxi-androst-4-en-3-ona), 4-hidroxi-19-nortestosterona (4,17b-dihidroxi-estr-4-en-3-ona), estanolona (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxi-5 $\alpha$ -androstano-3-ona), mesterolona (1 $\alpha$ -metil-17b-hidroxi-[5 $\alpha$ ]-androstano-3-ona), metandienona (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxiandrost-1,4-dien-3-ona), metandriol (17 $\alpha$ -metil-3 $\beta$ ,17b-dihidroxiandrost-5-ona), metenolona (1-metil-17b-hidroxi-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-ona), etiltestosterona (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxiandrost-4-en-3-ona), mibolerona (7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimetil-17b-hidroxiestr-4-en-3-ona), nandrolona (17b-hidroxiestr-4-en-3-ona), norandrostenodiol, 19-nor-4-androstenodiol (3 $\beta$ , 17b-dihidroxiestr-4-eno), 19-nor-4-androstenodiol (3 $\alpha$ , 17b-dihidroxiestr-4-eno), 19-nor-5-androstenodiol (3 $\beta$ , 17b-dihidroxiestr-5-eno), 19-nor-5-androstenodiol (3 $\alpha$ , 17b-dihidroxiestr-5-eno), norandrostenodiona, 19-nor-4-androstenediona (estr-4-en-3,17-diona), 19-nor-5-androstenediona (estr-5-en-3,17-diona), norboletona (18 $\alpha$ -homo-17b-hidroxi-4-en-3-ona), norclostebol (4-cloro-17b-hidroxiestr-4-en-3-ona), noretandrolona (17 $\alpha$ -etil-17b-hidroxiestr-4-en-3-ona), oxandrolona (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxi-2-oxa-[5 $\alpha$ ]-androstano-3-ona), oximesterona (17 $\alpha$ -metil-4,17b-dihidroxiandrost-4-en-3-ona), oximetolona (17 $\alpha$ -metil-2-hidroxi-17b-hidroxi-[5 $\alpha$ ]-androstano-3-ona), estanozolol (17 $\alpha$ -metil-17b-hidroxi-[5 $\alpha$ ]-androst-2-en[3,2-c]-pirazol), estenbolona (17b-hidroxi-2-metil-[5 $\alpha$ ]-androst-1-en-3-ona), testolactona (lactona del ácido 13-hidroxi-3-oxo-13,17-secoandrostano-1,4-dien-17-oico), 1-testosterona (17b-hidroxi-5 $\alpha$ -androst-1-en-3-ona), testosterona (17b-hidroxiandrost-4-en-3-ona), tetrahydrogestrinona (13 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dietil-17b-hidroxi-4,9,11-trien-3-ona), trembolona (17b-hidroxiestr-4,9,11-trien-3-ona).

Otros ejemplos de sustancias que pueden actuar como uno, o alternativamente el otro, miembro de un par de unión que consta de conector de ligando (grupo de captura) y analito, según la aplicación para la que se debe diseñar el ensayo de afinidad, incluyen antibióticos y otros fármacos administrados a animales (incluidos seres humanos) y cuya detección es útil en la práctica clínica y cuya detección en una preparación biológica puede conseguirse utilizando, por ejemplo, un inmunoensayo. Ejemplos de estos fármacos incluyen antibióticos tales como los listados en Preparaciones de Referencia Biológica Internacional de la OMS (disponible en [http://www.who.int/bloodproducts/ref\\_materials/Ant-Sept05.pdf](http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/Ant-Sept05.pdf), actualizado el 21 de septiembre de 2005).

Los ejemplos incluyen gentamicina (92/670), estreptomina (76/539), tobramicina (82/510) y vancomicina (50/020).

En al menos una realización, la presente invención proporciona una superficie de unión con al menos dos o más restos de captura diferentes.

Cualquiera de las características de las diversas realizaciones descritas en este documento pueden utilizarse junto con características descritas en relación a cualquier otra realización revelada. Por ejemplo, las características reveladas en relación a las composiciones de la invención pueden emplearse en cualquiera de los métodos descritos en este documento, etc. Las características descritas en relación a las realizaciones diversas o específicas no deben interpretarse como no adecuadas en relación a otras realizaciones declaradas en este documento, a no ser que esta exclusividad se afirme explícitamente o quede implícita a partir del contexto.

Determinadas realizaciones de la invención se ilustran en las figuras y ejemplos que se adjuntan, los cuales se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones de la invención, y no pretenden imponer limitaciones a la invención.

65

## Ejemplos

## Ejemplo 1

## 5 Biotinilación de baja proporción de carga de albúmina de suero bovino

Se biotiniló BSA con sulfo-NHS-LC-biotina (sulfosuccinimidil-6- [biotinamido]hexanoato; Pierce Biotechnology Inc./ Thermo Scientific) a varias proporciones de carga molar de biotina respecto a BSA (ver Tabla 1). En resumen, se disolvió sulfo-NHS-LC-biotina (556,59 g/mol) en DMF (dimetilformamida) a una concentración de 30 miligramos por mililitro (mg/ml), y se disolvió BSA liofilizada (albúmina de suero bovino, sin proteasa; Celliance Corporation, a Serologicals Company; 66.000 g/mol) en tampón borato 0,05 M de pH 8,2 a una concentración de 15 hasta 20 mg/ml. La solución de sulfo-NHS-LC-biotina se añadió a la solución de BSA de forma que la proporción de carga molar de sulfo-NHS-LC-biotina respecto a BSA fuera de 3,4 hasta 30 (moles de sulfo-NHS-LC-biotina:moles de BSA). La reacción se incubó durante 2 horas a 4 °C, y entonces se dializó inmediatamente (es decir, diafiltración o diálisis) con un tampón borato 0,05 M de pH 8,2 para eliminar el exceso de sulfo-NHS-LC-biotina (es decir, el reactivo de biotina y el reactivo de biotina hidrolizado, biotina libre). Este procedimiento general se utilizó en todo el proceso de preparación de BSA biotinilada de baja proporción de carga.

El grado de biotinilación puede estimarse utilizando cualquier método conocido en la materia para la cuantificación de biotina. Un método adecuado es el ensayo colorimétrico HABA, el cual emplea ácido 4'-hidroxiazobencen-2-carboxílico (HABA), que es selectivo para biotina. Los moles de biotina unidos por mol de BSA se estimaron mediante análisis HABA. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

El análisis de estabilidad de 17 lotes de biotinilación independientes de BSA biotinilada se completó recubriendo PMP tosilactivadas a 25 mg/ml (Dynale DYNABEADS MyOne Tosylactivated, 1,0 micra de diámetro, Invitrogen Corporation) con biotina-BSA durante 18-24 horas a 37-42 °C en tampón borato 0,1 M de pH 9,0 - 9,5 (0,030-0,050 miligramos de biotina-BSA por mg de PMP), lavando las micropartículas con TBS (Tris 0,02 M, cloruro sódico 0,15 M) de pH 7,4, bloqueando la superficie de micropartículas recubiertas con biotina-BSA con copolímero tribloque Pluronic® F108 (Pluronic® F-108 NF Prill; BASF) 0,4% - 0,6% (p/v) en TBS de pH 7,4 durante 4-4,5 horas a 37-42 °C, lavando las micropartículas con TBS de pH 7,4, dispersando las micropartículas de biotin-BSA en Pluronic® F108 0,4% - 0,6% (p/v) en TBS de pH 7,4, recubriendo las micropartículas de biotina-BSA con SA (congelado, nunca liofilizado, SA21 SA-plus, Prozyme, Inc.) en TBS de pH 7,4 durante 30-50 minutos a temperatura ambiente (0,025-0,050 miligramos de SA por mg de PMP de biotina-BSA), lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4 con azida sódica (0,1% p/v), lavando las micropartículas con tampón de micropartículas específico del ensayo Access® Free T4, diluyendo las micropartículas de 25 mg/ml a 0,35 mg/ml con tampón de micropartículas específico del ensayo Access® Free T4, incubando las micropartículas recubiertas con biotina-BSA, recubiertas con SA a 4 °C o 37 °C durante 3 días, y estudiando la capacidad de las micropartículas recubiertas con biotina-BSA, recubiertas con SA de unirse al anticuerpo específico de T4 libre biotinilado en el ensayo Access® Free T4 Assay (Beckman Coulter, Inc.). La estabilidad se determinó calculando la media de las recuperaciones de calibrador individuales de T4 libre en RLU (unidades de luz relativas, señal o respuesta). El ensayo Access® Free T4 utiliza seis calibradores diferentes (S0, S1, S2, S3, S4 y S5) con niveles de antígeno de 0 ng/ml a 6 ng/ml (ver Tabla 4). La recuperación se calculó dividiendo la respuesta en RLU del calibrador a 37 °C por la respuesta en RLU del calibrador a 4 °C y multiplicando el resultado por 100%. La estabilidad se calculó haciendo la media de la recuperación en los seis calibradores. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

La estabilidad es un indicador del cambio en la capacidad de unión de SA tras incubar la fase sólida a 4 °C o 37 °C durante 3 días. Una disminución de la estabilidad es debida al desprendimiento o disociación de biotina o reactivo de biotina unido de forma pasiva de los conjugados de biotina-BSA (ver Fig. 11; línea discontinua: 37 °C; línea continua: 4 °C) y la posterior captura de la biotina o reactivo de biotina libre por la SA con el tiempo. Los resultados indicaron que la biotina-BSA preparada a proporciones de carga molar elevadas (es decir, 8:1, 15:1, 30:1) presentan una estabilidad muy deficiente. Cuando la proporción de carga molar de reactivo de biotina respecto a BSA se redujo de 30:1 a 4:1, la estabilidad mejoró de 4% a 100%.

**TABLA 1**  
**ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE LA FASE SÓLIDA DE BIOTINA-BSA RECUBIERTA CON SA PARA 17**  
**LOTES DE BIOTINILACIÓN INDEPENDIENTES**

LOTE DE BIOTINILACIÓN	LOTE DE PMP*	PROPORCIÓN DE CARGA MOLAR (MOLES BIOTINA POR MOL BSA)	HABA (MOLES BIOTINA POR MOL BSA)	ESTABILIDAD (%)
C-0402-SP-129	5135:5	30:1	5:1	4,1
C-0406-SP-137A	RP4162	4:1	1,6	93,9
C-0406-SP-138	RP4163	8:1	3,8	69,1
C-0406-SP-139A	RP4164	15:1	8,9	24,8
C-0406-SP-137B	RP4167	4:1	1,4	100,8
C-0406-SP-139B	RP4168	15:1	9,2	16,0
C-0406-SP-142	RP4217	4:1	1,8	96,4
C-0406-SP-144	RP4219	4:1	1,6	102,2
C-0406-SP-146	RP4221	4:1	1,9	100,0

C-0410-SP-155A	RP4443	4:1	1,5	100,1
C-0410-SP-155B	RP4444	4:1	1,3	98,4
C-0410-SP-156	RP4445	4:1	1,7	108,3
C-0501-SP-157	RP4658	4,6:1	2,3	101,7
519499	RP4659	3,4:1	1,2	114,4
519500	P4660	4:1	1,8	109,2
515033	P4661	4:1	1,8	102,1
515-34	P4696	4:1	2,0	107,1
PMP* = micropartícula paramagnética				

La BSA se biotiniló a una proporción de carga molar de 30 moles de sulfo-NHS-LC-biotina por mol de BSA. La BSA biotinilada a 30:1 se ancló a PMP tosilactivadas Dynal® MyOne recubriendo las PMP tosilactivadas a 25 mg/ml con biotina-BSA durante 18-24 horas a 37-42 °C en tampón borato 0,1 M de pH 9,0 - 9,5 (0,030-0,050 miligramos de biotina-BSA por mg de PMP), lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4, bloqueando la superficie de las micropartículas recubiertas con biotina-BSA con Pluronic® F108 al 0,4% hasta 0,6% (p/v) en TBS de pH 7,4 durante 4-4,5 horas a 37-42 °C, lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4, dispersando las micropartículas tres veces con Pluronic® F108 0,4% - 0,6% (p/v) en TBS de pH 7,4, recubriendo las micropartículas de biotina-BSA con SA en TBS de pH 7,4 durante 30-50 minutos a temperatura ambiente (0,025-0,050 miligramos de SA por mg de PMP) y lavando tres veces las micropartículas con TBS de pH 7,4. Las PMP al 25 mg/ml recubiertas con biotina-BSA, recubiertas con SA se colocaron a 4 °C o 37 °C durante tres días y se colocaron sobre un imán durante 10 minutos para separar las PMP (recuperar las micropartículas de los tapones a 4 °C o 37 °C). Se reunieron los fluidos sobrenadantes sin micropartículas de 4 °C y 37 °C y se analizaron los fluidos sobrenadantes utilizando cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SEC-HPLC; sistema Beckman Coulter System Gold HPLC, software 32 KARAT™ 5.0, columna Phenomenex 300 x 7,80 mm BioSep-SEC-S 3000, fase móvil PBS pH 7,2, velocidad de flujo 1,0 ml/min, volumen de muestra 0,050 ml, tiempo de operación 17 minutos, detección con fotodiodos en serie de 200 a 400 nm).

El análisis SEC-HPLC a 210 nm del fluido sobrenadante de 37 °C reveló un nivel significativamente mayor de analitos de bajo peso molecular tanto a un tiempo de retención (TR) de 10,8 minutos como a un TR de 12,4 minutos en comparación con el fluido sobrenadante de 4 °C. Se pensó que estos picos eran biotina y/o reactivo de biotina que se había absorbido de forma pasiva a las moléculas de BSA durante el proceso de biotinilación a una proporción de carga de 30:1 (reactivo de biotina:BSA) y que no se habían eliminado mediante la diálisis o la eliminación de sales. Los resultados también indican que no hay BSA ni SA detectable (por debajo del límite de detección del método) en el fluido sobrenadante (TR de 7,8 hasta 8,2) y que el conjugado de biotina-BSA y/o la SA no se desprende de la fase sólida.

Los resultados de SEC-HPLC respaldan los resultados de estabilidad (ver Tabla 1), pues la muestra de 30 de reactivo de biotina:1 de biotina tuvo la reducción más significativa de estabilidad a 37 °C (95,9% de reducción de estabilidad, o 4,1% de estabilidad) en comparación con la de 4 °C, y también presentó la presencia de una cantidad significativa de analito o analitos de bajo peso molecular en el fluido sobrenadante de 37 °C en comparación con el fluido sobrenadante de 4 °C. Una disminución de la estabilidad es debida al desprendimiento o disociación de biotina o reactivo de biotina unido de forma pasiva de los conjugados de biotina-BSA, y la posterior captura de biotina o reactivo de biotina libre por la SA con el tiempo.

El proceso de recubrimiento con biotina-BSA se optimizó biotinilando BSA utilizando 4 moles de sulfo-NHS-LC-biotina por mol de BSA, ofreciendo 30, 40, 50 o 60 microgramos de biotina-BSA por mg de micropartículas (Dynal® DYNABEADS MyOne Tosylactivated, 1,0 micra de diámetro, Invitrogen Corporation), incubando la biotina-BSA con las micropartículas durante 2, 4 o 18 horas a 37 °C o 40 °C en borato 0,1 M de pH 9,5, lavando las micropartículas con TBS de pH 7,4, bloqueando las micropartículas con TBS de pH 7,4 que contiene Pluronic® F108 0,4% (p/v) durante 4 horas a 37 °C, lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4, dispersando las micropartículas de biotina-BSA en TBS que contiene Pluronic® F108 0,4% (p/v), acoplado SA añadiendo 35 microgramos de SA por mg de micropartículas e incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y lavando las micropartículas recubiertas de biotina-BSA, recubiertas de SA tres veces con TBS de pH 7,4.

Los resultados de las pruebas de rendimiento de ensayo (ensayos Access® Free T4 y Access® AccuTnl; Beckman Coulter, Inc.), y de las pruebas de capacidad de unión de IgG biotinilada, indicaron que el proceso de recubrimiento con biotina-BSA es robusto cuando se añade de 30 a 50 µg de biotina-BSA por mg de micropartículas, a una concentración de micropartículas de 25 mg/ml, en tampón borato 0,1 M de pH 9,5, y se incuban durante 18 a 24 horas a una temperatura de 37 °C a 42 °C. En resumen, el método de IgG biotinilado marcado con I<sup>125</sup> se utiliza para evaluar la capacidad de unión marcando IgG biotinilada y no biotinilada con I<sup>125</sup> utilizando un procedimiento de yodación convencional (tanto el anticuerpo como el anticuerpo biotinilado se incuban con NaI<sup>125</sup> y trihidrato de cloroamina T a temperatura ambiente, se detiene cada una de las reacciones con metabisulfito de sodio, el anticuerpo no biotinilado marcado con I<sup>125</sup> y el anticuerpo biotinilado marcado con I<sup>125</sup> se purifican utilizando columnas SEPHADEX G-50 precondicionadas con BSA/PBS 0,5% /azida sódica 0,1%), el RPM total (recuento por minuto)/mg de IgG-I<sup>125</sup> se calcula utilizando un contador gamma, a las micropartículas recubiertas con SA se les ofrece un exceso molar de biotina-IgG-I<sup>125</sup> (absorción activa a través de los dominios de unión a biotina) o IgG-I<sup>125</sup>

(absorción pasiva o unión no específica), las micropartículas se lavan 5 veces con un tampón de lavado, las micropartículas lavadas se colocan en un contador gamma para determinar el RPM total, y se determina la cantidad de biotina-IgG capturada de una forma específica restando el RPM de las micropartículas de SA recubiertas con IgG-I<sup>125</sup> (control de unión no específica) del RPM de las micropartículas de SA con biotina-IgG-I<sup>125</sup>.

**Ejemplo 2**

La insaturación reduce la capacidad de unión pero aumenta la señal de ensayo

Una superficie de unión insaturada y orientada utilizando un sistema biotina/SA se preparó con biotina-BSA preparada a una baja proporción de carga molar de biotina respecto a BSA (4:1) utilizando PMP. En resumen, se preparó un lote de micropartículas que tienen una superficie de unión insaturada y orientada recubriendo PMP tosilactivadas Dynal® AKT-100 con BSA biotinilada de baja proporción de carga, bloqueando las micropartículas de biotina-BSA con Pluronic® F108, dispersando las micropartículas de biotina-BSA bloqueadas en Pluronic® F108 y finalmente recubriendo las micropartículas de biotina-BSA con SA. Ver Tabla 2, "muestra BCI". A modo de comparación, se estudió una micropartícula de unión a biotina comercial (Dynal® DYNABEADS MyOne Streptavidin T1, Invitrogen Corporation). Ver Tabla 2, "control Dynal®". La superficie insaturada y la superficie de unión a biotina comercial se prepararon utilizando las mismas micropartículas de partida (PMP DynaK MyOne tosilactivada de 1,0 micras de Invitrogen Corporation).

Las superficies insaturadas y de unión a biotina comercial (es decir, recubierta con SA) se estudiaron para determinar la capacidad de unión a biotina utilizando un ensayo de capacidad de unión a biotina-C<sup>14</sup> (Invitrogen Corporation). Los resultados se muestran en la Tabla 2. En nivel del calibrador se presenta en nanogramos por ml. La capacidad de unión a biotina de las micropartículas comerciales fue de 1400 pmol de biotina/mg, mientras que la capacidad de unión a biotina de las micropartículas que tienen una superficie de unión insaturada preparadas según la invención fue solo de 214 pmol de biotina/mg. Por tanto, las micropartículas de unión a biotina comerciales presentaron una capacidad de unión a biotina más de seis veces superior que las micropartículas de igual diámetro preparadas según la invención.

También se estudió la capacidad de unión a IgG biotinilada de las micropartículas. Las micropartículas comerciales presentaron una capacidad de unión a IgG biotinilada de 20,0 microgramos de IgG biotinilada por mg de micropartículas, mientras que las micropartículas según la invención presentaron una capacidad de unión de 6,7 microgramos de IgG biotinilada por mg de micropartículas. Por tanto, las micropartículas de unión a biotina comerciales presentaron una capacidad de unión a IgG biotinilada de unas tres veces superior que las micropartículas según la invención. No obstante, la capacidad de unión de biotina de las micropartículas comerciales fue más de seis veces mayor que las micropartículas según la invención.

<b>PREPARACIÓN MICROPARTÍCULA*</b>	<b>CAPACIDAD DE UNIÓN A BIOTINA (PMOL BIOTINA/MG)</b>	<b>CAPACIDAD DE UNIÓN A IGG BIOTINILADA µG IGG/MG MICROPARTÍCULAS)</b>
Unión a biotina- comercial (Invitrogen Corp.)	1400	20,0
Insaturada	214	6,7

\* Tanto las micropartículas comerciales como las insaturadas se prepararon utilizando el mismo lote de PMP tosilactivadas Dynal® AKT-100

El rendimiento funcional de micropartículas de unión a biotina comerciales se comparó con el rendimiento de micropartículas insaturadas preparadas según la invención en un ensayo para una proteína, troponina I. En resumen, las micropartículas de unión a biotina comerciales de una micra de diámetro (Dynal® DYNABEADS MyOne Streptavidin T1, Invitrogen Corporation) recubiertas con SA recombinante, y las micropartículas insaturadas de una micra de diámetro recubiertas con SA según la invención, se utilizaron en un ensayo de troponina I utilizando el ensayo Access® AccuTnl Assay (Beckman Coulter, Inc.), un ensayo tipo sándwich, tratando las micropartículas recubiertas con SA con antitroponina I biotinilada y midiendo la respuesta de ensayo en el calibrador de troponina I (Beckman Coulter, Inc.). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MÉTODO DYNAL® (RLU)</b>	<b>MÉTODO BCI (RLU)</b>
<b>RESPUESTA CALIBRADOR (NG/ML)</b>		
S0 = 0	13.023	8116
S1 = 0,3	49.030	54.986
S2 = 1,2	149.472	194.922



S3 = 5	587.250	779.833
S4 = 25	2.870.740	3.829.280
S5 = 100	9.611.635	12.422.050
<b>% CV RESPUESTA CALIBRADOR</b>		
S0 = 0	1,9	4,3
<b>% CV DOSIS CALIBRADOR (NG/ML)</b>		
S1 = 0,3	1,0	1,8
S2 = 1,2	1,8	0,7
S3 = 5	3,6	0,4
S4 = 25	3,2	1,0
S5 = 100	4,6	1,7
<b>PROPORCIONES</b>		
S1/S0	3,8	6,8
S5/S0	738	1531

La Tabla 3 ilustra que, en un rango de niveles de calibrador (S1 hasta S5), las micropartículas insaturadas según la invención presentan unas lecturas de RLU mayores que las micropartículas comerciales, y unas lecturas de RLU de fondo más bajas (S0) que las micropartículas comerciales. Este resultado es sorprendente e inesperado porque las micropartículas insaturadas según la invención presentan una capacidad de unión a biotina inferior que las micropartículas de unión a biotina comerciales (ver Tabla 2). La respuesta de calibrador fue mayor para las micropartículas insaturadas en casi todo el rango. La precisión de ensayo, medida como % de CV de la respuesta del calibrador del S0 (CV = coeficiente de variación), fue más de dos veces superior para las micropartículas insaturadas. Sin embargo, las micropartículas insaturadas tuvieron una respuesta en RLU de S0 significativamente menor en comparación con las micropartículas comerciales (8116 vs. 13.023), y una diferencia pequeña en los RLU entre repeticiones puede dar lugar a un % de CV mayor cuando la señal de RLU disminuye. La imprecisión del ensayo, expresada como % de CV de la dosis del calibrador, fue, en promedio, significativamente menor para las micropartículas insaturadas. En cuanto al rango dinámico, las proporciones de S1/S0 y S5/S0 fueron unas dos veces superiores para las micropartículas insaturadas. Por tanto, aunque las micropartículas según la invención se unen a menos biotina (y, por consiguiente, menos IgG biotinilada), tienen un rendimiento inesperadamente mejor en un ensayo de afinidad funcional y tienen un ruido o unión no específica reducidos, en comparación con las micropartículas comerciales.

El rendimiento de las micropartículas recubiertas con SA de 2,8 micras de diámetro comerciales (Dynal® DYNABEADS M-280 Streptavidin, capacidad de unión a biotina de 650 hasta 900 picomoles de biotina por mg, Invitrogen Corporation) se comparó con el rendimiento de las micropartículas recubiertas con SA de 1,0 micras de diámetro preparadas según la invención (capacidad de unión a biotina de aproximadamente 214 picomoles de biotina por mg; ver Tabla 2) en el ensayo Access® Free T4 (Beckman Coulter, Inc.). Se analizó T4 libre utilizando el ensayo Access® Free T4, un ensayo competitivo, tratando las micropartículas recubiertas con SA (PMP de 2,8 micras de diámetro recubiertas con SA para el "Método Dynal®"; PMP de 1,0 micras de diámetro recubiertas con SA preparadas según la invención para el "Método 'BC'") con anti-T4 biotinilado según la invención y midiendo la respuesta de ensayo en un calibrador de T4 (Beckman Coulter, Inc.). Los ensayos se realizaron en un sistema de inmunoensayo Access® 2 (Beckman Coulter, Inc.), y los resultados en RLU obtenidos en este sistema se muestran en la Tabla 4.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>MÉTODO DYNAL® (RLU)</b>	<b>MÉTODO BCI (RLU)</b>
<b>RESPUESTA CALIBRADOR (NG/ML)</b>		
S0 = 0	1.409.355	1.486.955
S1 = 0,5	616.624	672.265
S2 = 0,96	302.663	331.858
S3 = 1,97	113.027	119.425
S4 = 2,96	68.655	70.185
S5 = 6,08	34.120	34.385
<b>% CV CALIBRADORES</b>		
S1 = 0,5	1,7	1,4
S2 = 0,96	1,1	2,1
S3 = 1,97	1,8	2,0
S4 = 2,96	2,7	0,0
S5 = 6,08	1,0	3,8
<b>PROPORCIONES</b>		
S1/ S0	43,8	45,2
S2/ S0	21,5	22,3

S3/ S0	8,0	8,0
S4/ S0	4,9	4,7
S5/ S0	2,4	2,3

Como se muestra en la Tabla 4, las micropartículas recubiertas con SA de 1,0 micras preparadas según la invención dieron aproximadamente la misma señal para el analito (T4 libre) que las micropartículas recubiertas con SA de 2,8 micras de diámetro comerciales. Este resultado es inesperado y sorprendente porque las micropartículas insaturadas según la invención presentan una capacidad de unión a botina menor que las micropartículas antibiotina comerciales (Dynal® DYNABEADS M-280 Streptavidin, capacidad de unión a biotina de 650 a 900 picomoles de biotina por mg, Invitrogen Corporation). Preparar micropartículas según la invención, como se ilustra en las tablas de arriba (ver Tablas 2, 3 y 4) da lugar a una superficie de unión insaturada, con lo que se reduce el número de ligandos (biotinas). Las micropartículas según la invención se unen menos (214 picomoles por mg para las micropartículas según la invención, en comparación con 650 a 900 picomoles por mg para las micropartículas DYNABEADS M-280 comerciales, y más de 1.000 picomoles por mg para las micropartículas DYNABEADS MyOne SA T1), pero actúan mejor (ver Tabla 3 y Tabla 4). Las micropartículas de 1,0 micras según la invención se unen ligeramente menos que una micropartículas de 2,8 micras, pero las micropartículas de la invención generan más señal.

En general, los resultados establecen que las micropartículas insaturadas según la invención, aunque tienen una capacidad de unión inferior que las micropartículas comerciales, producen señales de ensayo que son tan buenas como, o mejores que, las micropartículas comerciales. Esto es cierto incluso para superficies de unión de la invención con capacidades de unión significativamente inferiores que las micropartículas comerciales.

### 20 Ejemplo 3

Preparar una superficie insaturada empleando una etapa de dispersión

La biotina-BSA preparada utilizando una proporción de carga molar baja de reactivo de biotilación respecto a BSA (4:1) se utilizó en un método de dispersión para preparar una superficie de unión insaturada. En resumen, la biotina-BSA (preparada como se ha descrito arriba) se ancló covalentemente a micropartículas Dynal® como se ha descrito arriba para producir una superficie que estaba insaturada con respecto al número de biotinas por unidad de área superficial de soporte. Entonces, las micropartículas recubiertas se emplearon en una etapa de dispersión antes de añadir SA.

En los estudios iniciales se utilizó un hemocitómetro (análisis de microscopio) para evaluar el estado de agregación de las micropartículas recubiertas con biotina-BSA, preparadas como se describe arriba, (1) antes de la adición de SA, (2) después de la adición gota a gota de una solución de micropartículas recubiertas con biotina-BSA de 10 mg/ml a una solución de SA en agitación continua (0, 125, 250, 375, 500, 750 o 1000 microgramos de SA por ml) y (3) después de la adición de diferentes cantidades de una solución de SA de 18 mg/ml (25, 50, 75, 100, 150 o 200 microgramos de SA por mg de micropartículas) a una solución de micropartículas recubiertas con biotina-BSA de 10 mg/ml. Los resultados con hemocitómetro se dieron como monómeros (micropartículas unitarias), dímeros (agregados de dos micropartículas), trímeros (agregados de tres micropartículas), agregados pequeños (agregados de 4 a 10 micropartículas) y agregados grandes (agregados de más de 10 micropartículas). Los agregados se definen como la asociación de dos o más micropartículas de biotina-BSA a través de un entrecruzamiento con SA (es decir, la SA es multivalente con cuatro unidades y cada unidad tiene un dominio de unión a biotina). Los resultados con hemocitómetro indicaron que las micropartículas con biotina-BSA estaban monodispersas (solo monómeros o dímeros) antes de la adición de SA, agregadas en su mayoría (agregados grandes) cuando las micropartículas de biotina-BSA se titularon (gota a gota) en soluciones de SA de hasta 750 microgramos de SA por mililitro, monodispersas (trímeros, dímeros y monómeros) cuando las micropartículas de biotina-BSA se titularon (gota a gota) en soluciones de SA de 1000 microgramos de SA por mililitro y muy agregadas (agregados grandes) cuando se añadió SA a micropartículas de biotina-BSA en todas las concentraciones estudiadas. En este documento, el término sustancialmente monodisperso significa una población de micropartículas que existen sustancialmente solo como monómeros y dímeros.

Las micropartículas recubiertas con biotina-BSA, recubiertas con SA preparadas mediante adición gota a gota de micropartículas recubiertas con biotina-BSA a una solución de SA en agitación, o mediante la adición de una solución de SA a una solución de micropartículas de biotina-BSA en agitación, pudieron llevarse a un estado temporal de monodispersión (mayoritariamente trímeros, con dímeros y monómeros) sometiendo las micropartículas recubiertas con SA a una energía de sonicación (2 x 300 vatios durante 60 segundos) con agitación, pero las micropartículas no continuaron monodispersas con el tiempo y volvieron a estar muy agregadas. La energía de sonicación no dio lugar a micropartículas recubiertas con biotina-BSA y recubiertas con SA permanentemente monodispersas, y no pudo reducirse la propensión de las micropartículas de biotina-BSA a agregarse debido al entrecruzamiento a través de SA.

Se realizaron estudios con hemocitómetro para determinar la cantidad de Pluronic® F108 (17 niveles de dilución desde 0 µM hasta 1000 µM de Pluronic® F108 en agua) necesaria para obtener una monodispersión de micropartículas hidrófobas (PMP de poliestireno de 1,03 micras, n.º cat. M1-070/40, EMD Biosciences, Inc.). Los resultados de estos estudios indicaron que las micropartículas M1-070/40 estaban sustancialmente monodispersas (es decir, solo monómeros y dímeros) a concentraciones de Pluronic® F108 desde 27,04 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas (nivel de dilución 6) hasta 2027,7 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas (nivel de dilución

15). Las micropartículas se agregaban a concentraciones de Pluronic® F108 inferiores a 27,04 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas, y a concentraciones superiores a 2027,7 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas (con toda probabilidad debido al apilamiento en varias capas de copolímeros tribloque). Los cálculos de área superficial predijeron que una monocapa teórica de Pluronic® F108 necesitaría al menos 4,1 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas, suponiendo una área superficial interfacial de 20 nm<sup>2</sup> por molécula de Pluronic® F108, y una área superficial de micropartículas de 38,38 cm<sup>2</sup>/mg (basado en una esfera perfectamente redonda de superficie lisa de 1,03 µm). Debería tenerse en cuenta que las micropartículas de M1-070/40 no eran uniformes en cuanto a tamaño o superficie lisa (distribución de tamaño heterogénea), y contenían una gran población de finos de menos de 1,03 micras de diámetro (basado en análisis de tamaño de micropartículas utilizando un analizador de tamaño de partículas de difracción láser Beckman Coulter LS13 320). Tanto los finos de micropartículas como una superficie de micropartículas rugosa indicaría que las micropartículas M1-070/40 tienen una área superficial mayor por mg que la calculada arriba. Los resultados con el hemocitómetro respaldaron esta suposición puesto que se necesitó más de 27 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas para una monodispersión de micropartículas. Los resultados de este estudio indicaron que Pluronic® F108 puede dar lugar a una monodispersión de micropartículas a concentraciones desde 27,04 hasta 2027,7 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas (niveles de dilución de 6 hasta 15).

Los lotes específicos de micropartículas (Dyna® DYNABEADS MyOne tosilactivadas, 1,0 micra de diámetro, Invitrogen Corporation) recubiertas con biotina-BSA tenían una área superficial de 74 a 84 cm<sup>2</sup>/mg (según el certificado de análisis; Invitrogen Corporation). En base a estos valores, y a los estudios con hemocitómetro de Pluronic® F108 arriba indicados, se calculó que una solución de Pluronic® F108 al 0,4% (p/v) (o 4 mg/ml), que contiene 25 mg de micropartículas de biotina-BSA por ml, daría aproximadamente 160 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas. Puesto que las micropartículas M1-070/40 de 1,03 micras (EMD Biosciences, Inc.) utilizadas en el estudio con hemocitómetro de Pluronic® F108 tenían una área superficial superior a 38,38 cm<sup>2</sup>/mg, y estaban monodispersas a concentraciones de 27,04 a 2027,7 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas, se utilizó una solución de Pluronic® F108 al 0,4% (p/v), o 160 µg de Pluronic® F108/mg de micropartículas para los estudios de dispersión iniciales para asegurar que estaba presente una cantidad suficiente de Pluronic® F108 para promover la monodispersión de micropartículas de biotina-BSA.

Las micropartículas recubiertas con biotina-BSA y recubiertas con SA preparadas añadiendo SA (25 hasta 50 µg de SA/mg de micropartículas) a micropartículas de biotina-BSA al 25 mg/ml dispersas en un tampón PBS (fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 7,2) que contenía Pluronic® F108 (Pluronic® F-108 NF Prill, BASF) al 0,4% (p/v), o tampón TBS (Tris 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 7,2) que contenía Pluronic® F108 al 0,4% (p/v), estaban monodispersas tras la adición de SA.

Las micropartículas siguieron monodispersas independientemente del orden de adición de SA (*es decir*, micropartículas de biotina-BSA añadidas gota a gota a SA, o SA añadida a micropartículas de biotina-BSA), siempre que las micropartículas de biotina-BSA estuvieran dispersas en una solución que contenía Pluronic® F108 al 0,4% (p/v) antes de su combinación con SA. A diferencia del uso de sonicación como se ha indicado arriba, las micropartículas recubiertas con biotina-BSA y recubiertas con SA siguieron monodispersas si las micropartículas de biotina-BSA se dispersaban en un tampón que contenía Pluronic® F108 antes de su combinación con SA. Por tanto, Pluronic® F108 al 0,4% (p/v) actuó con éxito como agente de dispersión para promover la monodispersión de micropartículas de biotina-BSA tanto antes como después de la combinación de micropartículas de biotina-BSA mejorando la estabilidad coloidal de las micropartículas (hidrofobicidad de la superficie de soporte de la micropartícula reducida, carga negativa de la superficie de soporte de la micropartícula aumentada debido a los grupos hidroxilo que cuelgan de Pluronic® F108 y repulsión de micropartículas aumentada debido a la repulsión de las cargas negativas de superficie a superficie) y permitiendo que las moléculas de SA se unan con todas las biotinas de la superficie de las micropartículas disponibles (no unidas y accesibles) antes de que pueda ocurrir el entrecruzamiento de micropartículas. El entrecruzamiento solo puede ocurrir si las biotinas de las micropartículas están disponibles, y si al menos dos de los cuatro dominios de unión de la SA pueden unirse a dos biotinas no unidas y accesibles de dos micropartículas distintas.

Se determinó empíricamente que Pluronic® F108 actuaba de agente de dispersión para micropartículas recubiertas con BSA biotinilada de baja proporción de carga a concentraciones desde 0,4% hasta 0,6% (p/v). En resumen, la combinación de proporción de carga de SA (10, 15, 25 y 35 µg de SA/mg de micropartículas de biotina-BSA), tiempos de incubación (30 y 60 minutos) y porcentaje de Pluronic® F108 (0,4 hasta 0,6% p/v) se evaluaron para optimizar la etapa de dispersión. Los resultados de los estudios de rendimiento de ensayo (ensayos Access® Free T4 y Access® AccuTnl; Beckman Coulter, Inc.) y los estudios de capacidad de unión a IgG biotinilada indicaron que el proceso de dispersión es robusto cuando se añade de 25 hasta 35 µg de SA por mg de micropartículas de biotina-BSA, a una concentración de micropartículas de 25 mg de micropartículas de biotina-BSA/ml, en un tampón TBS (Tris 20 mM, cloruro sódico 150 mM, pH 7,2) que contiene Pluronic® F108 a una concentración del 0,4% al 0,6% (p/v) y se incubaba durante 30 hasta 60 minutos.

Una vez que las micropartículas biotiniladas se trataron y se dispersaron en una solución de Pluronic® F108 a una concentración del 0,4 al 0,6% (p/v) se pudieron añadir bajos niveles o cantidades de SA a las micropartículas biotiniladas sin la formación de agregados o aglomeraciones de micropartículas. Este proceso dio lugar a una monodispersión de micropartículas después del recubrimiento de micropartículas con SA. Una ilustración del proceso se muestra en la Fig. 6, la cual muestra el tratamiento con SA de micropartículas recubiertas en ausencia de Pluronic® F108 e ilustra la monodispersión que resulta del tratamiento con Pluronic® F108.

Ejemplo 4

Relación señal-ruido aumentada debido a la insaturación y orientación de la SA, el bloqueo superficial aumentado y la eficiencia de unión mejorada

5

Se llevó a cabo una comparación en dos plataformas de ensayo entre la relación señal-ruido de las micropartículas convencionales y la de las micropartículas insaturadas de la invención, las cuales se caracterizan por la insaturación y orientación de la SA, el bloqueo aumentado de la superficie y la eficiencia de unión mejorada.

10

Se creó una superficie de unión dirigida contra un péptido natriurético tipo B o péptido natriurético cerebral (BNP) sobre micropartículas convencionales (micropartículas M1-070/40, EMD Biosciences) utilizando un recubrimiento primario de anticuerpo GxBiotin (antibiotina de cabra) de la superficie de una micropartícula, seguido de un recubrimiento secundario con un fragmento Fab biotinilado OMNICONAL® (Biosite, Inc.) dirigido contra BNP. En pocas palabras, el recubrimiento primario de IgG GxBiotin se aplicó a micropartículas al 10 mg/ml utilizando una reacción con carbodiimida activando los grupos carboxilo superficiales de la micropartícula (70 hasta 100  $\mu$ moles de COOH/g) con aproximadamente 6 hasta 15 moles de EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida; Pierce Biotechnology Inc./ Thermo Scientific) y de 6 a 10 moles de sulfo-NHS (n-hidroxisulfosuccinimida; Pierce Biotechnology Inc./ Thermo Scientific) por mol de carboxilos superficiales en MES de pH 5,5, incubando las micropartículas con agentes de activación durante un tiempo de 30 a 35 minutos, eliminando el exceso de agentes de activación lavando las micropartículas tres veces con MES de pH 5,5, añadiendo 40 microgramos de IgG GxBiotin por mg de micropartículas activadas, incubando las micropartículas activadas con IgG GxBiotin durante un tiempo de 120 a 135 minutos, eliminando el exceso de IgG GxBiotin y neutralizando los grupos carboxilo activados residuales con un tampón basado en glicina, arrancando la IgG GxBiotin absorbida de forma pasiva utilizando tapones de pH bajo (pH 2,5) y elevado (pH 8.0) que contienen el surfactante TRITON® X-100 (polietilenglicol p-(1,1,3,3- tetrametilbutil)-fenil éter), y bloqueando la superficie de la micropartícula con BSA.

25

El recubrimiento secundario se aplicó lavando las micropartículas con un recubrimiento primario de IgG GxBiotin en un diluyente de BNP específico del ensayo, añadiendo 10 microgramos Fab BNP biotinilado por mg de micropartículas de GxBiotin, incubando Fab BNP biotinilado con las micropartículas durante un tiempo de 90 a 135 minutos a temperatura ambiente, lavando las micropartículas para eliminar el exceso de Fab BNP biotinilado y diluyendo las micropartículas recubiertas con BNP hasta 1,0 mg/ml con un diluyente de BNP específico del ensayo.

30

Las micropartículas insaturadas según la invención se prepararon anclando covalentemente BSA biotinilada de baja proporción de carga a PMP tosilactivadas Dynale AKT-100, donde la BSA fue biotinilada a una proporción de carga molar baja de 4 moles de biotina por 1 mol de BSA, seguido de bloqueo de las micropartículas de biotina-BSA con Pluronic® F108, dispersión de las micropartículas de biotina-BSA bloqueadas en Pluronic® F108 y finalmente recubrimiento de las micropartículas de biotina-BSA con SA. La proporción de carga del anticuerpo monoclonal fue la misma para las micropartículas recubiertas convencionales y las micropartículas insaturadas. El Fab OMNICONAL biotinilado se dirigió contra BNP. Se evaluaron las micropartículas recubiertas convencionales y las micropartículas insaturadas a la misma concentración de micropartículas (1,0 mg/ml), y se estudiaron en formatos de ensayo Access® idénticos (Beckman Coulter, Inc.) con idénticos reactivos, muestras de control y muestras de pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

40

Se midió la relación señal-ruido para las micropartículas convencionales y las insaturadas en cada una de las dos plataformas de ensayo (Beckman Coulter, Inc.): el sistema de inmunoensayo UniCel® Dxl 800 Access® Immunoassay System (sistema de rendimiento relativamente elevado) y el sistema de inmunoensayo Access® 2 Immunoassay System (sistema de rendimiento relativamente bajo). Se midió la respuesta de calibrador en un intervalo de niveles de calibrador y para 13 muestras de pacientes separadas. Los resultados se muestran para las micropartículas convencionales (“Control” en la Tabla 5) y para las micropartículas insaturadas (“Dev 3” en la Tabla 5) en RLU. El sesgo de ensayo de la plataforma, expresado como “% sesgo” se determinó de la misma forma tanto para las micropartículas de control como las insaturadas. El término “sesgo” se refiere a las diferencias de dosis de ensayo que pueden ocurrir entre sistemas de ensayo cualquiera, incluidos el sistema Access® 2 Immunoassay System y el sistema UniCel® Dxl 800 Access® Immunoassay System, debido a diferencias en el hardware, diseño y rendimiento (esto es, el sistema Access® 2 Immunoassay System puede realizar 100 ensayos por hora, y el sistema UniCel® Dxl 800 Access® Immunoassay System puede realizar 400 ensayos por hora), aunque ambas plataformas utilicen reactivos y suministros idénticos. Cualquier sesgo puede atribuirse a diferencias en la forma en que cada plataforma sónica, mezcla, lava e incuba el reactivo de micropartícula. Se calculó la dosis media para las micropartículas convencionales y para las micropartículas insaturadas.

55

Como se ilustra en la Tabla 5, las medidas del sesgo para las micropartículas según la invención fueron mejores en general que para las micropartículas convencionales. La Tabla 5 también demuestra que para las micropartículas insaturadas: (1) el fondo fue inferior (comparar S0 con S1-S5), (2) la señal respecto al fondo fue más favorable en todos los niveles de calibrador y en todas las muestras de pacientes y (3) la sensibilidad fue mayor para todos los niveles de calibrador y todas las muestras de pacientes. Por tanto, las micropartículas insaturadas consiguieron un aumento de la señal de ensayo (por ejemplo, utilizando la plataforma Dxl,  $13 \times 10^6$  RLU a S5 para las micropartículas convencionales, en comparación con  $23 \times 10^6$  RLU a S5 para las micropartículas insaturadas de la invención), y una disminución significativa del ruido o fondo de ensayo (por ejemplo, utilizando la plataforma Dxl,  $10 \times 10^3$  RLU a S0 para las micropartículas convencionales, en comparación con  $7 \times 10^3$  RLU a S0 para las micropartículas insaturadas de la invención).

65

**TABLA 5**  
**ENSAYO DE SEÑAL AUMENTADA DEBIDO AL ANTICUERPO BIOTINILADO INSATURADO Y ORIENTACIÓN SOBRE UNA SUPERFICIE DE UNIÓN DE MICROPARTÍCULA**

*MUESTRA PARÁMETRO REPUESTA CALIBRADOR MEDIA (PICOGRAMO/ML)	CONTROL		(% D SESGO Dxl/A2)	DEV 3		% SESGO (Dxl/A2)
	UNICEL® Dxl	ACCESS® 2(A2)		UNICEL® Dxl	ACCESS® 2	
S0 = 0	10.778	10.166	106	7554	6535	116
S1 = 29	63.634	46.350	137	143.801	106.980	134
S2 = 113	268.760	186.100	144	665.839	493.437	135
S3 = 525	1.310.426	953.801	137	3.195.942	2.538.410	126
S4 = 2465	6.850.244	5.802.479	118	14.054.826	13.111.100	107
S5 = 4841	13.366.055	12.411.410	108	23.141.201	23.554.060	98
<b>Dosis media</b>						
QC 1	90,76	89,23	102	88,46	91,37	97
QC 2	419,01	405,32	103	417,08	419,32	99
QC 3	2174,64	2125,20	102	2136,45	2145,01	100
Paciente 1	94,05	84,09	112	112,49	118,93	95
Paciente 2	72,46	62,89	115	90,44	94,43	96
Paciente 3	57,51	49,23	117	73,91	74,93	99
Paciente 4	171,74	158,64	108	197,03	215,25	92
Paciente 5	417,49	369,84	113	589,08	578,74	102
Paciente 6	82,20	75,21	109	78,65	82,89	95
Paciente 7	131,27	119,80	110	168,63	171,98	98
Paciente 8	55,68	50,79	110	62,06	62,87	99
Paciente 9	66,79	61,65	108	91,96	91,62	100
Paciente 10	55,34	51,21	108	72,34	72,48	100
Paciente 11	51,59	45,63	113	53,19	53,15	100
Paciente 12	57,26	52,38	109	69,96	70,17	100
Paciente 13	105,51	93,47	113	143,18	142,86	100
<b>Dosis media</b>			110			98

\* INST (N=5 PARA CADA UNA):

Se realizó otra comparación de las micropartículas según la invención y una micropartícula de unión comercial (ver Tabla 2 para una descripción de las micropartículas). En esta comparación, se obtuvo una micropartícula comercial Dynal® (Invitrogen Corporation), preparada recubriendo con un recubrimiento primario PMP tosilactivadas Dynal® AKT-100 con SA recombinante. El rendimiento de la micropartícula comercial recubierta con SA se comparó con una micropartícula según la invención producida recubriendo PMP tosilactivadas Dynal® AKT-100 con BSA biotinilada de baja proporción de carga, bloqueando las micropartículas de biotina-BSA con Pluronic® F108, dispersando las micropartículas de biotina-BSA en Pluronic® F108, y finalmente recubriendo las micropartículas de biotina-BSA con SA. Tanto las micropartículas comerciales como las micropartículas insaturadas se utilizaron en un ensayo de troponina I (ensayo Access® AccuTnl; Beckman Coulter, Inc.) empleando un anticuerpo biotinilado contra Tnl como grupo de captura. Las micropartículas comerciales y las micropartículas insaturadas de la invención se evaluaron a la misma concentración de micropartículas y se estudiaron en el formato de ensayo idéntico con idénticos reactivos, muestras de control y muestras de pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

**TABLA 6**  
**RELACIÓN SEÑAL-RUIDO DE ENSAYO AUMENTADA DEBIDO A LA INSATURACIÓN Y ORIENTACIÓN DE SA, Y A LA INSATURACIÓN Y ORIENTACIÓN DEL POSTERIOR ANTICUERPO BIOTINILADO SOBRE UNA SUPERFICIE DE MICROPARTÍCULA**

PARÁMETRO RESPUESTA CALIBRADOR (PICOGRAMOS/ML)	MÉTODODYNAL®	MÉTODO BCI
S0 = 0	13.023	8116
S1 = 29	49.030	54.986
S2 = 113	149.472	194.922
S3 = 525	587.250	779.833
S4 = 2465	2.870.740	3.829.280
S5 = 4841	9.611.635	12.422.050
<b>% CV RESPUESTA CALIBRADOR</b>		

S0 = 0	1,9	4,3
<b>% CV DOSIS CALIBRADOR</b>		
S1 = 29	1,0	1,8
S2 = 113	1,8	0,7
S3 = 525	3,6	0,4
S4 = 2465	3,2	1,0
S5 = 4841	4,6	1,7
<b>PROPORCIONES</b>		
S1/S0	3,8	6,8
S5/S0	738	1531

Las micropartículas insaturadas de la invención dieron lugar a un aumento significativo de la señal de ensayo en comparación con las micropartículas comerciales (*por ejemplo*, S5 aumentó de  $9,6 \times 10^6$  RLU hasta  $12,4 \times 10^6$  RLU), y una disminución significativa del ruido o fondo de ensayo (*por ejemplo*, S0 disminuyó de  $13 \times 10^3$  RLU hasta  $8 \times 10^3$  RLU). Por tanto, las micropartículas insaturadas de la invención presentaron una relación señal-ruido de ensayo aumentada debido a la naturaleza insaturada y orientación de la SA sobre la superficie de unión de las micropartículas y a su efecto de insaturación y orientación acumulativo en el anticuerpo biotinilado añadido posteriormente. Nota: las comparaciones de arriba del método Dynal® y el método BCI utilizaron el método optimizado Dynal® (producto comercializado, Dynal® DYNABEADS MyOne Streptavidin T1; Invitrogen Corporation), pero no el método BCI optimizado. Los ensayos posteriores de TnI (ensayo Access® AccuTnI) de las micropartículas insaturadas utilizando el método BCI optimizado dio lugar a un aumento aún más significativo de la señal de ensayo (*esto es*, S1 = 80.000 RLU, S5 = 18.300.000 RLU), un ruido o fondo de ensayo similar (*esto es*, S0 = 8.500 RLU) y unas relaciones de curva aumentadas (*esto es*, S1/S0 = 9,4, S5/S0 = 2.130).

#### Ejemplo 5

##### Reducción de la unión no específica

Se llevaron a cabo estudios que revelaron reducciones en la unión no específica utilizando micropartículas preparadas según la invención, puesto que la unión no específica es un fenómeno no deseado en muchos formatos de ensayo. La unión no específica describe acontecimientos de unión artefactual en un inmunoensayo que implica sus componentes y/o superficies de soporte que proporcionan subproductos indeseables que pueden alterar los parámetros de rendimiento incluida, como ejemplo no excluyente, la relación señal-ruido. La unión no específica puede implicar unión a la propia superficie de soporte en fase sólida y/o al complejo ligando::acoplador a soporte depositado sobre la superficie de soporte. Se examinó la realización específica de una micropartícula empleando BSA como acoplador a soporte.

BSA es una albúmina (albúmina de suero bovino) y las albúminas pueden unirse a hormonas tiroideas. BSA se ha identificado como proteína de unión para las hormonas tiroideas T3 y T4. Si una superficie de soporte en fase sólida se recubre con BSA, la superficie de unión captará o unirá este tipo de hormonas tiroideas, a menos que esté satisfactoriamente bloqueada.

Puesto que las micropartículas de SA insaturadas se producen recubriendo micropartículas con BSA biotinilada, bloqueando la superficie con Pluronic® F108 y recubriendo la superficie de biotina-BSA con SA, las micropartículas insaturadas de SA tienen el potencial de unirse a hormonas tiroideas tales como T3 y T4, a menos que su superficie esté suficientemente bloqueada. En particular, si las micropartículas insaturadas de SA se incuban con conjugado de fosfatasa alcalina de T3, las micropartículas pueden unirse al conjugado T3 y generar señales de unión no específica (NSB) en un ensayo, a menos que la superficie se bloquee y se reduzca o se elimine la unión no específica. Además de un fondo aumentado, una señal de calibrador elevada puede ser el resultado de la unión no específica del conjugado de T3. Se determinó empíricamente que Pluronic® F108 bloqueaba las micropartículas recubiertas con BSA biotinilada de baja proporción de carga a concentraciones de 0,4% a 0,6% (p/v).

Los estudios iniciales evaluaron BSA 0,1% (p/v) en Tris 0,1 M de pH 8,0, y Pluronic® F108 0,4% (p/v) en Tris 0,1 M de pH 8,0 como agentes bloqueadores para micropartículas paramagnéticas tosilactivadas recubiertas con BSA biotinilada. Las micropartículas de biotina-BSA se incubaron con los tapones de bloqueo BSA 0,1% (p/v) o Pluronic® F108 0,4% (p/v) durante 18 horas a 37 °C y se recubrieron con SA titulando lentamente las micropartículas de biotina-BSA en un exceso molar de SA. Las micropartículas de biotina-BSA se lavaron tres veces antes del bloqueo y también después del bloqueo, utilizando los siguientes tapones: PBS de pH 7,4, PBS con TRITON X-100 0,1% (p/v) de pH 7,4, PBS con Pluronic® F108 0,4% (p/v) de pH 7,4, TBS de pH 7,4, TBS con TRITON x-100 0,1% (p/v) de pH 7,4 o TBS con Pluronic® F108 0,4% (p/v). Los resultados de los estudios de rendimiento de ensayo (ensayo Access® AccuTnI; Beckman Coulter, Inc.) indicaron que el tampón de bloqueo Pluronic® F108 0,4% (p/v), y los lavados con TBS de pH 7,4, dieron lugar a la menor señal de fondo (las RLU de S0 más bajas), a la mayor señal de calibrador (las RLU de S1 y S5 más elevadas), al mayor intervalo dinámico de ensayo y a la mayor proporción señal-ruido.

Los estudios de optimización de bloqueo posteriores evaluaron el rendimiento de micropartículas de biotina-BSA preparadas con BSA biotinilada con sulfo-NHS-LC-biotina, sulfo-HHS-LC-LC-biotina o biotina PFP, lavadas tres veces con TBS de pH 7,4,

bloqueadas con tapones de bloqueo BSA 0,1% (p/v) o Pluronic® F108 0,4% (p/v) durante 4 horas a 37 °C o 18 horas a 37 °C, lavadas tres veces con TBS de pH 7,4, y recubiertas con SA o neutravidina titulando lentamente las micropartículas de biotina-BSA en un exceso molar de SA o neutravidina. Los resultados de los estudios de rendimiento de ensayo (ensayo Access® AccuTnl; Beckman Coulter, Inc.) indicaron que las micropartículas de sulfo-NHS-LC-biotina BSA y las micropartículas de biotina PFP BSA, bloqueadas con Pluronic® F108 0,4% (p/v) durante 4 horas a 37 °C, y recubiertas con SA o neutravidina, dieron lugar a la señal de fondo más baja (S0), la señal de calibrador más elevada (S1 y S5), el intervalo dinámico de ensayo más amplio y la relación señal-ruido más elevada. Los estudios finales de optimización de bloqueo con Pluronic® F108 utilizaron micropartículas de biotina-BSA preparadas depositando BSA conjugada con sulfo-NHS-LC-biotina de baja proporción de carga (40 microgramos de biotina-BSA por mg de micropartículas) sobre micropartículas tosilactivadas Dynal® MyOne (Dynal® DYNABEADS MyOne Tosylactivated, 1,0 micras de diámetro, Invitrogen Corporation) a 40 °C durante 18 horas en borato 0,1M de pH 9,5. Las micropartículas de biotina-BSA se lavaron tres veces con TBS de pH 7,4, se bloquearon con Pluronic® F108 0,2%, 0,4%, 0,6% o 0,8% (p/v) en TBS de pH 7,4 durante 2, 4 o 24 horas a 40 °C, se lavaron tres veces con TBS de pH 7,4, y se recubrieron con SA dispersando las micropartículas de biotina-BSA en TBS de pH 7,4 con Pluronic® F108 0,4% (p/v) y luego se añadieron 35 microgramos de SA por mg de micropartículas. Los resultados de los estudios de rendimiento de ensayo (ensayos Access® Free T4 y Access® AccuTnl; Beckman Coulter, Inc.), y los estudios de capacidad de unión a IgG biotinilada, indicaron que las micropartículas bloqueadas durante 4 horas con Pluronic® F108 0,4% hasta 0,6% (p/v) dieron lugar a la señal de fondo más baja, la señal de calibrador más elevada, el intervalo dinámico de ensayo más amplio, la relación señal-ruido más elevada y una capacidad de unión a IgG biotinilada más reproducible.

Para evaluar la unión no específica de micropartículas insaturadas recubiertas con SA, se incubó un lote de micropartículas insaturadas recubiertas con SA a 4 °C o 37 °C durante 3 días, y se estudiaron en un inmunoensayo de T4 libre utilizando el calibrador Access® Free T4 y los paquetes de reactivos Access® Free T4 (Beckman Coulter, Inc.). Las muestras analizadas sin anticuerpo biotinilado específico de T4 libre (“sin AC”) evaluarían la unión no específica del conjugado de T3 a la superficie de la micropartícula. Los resultados se muestran en la Tabla 7 para las micropartículas de la invención que tienen BSA biotinilada recubierta con SA, en comparación con la señal generada en un ensayo de micropartículas comerciales (Access® Free T4) empleando ovoalbúmina y un anticuerpo biotinilado y las micropartículas de estreptavidina Dynal® DYNABEADS M-280 Streptavidin de Invitrogen Corporation (micropartículas de 2,8 micras).

**TABLA 7**  
**UNIÓN NO ESPECÍFICA REDUCIDA O MINIMIZADA DE UN CONJUGADO DE FOSFATASA ALCALINA T3 A UNA SUPERFICIE DE BIOTINA-BSA-SA BLOQUEADA CON Pluronic® F108**

PARÁMETRO	PAQUETE COMERCIAL	MICROPARTÍCULAS DE LA INVENCION			
		4 °C		37 °C	
		AC	SIN AC	AC	SIN AC
S0	1.480.850	1.516.620	7704	1.566.340	8477
	1.575.600	1.524.310	7761	1.611.180	8353
	1.551.460	1.488.090	7601	1.567.280	8132
	1.546.320	1.495.310	7741	1.634.690	8184
Media	1.538.558	1.506.083	7702	1.594.873	8287

% diferencia media con Ac = 105,9%, sin Ac = 107,6% Instrumento Access®; paquete de reactivos Access® Free T4

Los resultados indican que la unión no específica de conjugados no ocurrió, puesto que la señal de ensayo de S0 fue < 8500 RLU tanto en las muestras insaturadas a 4 °C como a 37 °C cuando el anticuerpo biotinilado específico de T4 se eliminó de los paquetes de reactivos (sin Ac). La señal de ensayo solo debía generarse si ocurre unión no específica o si el anticuerpo biotinilado específico de T4 libre está presente en el ensayo, puesto que la superficie de SA capturará el anticuerpo biotinilado específico de T4 libre y este anticuerpo específico de T4 libre sí se unía al conjugado de T3 (esto es, S0 > 1,5 x 106 RLU). Las micropartículas comerciales emplearon micropartículas de SA con ovoalbúmina (no BSA), para reducir la unión no específica. Aunque las micropartículas insaturadas emplearon BSA biotinilada de baja proporción de carga, tuvieron un rendimiento mejor. En general, los resultados indican que incluso a temperatura elevada durante un periodo prolongado (37 °C durante 3 días), no se observó unión no específica, lo que sugiere que Pluronic® F108 no se sustituye en las micropartículas insaturadas en estas condiciones. Por consiguiente, una superficie recubierta con biotina-BSA y recubierta con SA bloqueada con Pluronic® F108 da lugar a una reducción o minimización de la unión no específica de un conjugado de fosfatasa alcalina de T3, incluso con el tiempo a una temperatura elevada.

Ejemplo 6

Reproducibilidad del proceso de recubrimiento

Se llevó a cabo la validación del proceso para el recubrimiento con SA para micropartículas insaturadas y orientadas según la invención. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la Fig. 12 y la Fig. 13. Las micropartículas para el proceso de validación se prepararon según la invención. En resumen, PMP tosilactivadas Dynal® AKT-100 (Invitrogen Corporation) se recubrieron con BSA biotinilada de baja proporción de carga, las micropartículas de

biotina-BSA se bloquearon con Pluronic® F108, las micropartículas de biotina-BSA bloqueadas se dispersaron en Pluronic® F108, y las micropartículas de biotina-BSA se recubrieron con SA.

Se realizaron ensayos con varias combinaciones de recubrimientos de SA independientemente preparados (“proceso”), lotes de micropartículas (“lote de PMP tosilactivadas”), lotes de BSA biotinilada de baja proporción de carga (“lote de BSA biotinilada de baja proporción de carga”), lotes de Pluronic® F108 (“lote de copolímero en bloque Pluronic® F108”) y lotes de SA (“lote de SA”). En la Tabla 8, el término “proceso” se refiere al recubrimiento de micropartículas con BSA biotinilada de baja proporción de carga, bloqueo de las micropartículas con Pluronic® F108, dispersión de las micropartículas en Pluronic® F108 y deposición de SA sobre las micropartículas de biotina-BSA; “operador” indica que los recubrimientos con SA, o “proceso”, los realizaron uno de cuatro operadores humanos diferentes.

<b>LOTE DE VALIDACIÓN</b>	<b>OPERADOR</b>	<b>ESCALA (MG)</b>	<b>LOTE DE PMP<sup>1</sup> TOSILACTIVADA LOTE</b>	<b>LOTE DE BSA BIOTINILADA DE BAJA PROPORCIÓN DE CARGA LOTE BSA</b>	<b>Pluronic® F108 LOTE</b>	<b>SA-LOTE</b>
1 <sup>2</sup>	1	10.000	1	1	1	1
2 <sup>3</sup>	1	50	1	1	1	1
3 <sup>3</sup>	1	50	1	1	1	1
4 <sup>3</sup>	1	250	1	1	1	1
5 <sup>2</sup>	2	10.000	1	1	1	1
6 <sup>4</sup>	1	2500	1	1	2	1
7 <sup>4</sup>	1	2500	1&2 (conjunto)	1&2 (conjunto)	2	1&2 (conjunto)
8/Piloto 1 <sup>5</sup>	3	40.000	2	2	1	3
9/Piloto 2 <sup>5</sup>	3	40.000	3	3	1&2 (conjunto)	3
10 <sup>3</sup>	1	50	1	1	1	1
11 <sup>4</sup>	4	250	1	2	1	3
12 <sup>4</sup>	4	250	1	3	1&2 (conjunto)	3

Superíndice 1: PMP significa “micropartícula paramagnética”  
 Superíndice 2 significa una síntesis semiautomática de micropartículas  
 Superíndice 3 significa síntesis manual de micropartículas  
 Superíndice 4 significa una segunda síntesis semiautomática de micropartículas  
 Superíndice 5 significa una tercera síntesis semiautomática de micropartículas  
 Las micropartículas se prepararon según las etapas de la Fig. 1A y 1B de forma manual o semiautomática.

Los resultados de otros estudios de validación empleando un ensayo de T4 libre (ver Fig. 12) para 11 lotes de validación utilizando cinco controles comerciales separados (“Bio-Rad Liquid 1,” “Bio-Rad Liquid 2,” “Bio-Rad 1,” “Bio-Rad 2” y “Bio-Rad 3”; Bio-Rad Laboratories, Inc.) y dos sueros agrupados de pacientes (“conjunto de pacientes 1” y “conjunto de pacientes 2”) y tres muestras individuales (“muestra 1,” “muestra 2” y “muestra 3”) revelaron una buena concordancia, con un CV inferior o igual a 5%. Por lo contrario, las micropartículas preparadas de forma convencional (por ejemplo micropartículas de SA DYNABEADS M-280) tienen un CV de al menos aproximadamente el 10%.

Otros estudios de validación (ver Fig. 13) para 10 lotes de validación empleando un marcador de BPH-A, utilizando tres grupos de controles donde el antígeno se añadió al suero (control A, B y C), y tres controles de suero de paciente (Paciente QC 1, 2 y 3) dieron lugar a resultados similares.

Los resultados de la validación del proceso de recubrimiento con SA revelan que todos los lotes cumplían todas las especificaciones de validación. Asimismo, los resultados indican que el proceso de preparación de micropartículas según la invención está asociado a un grado de varianza bajo, es reproducible y es fiable.

#### Ejemplo 7

Estabilidad mejorada de las micropartículas insaturadas

Las pruebas de estabilidad aceleradas, medidas por la recuperación de T4 en un calibrador o muestra, se llevaron a cabo con varios lotes de validación de micropartículas insaturadas recubiertas con SA que contenían un anticuerpo biotinilado anti-T4 utilizando un calibrador Access® Free T4 en un ensayo Access® Free T4 (Beckman Coulter, Inc.) a 4 °C y a 37 °C durante un periodo de 4 días y a 4 °C y a 37 °C durante un periodo de 127 días. Los resultados se muestran en la Tabla 9 y en la Fig. 14A y 14B.



LOTE VALIDACIÓN	ESCALA (mg)	*PROCESO	RECUPERACIÓN MEDIA CALIBRADOR T4 LIBRE (%)	RECUPERACIÓN MEDIA DOSIS CONTROL T4 LIBRE (%)	RECUPERACIÓN MEDIA DOSIS PACIENTE T4 LIBRE (%)
1	10.000	Semiautomático 2	102,1	100,5	102,9
2	50	Manual	99,1	100,5	100,7
3	50	Manual	104,1	100,5	102,6
4	250	Manual	101,9	100,6	97,3
5	10.000	Semiautomático 2	102,0	100,5	99,3
6	2500	Semiautomático 1	106,2	97,2	99,3
7	2500	Semiautomático 1	113,5	101,1	97,9
8/Piloto 1	40.000	Semiautomático 3	100,9	97,9	100,8
9/Piloto 2	40.000	Semiautomático 3	101,7	100,6	102,0
11	250	Semiautomático 1	103,2	99,2	101,3
12	250	Semiautomático 1	102,6	99,0	100,5

\* Proceso se refiere a micropartículas preparadas manualmente o micropartículas preparadas mediante tres procesos semiautomáticos. Las micropartículas se prepararon según las etapas de la Fig. 1A y 1B de forma manual o semiautomática.

La Tabla 9 muestra las recuperaciones medias de calibrador, dosis de control y dosis de paciente para lotes de validación de micropartículas insaturadas recubiertas con SA incubadas durante 4 días a 37 °C en comparación con 4 días a 4 °C. Como puede verse en la Tabla 9, la recuperación media para todos los lotes fue del 100% o fue cercana a dicho valor.

5

En las Figs. 14A y 14B, la recuperación se expresa como porcentaje de RLU medidas en ensayos para T4L tras 127 días a 37 °C en comparación con las RLU medidas en ensayos para T4L tras 127 días a 4 °C (“recuperación”). Los niveles de calibrador fueron de S0 = 0,0 ng/ml, S1 = 0,54 ng/ml, S2 = 1,01 ng/ml, S3 = 1,98 ng/ml, S4 = 3,00 ng/ml y S5 = 6,11 ng/ml. Aparte del calibrador, se analizaron otras muestras que incluían Bio-Rad control 1 = 0,64 ng/ml, Bio-Rad control 2 = 2,18 ng/ml y Bio-Rad control 3 = 4,19 ng/ml (“Bio-Rad lypho”) y cinco muestras separadas de pacientes (“paciente #”) con dosis paciente 1 = 1,02 ng/ml, paciente 2 = 1,12 ng/ml, paciente 3 = 1,83 ng/ml, paciente 4 = 2,74 ng/ml y paciente 5 = 3,80 ng/ml. En general, la recuperación estuvo fue del 100% o fue cercana a dicho valor, lo que indica que el tratamiento durante un periodo de tiempo prolongado a temperatura elevada no afecta de forma adversa el rendimiento de las micropartículas insaturadas. Para poder comparar, se incluyen en las Figs. 14A y 14B (“especificaciones de ensayo de T4L actuales”) las especificaciones de un ensayo de T4 libre empleando micropartículas recubiertas con SA comerciales (ensayo Access® Free T4; Beckman Coulter, Inc.). Las micropartículas insaturadas entran dentro de las especificaciones del ensayo de T4 libre comercial.

En general, las pruebas de estabilidad aceleradas confirmaron que los lotes de micropartículas recubiertas con SA producidos de forma independiente son muy estables. No se observaron diferencias significativas entre lotes de validación incubados durante 3 días a 4 °C o 3 días a 37 °C. La señal de calibrador fue muy similar (recuperación de calibrador de 99,1% a 113,5%), y todas las recuperaciones medias de dosis de control y de paciente estuvieron entre el 97,2% y el 102,9%.

No se observaron diferencias significativas en el rendimiento cuando se incubó un único lote durante 127 días a 4 °C o 37 °C. La señal de calibrador fue muy similar (recuperación de calibrador de 95,1% a 109,6%), las relaciones de curva fueron muy similares (% de recuperación de 91,3% a 105,1%), y todas las recuperaciones medias de dosis de control y de paciente estuvieron entre 93,7% y 107,6%.

### Ejemplo 8

30

Análisis de desprendimiento de las micropartículas insaturadas

Se llevó a cabo un estudio del desprendimiento de las micropartículas insaturadas preparadas según la invención. Hay aproximadamente 8,7-14,0 µg de biotina-BSA / mg de PMP y 5,6-7,8 µg de SA/mg de PMP en las micropartículas preparadas según la invención que emplean biotina-BSA y están recubiertas con SA (ver Ejemplo 11). Si se desprendiera un 1% de la proteína de 10 mg totales de PMP, habría aproximadamente 0,7-1,0 µg de proteína en solución. Se realizó un análisis del desprendimiento para este tipo de micropartículas recubiertas con SA. Los resultados de la cromatografía de exclusión de tamaño en un HPLC (SEC-HPLC) indican que no hay SA o BSA detectable a 210 nm, o menos de un 1% de desprendimiento. Si SA y/o biotina-BSA están libres en la solución, se encuentran por debajo del límite de detección del método SEC-HPLC (ver Figs. 15A y 15B). En la Fig. 15B, los picos estándar de SEC de gammaglobulina y ovoalbúmina (alturas de pico ~ 1.400 mUA) representan 83,5 µg de proteína total a 210 nm. Una altura de pico de 5 mUA (mili-unidades de absorción) representarían 0,3 µg de proteína. El análisis de HPLC de exclusión de tamaño a 210 nm indicó que no existen moléculas detectables de biotina-BSA o SA en solución tras poner las micropartículas bajo estrés durante 3 días a 37 °C (*por ejemplo*, sin desprendimiento de proteína de la superficie de la micropartícula). Por consiguiente, el desprendimiento no presenta ningún

40

problema para las micropartículas preparadas según la invención. Los datos de estabilidad presentados arriba respaldan los resultados del análisis SEC-HPLC de desprendimiento de SA, puesto que la señal de ensayo, y presumiblemente la unión a IgG biotinilada, no se vio afectada por el estrés sufrido por las micropartículas hasta 127 días a 37 °C (Figs. 14A-B).

#### 5 Ejemplo 9

Biotinilación de baja proporción de carga de ovoalbúmina

10 Las micropartículas según la invención se prepararon con ovoalbúmina acoplada a biotina en lugar de BSA acoplada a biotina. La ovoalbúmina se biotiniló con sulfo-NHS-LC-biotina (sulfosuccinimidil-6-[biotinamido]hexanoato, Pierce Biotechnology Inc./ Thermo Scientific) a varias proporciones de carga molar de biotina respecto a ovoalbúmina (ver Tabla 10), como se describe para BSA en el Ejemplo 1. En resumen, se prepararon cuatro lotes de biotinilación separados para biotinar ovoalbúmina (20 mg en 1,253 ml) en tampón borato, pH 8,2 y DMF con sulfo-NHS-LC-biotina a varias proporciones de carga, como se muestra en la Tabla 10.

15

LOTE	PROPORCIÓN CARGA	OVOALBÚMINA				BIOTINA		
		(MG/ML)	(MG)	(ML)	(NMOL)	(NMOL)	(MG)	( $\mu$ L)
1	2	15,96	20	1,253	444	889	0,495	16,5
2	4	15,96	20	1,253	444	1778	0,989	33,0
3	6	15,96	20	1,253	444	2667	1,484	49,5
4	8	15,96	20	1,253	444	3556	1,979	66,0

El rendimiento en porcentaje de la biotinilación fue de 75,6% para una proporción de carga de 2; 83,3% para una proporción de carga de 4; 85,1% para una proporción de carga de 6; y 79,1% para una proporción de carga de 8. Se realizó un análisis con HABA (ácido 4'- hidroxiazobencen-2-carboxílico) para cada proporción de carga. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

20

LOTE	PROPORCIÓN CARGA	*MEDIA OD <sub>500</sub>	DE	% CV,	OD CORREGIDA	$\mu$ M BIOTINA	$\mu$ M PROTEÍNA	PROPORCIÓN BIOT-PROT	% ESTABILIDAD
1	2	0,8992	0,012	1,3	0,2768	163	141,0	1,2	97,3
2	4	0,6352	0,003	0,4	0,5407	318	141,9	2,2	95,3
3	6	0,5568	0,036	6,5	0,6191	364	118,2	3,1	86,5
3	6	0,8500	0,007	0,8	0,3260	384	118,2	3,2	
4	8	0,4457	0,006	1,4	0,7302	430	109,9	3,9	81,8
4	8	0,7417	0,006	0,9	0,4343	511	109,9	4,7	

25 Se realizaron análisis de estabilidad de 4 lotes independientes de biotinilación de ovoalbúmina biotinilada recubriendo PMP tosilyladas al 25 mg/ml (DynaI® DYNABEADS MyOne Tosylactivated, 1,0 micras de diámetro, Invitrogen Corporation) con ovoalbúmina-biotina durante 18-24 horas a 37 °C en tampón borato 0,1 M de pH 9,5 (0,050 mg de ovoalbúmina-biotina por mg de PMP), lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4, bloqueando la superficie de micropartículas recubierta con ovoalbúmina-biotina con Pluronic® F108 0,4% (p/v) en TBS de pH 7,4 durante 4 horas a 37 °C, lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4, dispersando las micropartículas de ovoalbúmina-biotina en Pluronic® F108 0,4% (p/v) en TBS de pH 7,4, recubriendo las micropartículas de ovoalbúmina-biotina con SA en TBS de pH 7,4 durante 30 minutos a temperatura ambiente (0,035 mg de SA por mg de PMP de ovoalbúmina-biotina), lavando las micropartículas tres veces con TBS de pH 7,4 con azida sódica (0,1% p/v), lavando las micropartículas tres veces con un tampón de micropartículas específico para el ensayo Access® Free T4, diluyendo las micropartículas desde 25 mg/ml hasta 0,35 mg/ml con un tampón de micropartículas específico para el ensayo Access® Free T4, incubando las micropartículas recubiertas con ovoalbúmina-biotina-SA a 4 °C o 37 °C durante 3 días, y analizando la capacidad de las micropartículas de ovoalbúmina-biotina-SA de unirse al anticuerpo biotinilado anti-T4 libre en el ensayo Access® Free T4 (Beckman Coulter, Inc.). La estabilidad se determinó calculando la media de las recuperaciones RLU de calibrador individuales de T4 libre. El ensayo Access® Free T4 utiliza seis calibradores diferentes (S0, S1, S2, S3, S4 y S5) con niveles de antígeno de 0 ng/ml a 6 ng/ml (ver Tabla 4). La recuperación se calculó dividiendo la respuesta en RLU del calibrador a 37 °C por la respuesta en RLU del calibrador a 4 °C y multiplicando el resultado por 100%. La estabilidad se calculó haciendo la media de la recuperación en los seis calibradores. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

35 La estabilidad es un indicador del cambio en la capacidad de unión de SA tras incubar la fase sólida a 4 °C o 37 °C durante 3 días. Una disminución de la estabilidad es debida al desprendimiento o disociación de biotina o reactivo de biotina unido de forma pasiva de los conjugados de ovoalbúmina-biotina, y la posterior captura con el tiempo de la biotina o reactivo de biotina libre por parte de la SA.

La Tabla 11 establece que proteínas distintas a la BSA, tal como ovoalbúmina, pueden prepararse de forma eficaz utilizando la biotilación de baja proporción de carga como se describe en este documento. Los resultados de las pruebas de estabilidad de ovoalbúmina-biotina son muy similares a los resultados de estabilidad de biotina-BSA presentados previamente (ver Tabla 1). Los resultados indican que la ovoalbúmina-biotina preparada a proporciones de carga elevadas (esto es, 8:1) presenta una estabilidad reducida. Cuando se bajó la proporción de carga molar del agente de biotina respecto a ovoalbúmina de 8:1 a 2:1, la estabilidad mejoró de 82% a 97% (ver Tabla 11).

Ejemplo 10

10 Densidad de biotina, SA e inmunoglobulinas en la superficie de micropartículas para ensayos de afinidad

Las PMP según la invención se prepararon utilizando BSA como acoplador a soporte y biotina como ligando. SA se utilizó para unir una IgG biotilada como grupo de captura.

15 En resumen, se prepararon PMP Dynal® (Invitrogen Corporation) según el procedimiento del Ejemplo 1 (es decir, se recubrieron las PMP con biotina-BSA de baja proporción de carga preparada según el protocolo del Ejemplo 1. Las micropartículas se prepararon según la invención y se recubrieron con biotina-BSA de baja proporción de carga y entonces con SA según la invención. A partir de ahí, las PMP recubiertas con SA se trataron con IgG biotiladas. Se utilizaron las siguientes IgG: IgG M06 biotilada, la cual es el anticuerpo monoclonal Mc x Access® AccuTnl utilizado como anticuerpo detector (es decir, conjugado con fosfatasa alcalina) en el ensayo Access® AccuTnl (Beckman Coulter, Inc.), e IgG 399.4 biotilada, la cual es el anticuerpo monoclonal Mc x FPSA utilizado como anticuerpo de captura (es decir, está depositado sobre una PMP de antibiotina de cabra) en el ensayo Access® Free PSA Assay (Beckman Coulter, Inc.). Varios lotes de PMP con SA preparados según la invención se recubrieron con IgG M06 IgG o IgG 399.4 para evaluar la capacidad de unión de IgG biotiladas de los lotes de PMP con SA utilizando el método de IgG biotiladas marcadas con I<sup>125</sup> como se ha descrito previamente. En la Tabla 12 se presenta una descripción de las micropartículas y los resultados en cuanto a densidad superficial de los componentes de la superficie.

LOTE	DIÁMETRO PMP <sup>§</sup> (µM)	ÁREA SUPERFICIAL (m <sup>2</sup> /G)	DENSIDAD RECUBRIMIENTO (µG BIOTINA-BSA/MG PMP)	DENSIDAD SA (µG SA/MG PMP)	DENSIDAD IGG (µG BIOTINA-M06 IGG/MG PMP)	DENSIDAD IGG (µG BIOTINA-IGG 399,4/MG PMP)
A	1,10	7,7	8,7	7,8	3,8-4,5	6,1
B	1,05	8,4	nd*	nd	nd	nd
C	1,07	7,4	14,0	nd	4,5	3,4

<sup>§</sup> diámetro PMP es un valor estimado; las poblaciones de PMP son hasta cierto punto polidispersas en términos de diámetro.  
\* nd = no determinado

30 Los datos de la Tabla 12 pueden convertirse en valores molares, cuya conversión revela que hay aproximadamente 2,46 x 10<sup>4</sup> (µmol biotina)/(mg PMP) en el ejemplo que se muestra (ver A). Para una micropartícula de aproximadamente una micra de diámetro, con área superficial de 7,7 x 10<sup>-3</sup> m<sup>2</sup>/(mg de PMP), hay aproximadamente 3,19 x 10<sup>-2</sup> (µmol biotina)/(m<sup>2</sup> PMP).

Además de los lotes descritos arriba, las PMP biotiladas se prepararon según la invención y se vio que tenían una densidad de 15,1 (µg biotina-BSA)/(mg PMP), para una PMP de 1,10 micra que tiene una área superficial de 7,7 m<sup>2</sup>/g.

35 Además de los lotes descritos arriba, se prepararon tres lotes más de la misma forma. Estos otros lotes se describen en la Tabla 13.

LOTE	<sup>§</sup> DIÁMETRO PMP (µm)	ÁREA SUPERFICIAL (M <sup>2</sup> /G)	DENSIDAD SA (µG SA/MG PMP)	RELACION MOLAR DE BIOTINA RESPECTO A BSA MEDIANTE ANÁLISIS HABA (MOLES BIOTINA/MOLES BSA)
D	1,10	7,7	6,1	1,85
E	1,05	8,4	6,6	1,96
F	1,07	7,4	5,6	1,75

<sup>§</sup> Diámetro PMP es un valor estimado; las poblaciones de PMP son hasta cierto punto polidispersas en cuanto a diámetro.

40 Si se consideran los datos de la Tabla 13 en términos molares, dado que hay aproximadamente 6,1 (µg SA)/(mg PMP), y utilizando un peso molecular de 56 kDa para SA, hay aproximadamente 1,41 x 2 (µmol SA)/(m<sup>2</sup> PMP). Por lo tanto, en comparación con los datos de la Tabla 12, parece que hay aproximadamente la mitad de SA sobre la micropartícula que de biotina.

Ejemplo 11

Se llevaron a cabo cálculos de densidad superficial para BSA, SA e IgG para lotes preparados en los Ejemplos descritos arriba. Los lotes de biotilación de baja proporción de carga de la Tabla I que indicaron buena estabilidad (13 lotes) se utilizaron para generar densidad superficial para micropartículas. Los cálculos de densidad superficial reales para micropartículas y soportes que no son micropartículas (basados en datos de micropartículas) se muestran en las Figs. 16A y 16B y a continuación en la Tabla 14. Los cálculos de densidad superficial para micropartículas, suponiendo una superficie lisa, y para soportes que no son micropartículas (basados en datos de micropartículas “lisas”) se muestran en las Figs. 16A, 16C, 16D y en la Tabla 15 de abajo.

Los cálculos de densidad superficial se basaron en parámetros de pruebas físicas. En resumen, la cantidad de BSA y SA depositada en la superficie durante las etapas de recubrimiento se midió mediante análisis del fluido sobrenadante después de las etapas de recubrimiento, utilizando el método BCA de determinación de concentración de proteína (ensayo BCA Protein Assay [ácido bicinonínico]; Pierce Biotechnology Inc./ Thermo Scientific) y/o absorbancia a 280 nm (para BSA y SA). Se utilizó el análisis HABA para cuantificar la cantidad de biotina en BSA. Se utilizó la unión a <sup>125</sup>I para evaluar la capacidad de unión de biotina-IgG. En resumen, se ofreció a micropartículas en TBS una cantidad conocida de BSA, se incubó y las micropartículas se separaron del fluido sobrenadante. Las proteínas que quedaron en el fluido sobrenadante se midieron y se restaron de la cantidad de proteína añadida. Las micropartículas se lavaron y se analizó la proteína de los lavados. Se utilizó solución salina tamponada de Tris de pH 7,4 para el acoplamiento así como para unir el anticuerpo a las micropartículas. Los cálculos se hicieron en base a (a) área superficial medida real proporcionada por el fabricante de micropartículas y (b) área superficial calculada en base al diámetro de micropartícula y una hipótesis de lisura.

Para las medidas de densidad superficial que se muestran en la Tabla 14, el área superficial de micropartículas (en base a un cálculo utilizando el peso sólido seco) oscilaron desde un mínimo de 7,4 m<sup>2</sup>/g hasta un máximo de 8,4 m<sup>2</sup>/g, con un intermedio de 7,7 m<sup>2</sup>/g.

TABLA 14 DENSIDAD SUPERFICIAL: HIPÓTESIS DE NO LISURA			
RESUMEN	BSA: 8,7 -14,0 µG/MG SA: 5,6 - 7,8 µG/MG HABA: 1,3 - 2,3 MOL BIOTINA: MOL BSA S.A. REALES: 0,0074 - 0,0084 M <sup>2</sup> /MG		BSA: 8,7 µG/MG SA: 6,1 µG/MG HABA: 1,85 MOL BIOTINA: MOL BSA S.A. REALES: 0,0077 m <sup>2</sup> /MG
µmol biotina / mg PMP	1,6E-04	4,9E-04	2,4E-04
µmol biotina / m <sup>2-real</sup>	1,9E-02	6,6E-02	3,2E-02
µmol BSA / mg PMP	1,3E-04	2,1E-04	1,3E-04
µmol BSA / m <sup>2-real</sup>	1,6E-02	2,9E-02	1,7E-02
µmol SA / mg PMP	1,0E-04	1,4E-04	1,1E-04
µmol SA / m <sup>2-real</sup>	1,2E-02	1,9E-02	1,4E-02
µmol biotina-IgG / mg PMP	2,1E-05	4,1E-05	2,1E-05
µmol biotina-IgG / m <sup>2-real</sup>	2,5E-03	5,5E-03	2,8E-03
Pesos moleculares: Biotina: 244 Da; BSA: 66.000 Da; SA: 56.000 Da; IgG: 150.000 Da			

Como puede verse en la Tabla 14, que se basa en medidas de una micropartícula comercial (DynaI® DYNABEADS MyOne Tosylactivated, 1,0 micra de diámetro; Invitrogen Corporation), una vez que los ligandos (por ejemplo, biotina) están insaturados, las capas posteriores de la superficie de unión también estarán insaturadas. En una realización específica, una micropartícula de una micra que tiene una área superficial de aproximadamente 0,0077 m<sup>2</sup>/mg y que está recubierta con la cantidad indicada de BSA biotinada y SA se unió a 2,1 x 10<sup>-5</sup> µmol de biotina-IgG por mg de PMP.

Para las medidas de densidad superficial que se muestran en la Tabla 15, el área superficial de micropartículas (en base a una hipótesis de lisura, un diámetro de micropartícula de 0,90 a 1,10 µm, y una densidad de micropartículas de 1,4 a 1,8 g/cm<sup>3</sup>) oscilaron desde un mínimo de 0,0030 m<sup>2</sup>/mg hasta un máximo de 0,0048 m<sup>2</sup>/mg.

TABLA 15 DENSIDAD SUPERFICIAL: HIPÓTESIS DE LISURA			
RESUMEN	BSA: 8,7 -14,0 µG/MG SA: 5,6 - 7,8 µG/MG HABA: 1,3 - 2,3 MOL BIOTINA: MOL BSA S.A. lisa: 0,0030 - 0,0048 M <sup>2</sup> /MG DENSIDAD MICROPARTÍCULA: 1,4 - 1,8 G/CM <sup>3</sup>		BSA: 8,7 µG/MG SA: 6,1 µG/MG HABA: 1,85 MOL BIOTINA: MOL BSA S.A. LISA: 0,0030 - 0,0048 M <sup>2</sup> /MG DENSIDAD MICROPARTÍCULA: 1,6 G/CM <sup>3</sup>
µmol biotina / mg PMP	1,6E-04	4,9E-04	2,4E-04
µmol biotina / m <sup>2-lisa</sup>	3,3E-02	1,6E-01	5,1E-02      8,0E-02
µmol BSA / mg PMP	1,3E-04	2,1E-04	1,3E-04

$\mu\text{mol BSA}/\text{m}^2_{\text{lsa}}$	2,8E-02	7,0E-02	2,8E-02	4,4E-02
$\mu\text{mol SA}/\text{mg PMP}$	1,0E-04	1,4E-04	1,1E-04	
$\mu\text{mol SA}/\text{m}^2_{\text{lsa}}$	2,1E-02	4,6E-02	2,3E-02	3,6E-02
$\mu\text{mol biotina-IgG}/\text{mg}_{\text{lsa}}$	2,1E-05	4,1E-05	--	
$\mu\text{mol biotina-IgG}/\text{m}^2_{\text{lsa}}$	4,5E-03	1,3 E-02	-	-
Pesos moleculares: Biotina: 244 Da; BSA: 66.000 Da; SA: 56.000 Da; IgG: 150.000 Da				

5 En la Tabla 15 se supone una superficie lisa. De nuevo, como puede verse en la Tabla 15, una vez que los ligandos (*por ejemplo*, biotina) están insaturados, las capas posteriores de la superficie de unión estarán también insaturadas. Sin embargo, debido a que se supone que son lisas, los cálculos de densidad superficial dan lugar a más  $\mu\text{moles}$  de ligandos (biotina) por metro cuadrado, más  $\mu\text{moles}$  de acopladores a soporte (BSA) por metro cuadrado, más  $\mu\text{moles}$  de conectores de ligando (SA) por metro cuadrado y más  $\mu\text{moles}$  de restos de captura (biotina-IgG) por metro cuadrado, en comparación con los cálculos de densidad superficial sin la hipótesis de lisura (ver Tabla 14). El aumento de densidad superficial es debido al hecho de que los  $\mu\text{moles}/\text{mg}$  de biotina, BSA, SA o biotina-IgG es constante, pero el área superficial total de la superficie de micropartículas con la hipótesis de lisura es menor que el área superficial total de la micropartícula sin la corrección de lisura.

10 Por ejemplo, si dos micropartículas tienen formas y diámetros idénticos, pero una micropartícula es porosa y la otra micropartícula es perfectamente lisa, la micropartícula porosa tendrá más área superficial disponible por unidad de masa ( $\text{m}^2/\text{mg}$ ) que la micropartícula lisa. Si ambas micropartículas pueden unirse al ligando, y se ofrece a ambas la misma cantidad de ligando, entonces la micropartícula porosa unirá menos ligando por metro cuadrado que la micropartícula lisa.

## REIVINDICACIONES

1. Una superficie de unión insaturada en forma de micropartículas para un ensayo de afinidad que comprende:
- 5 a) un soporte de micropartículas;
- b) acoplado covalentemente a una superficie del soporte, comprendiendo al menos un acoplador a soporte una proteína,
- 10 en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en albúmina de suero bovino (BSA), ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina o mezclas de los mismos;
- c) un ligando acoplado a la proteína,
- 15 en donde el ligando está presente a una densidad de  $2 \times 10^{-2}$  a  $2 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte,
- además, en donde el ligando es biotina y en donde la biotina está presente en una proporción molar de biotina respecto a proteína inferior o igual a 5:1; y
- 20 d) un copolímero en bloque en contacto con la superficie del soporte de ensayo, en donde la molécula de copolímero en bloque comprende un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por al menos dos grupos de cola hidrófilos, y en donde el grupo de cabeza hidrófobo está en contacto con el soporte en forma de micropartículas.
- 25 2. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 1 en donde el ligando está presente a una densidad de
- (a)  $1,9 \times 10^{-2}$  a  $1,6 \times 10^{-1}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte,
- 30 (b)  $1,9 \times 10^{-2}$  a  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte, o
- (c)  $1,6 \times 10^{-2}$  a  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de ligando por metro cuadrado de soporte.
- 35 3. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 1 en donde, en el copolímero en bloque, la longitud de las dos o más colas hidrófilas puede ser cada una independientemente de 2 a 2,5 veces la longitud del grupo de cabeza hidrófobo.
- 40 4. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 1 en donde el soporte de ensayo en forma de micropartículas comprende un polímero o copolímero orgánico que es hidrófobo.
5. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 1 en donde el soporte en forma de micropartículas comprende un material paramagnético o superparamagnético.
- 45 6. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 1 en donde la proteína es BSA y el ligando es biotina, en donde además
- la biotina está presente a una densidad de  $1,9 \times 10^{-2}$  a  $6,6 \times 10^{-2}$  micromoles de biotina por metro cuadrado de soporte, y
- 50 la BSA está presente a una densidad de  $1,6 \times 10^{-2}$  a  $2,9 \times 10^{-2}$  micromoles de BSA por metro cuadrado de soporte.
7. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 3 que comprende además un conector de ligando que es al menos bivalente que está acoplado con la biotina.
- 55 8. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 7 en donde el conector de ligando se selecciona del grupo que consiste en avidina, estreptavidina (SA), neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina o mezclas de los mismos, preferiblemente en donde el conector de ligando es estreptavidina.
- 60 9. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 7 que comprende además un resto de captura asociado con el conector de ligando.
10. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 9 en donde el resto de captura está biotinilado.
- 65

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
11. La superficie de unión en forma de micropartículas de la reivindicación 3 en donde las moléculas del copolímero en bloque comprenden cada una un polímero en donde el grupo de cabeza hidrófobo es un bloque de óxido de polipropileno y los grupos de cola hidrófilos son cada uno bloques de óxido de polietileno.
  12. Una dispersión en una solución acuosa de una pluralidad de las micropartículas de la reivindicación 3 y un copolímero en bloque que tiene un grupo de cabeza hidrófobo flanqueado por al menos dos grupos de cola hidrófilos.
  13. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 12 en donde el soporte de ensayo en forma de micropartículas comprende un polímero o copolímero orgánico que es hidrófobo.
  14. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 12 en donde el soporte en forma de micropartículas comprende un material paramagnético o superparamagnético.
  15. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 12 en donde la proteína se selecciona del grupo que consiste en BSA, ovoalbúmina, un fragmento de BSA, un fragmento de ovoalbúmina, o mezclas de los mismos.
  16. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 12 que comprende además un conector de ligando que es al menos bivalente que está acoplado con la biotina.
  17. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 16 en donde el conector de ligando se selecciona del grupo que consiste en avidina, SA, neutravidina, un fragmento de SA, un fragmento de avidina, un fragmento de neutravidina, o mezclas de los mismos, preferiblemente en donde el conector de ligando es estreptavidina.
  18. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 12 que comprende además un resto de captura asociado con el conector de ligando.
  19. La dispersión de micropartículas de la reivindicación 18 en donde el resto de captura está biotinilado.

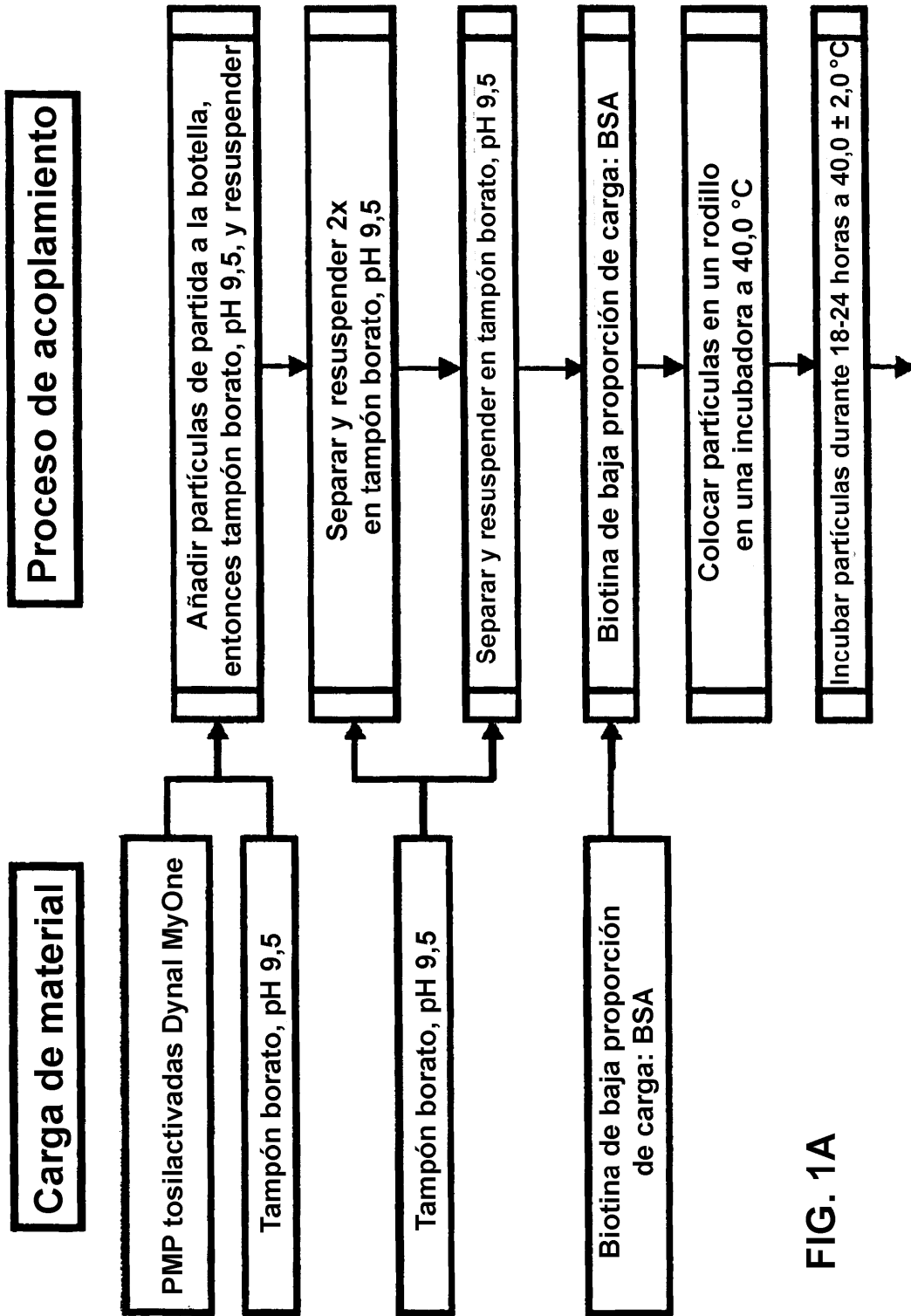


FIG. 1A



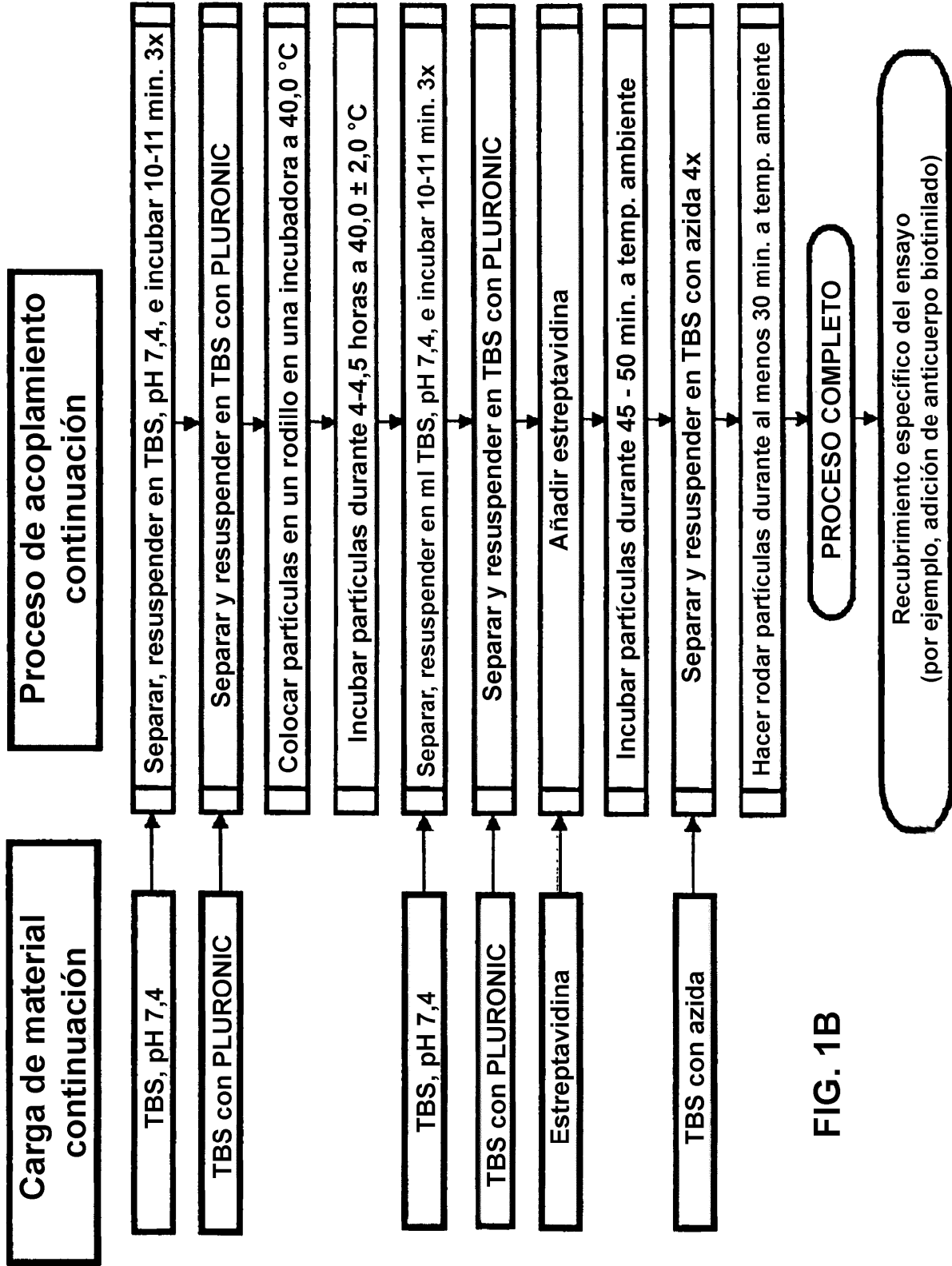


FIG. 1B

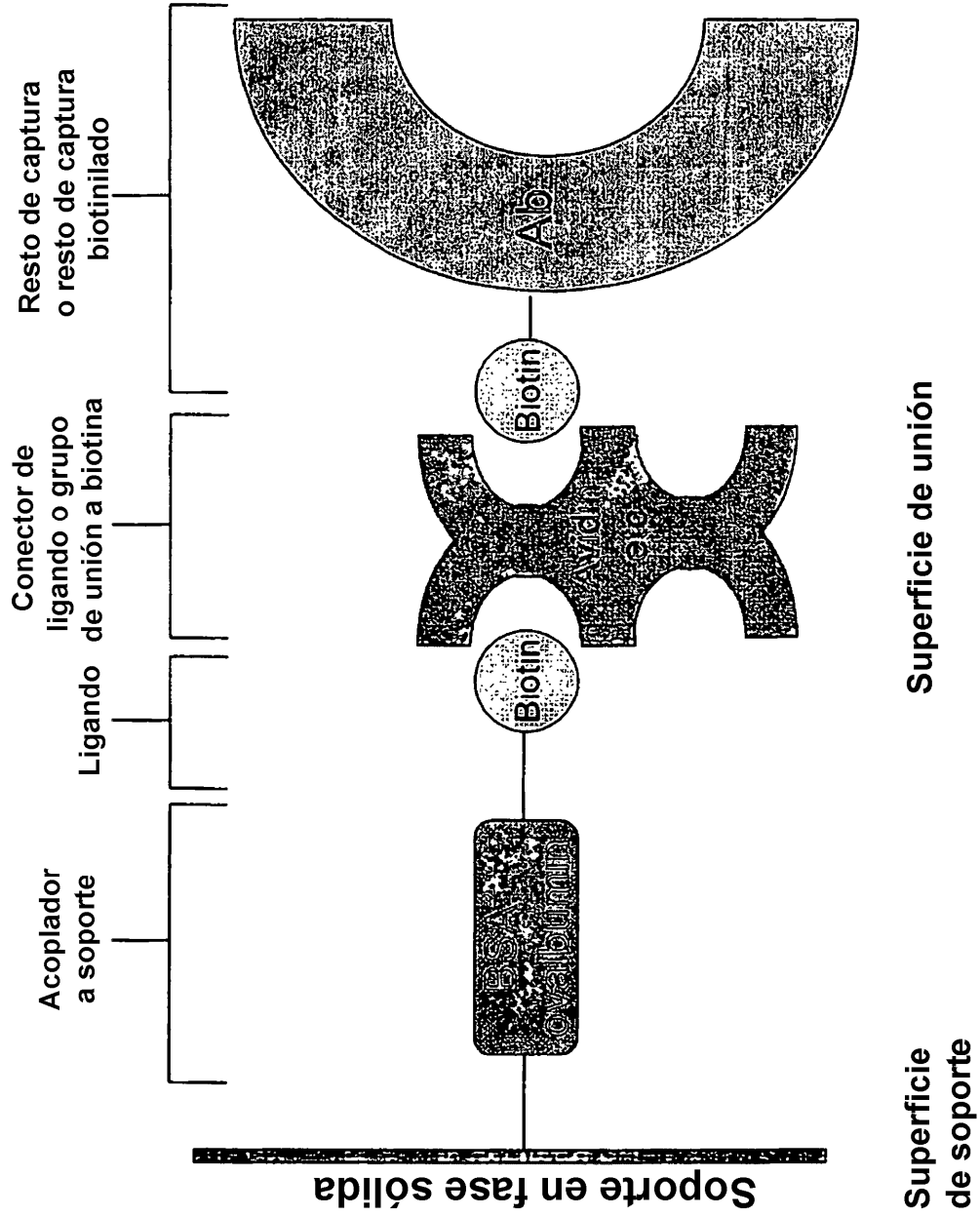


FIG. 2

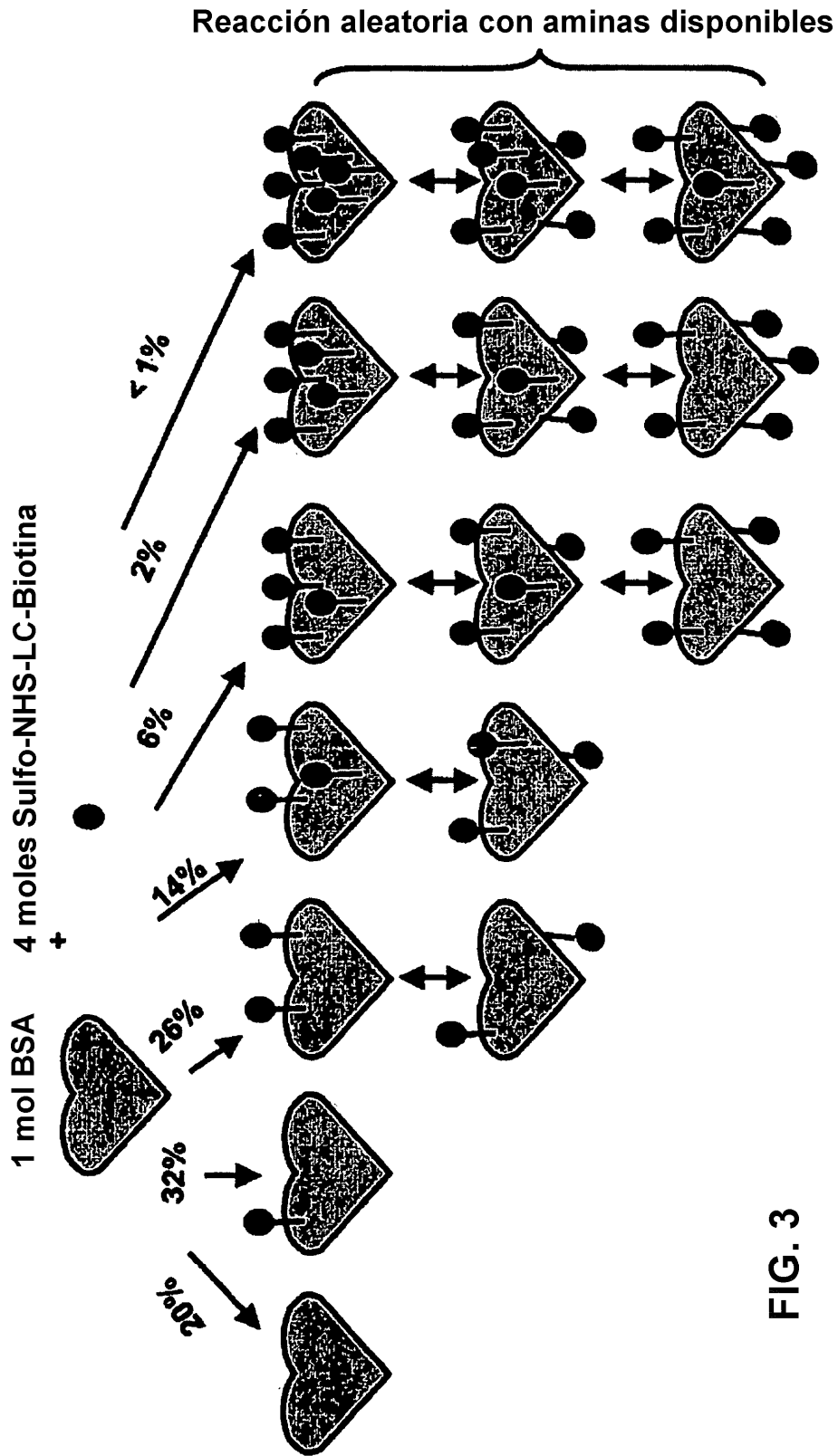


FIG. 3

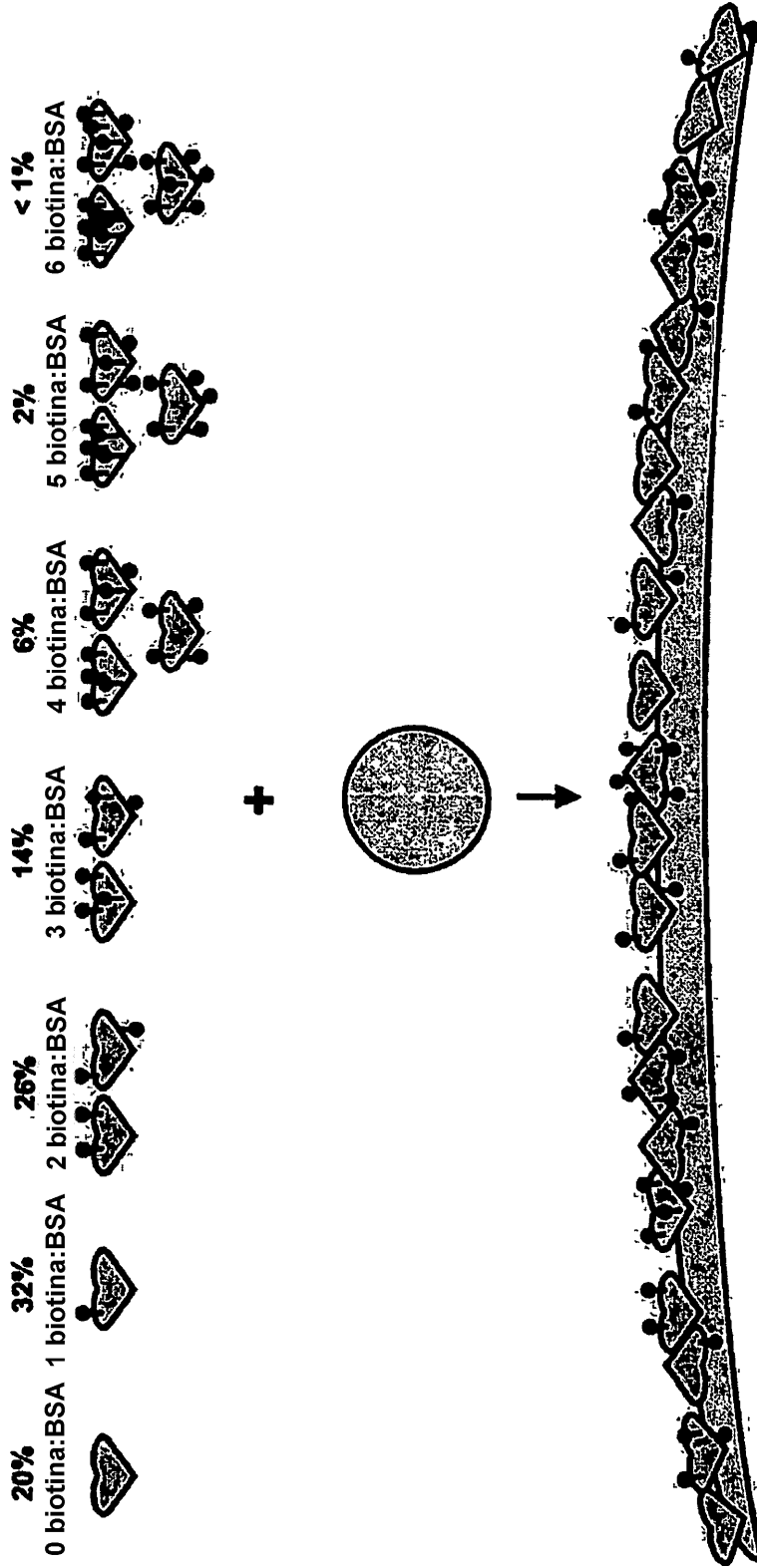


FIG. 4

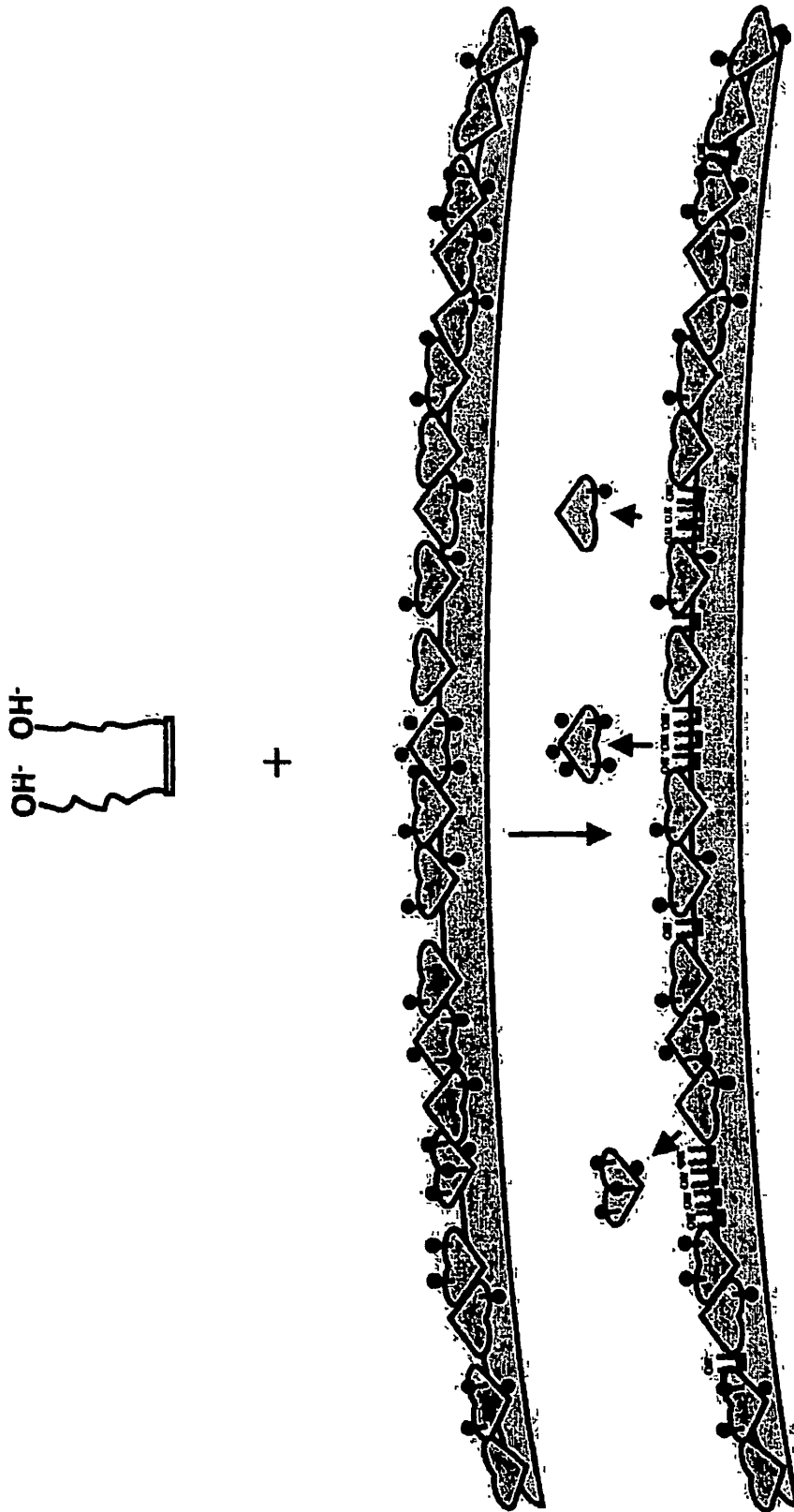


FIG. 5

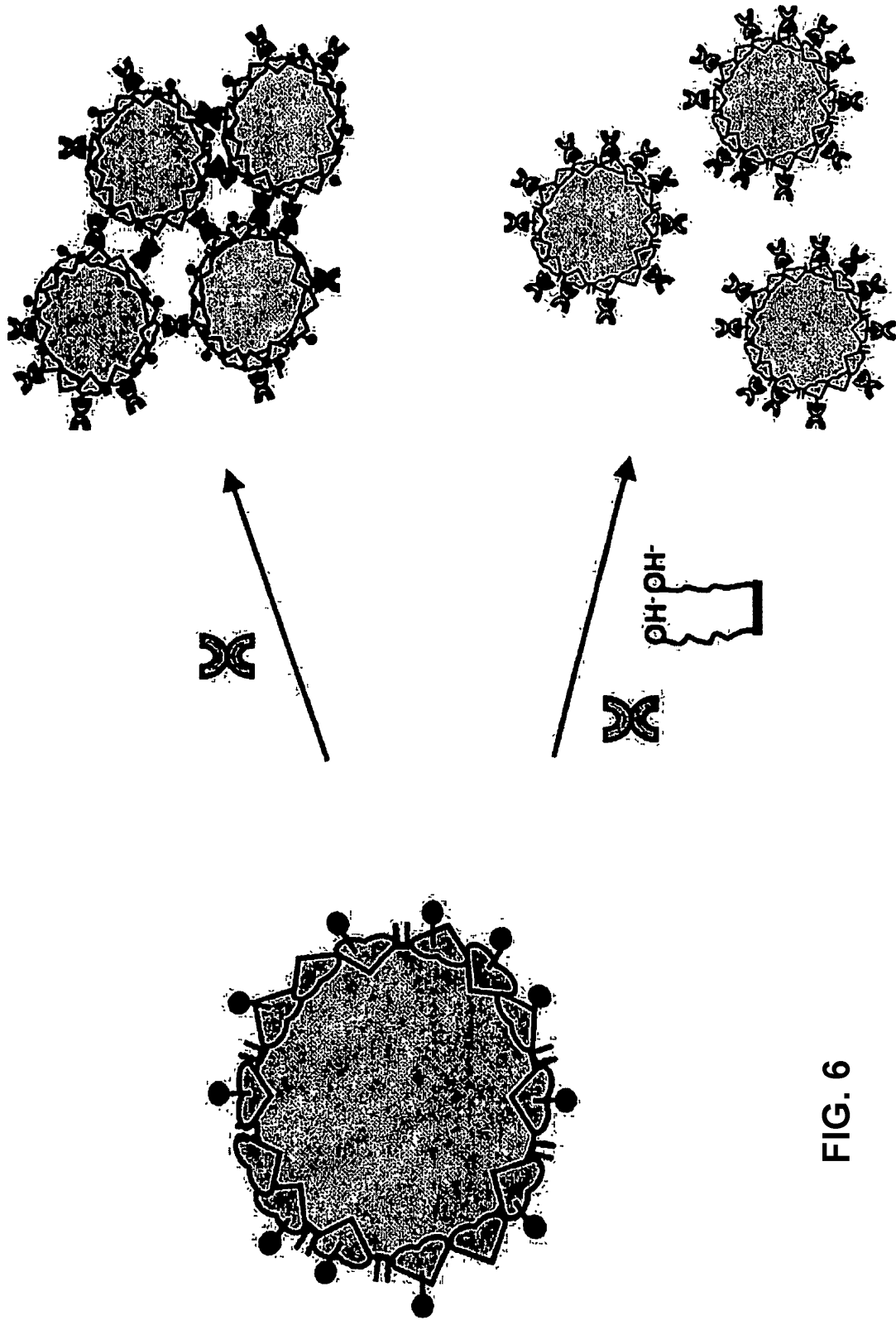


FIG. 6

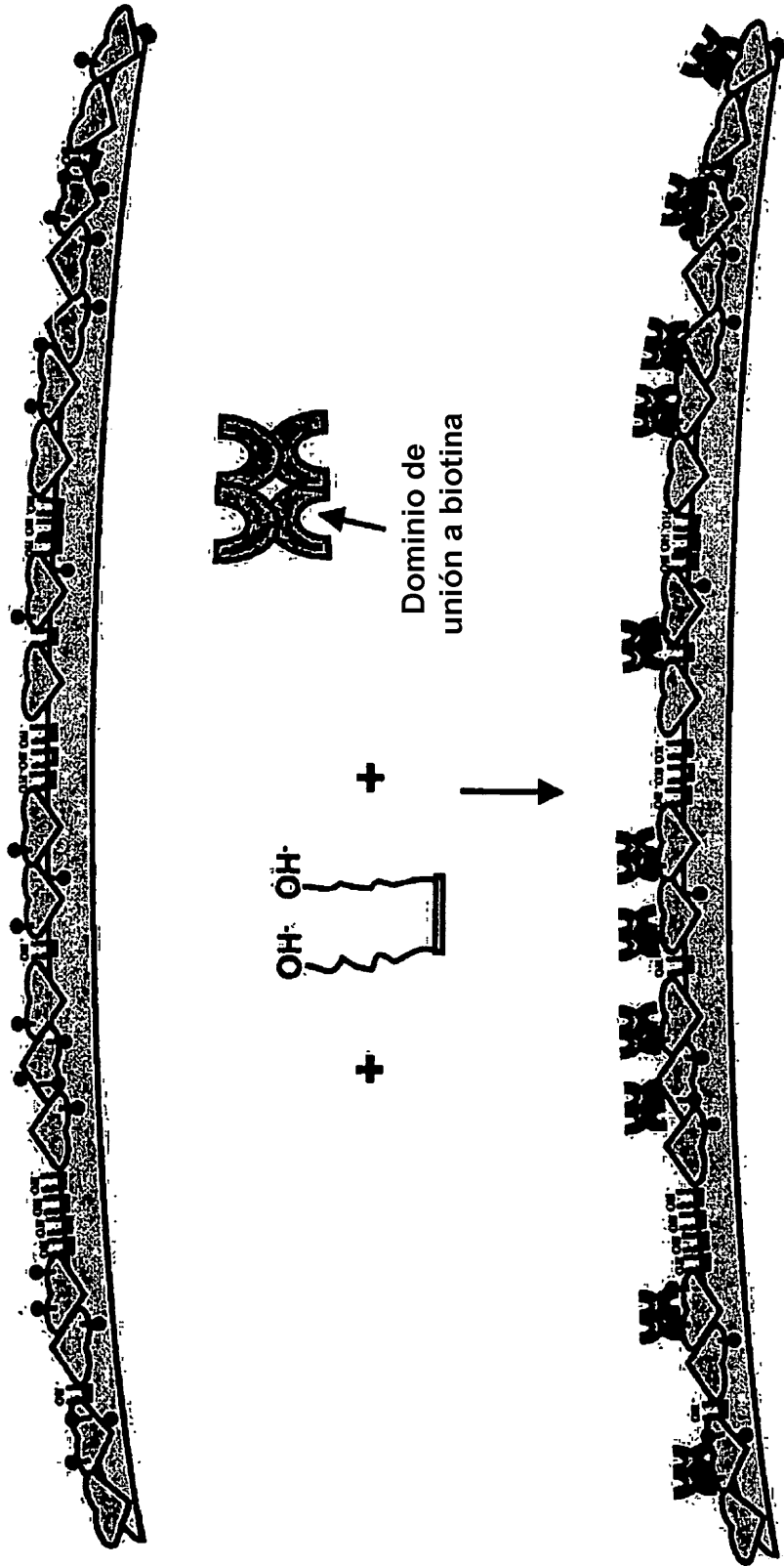


FIG. 7

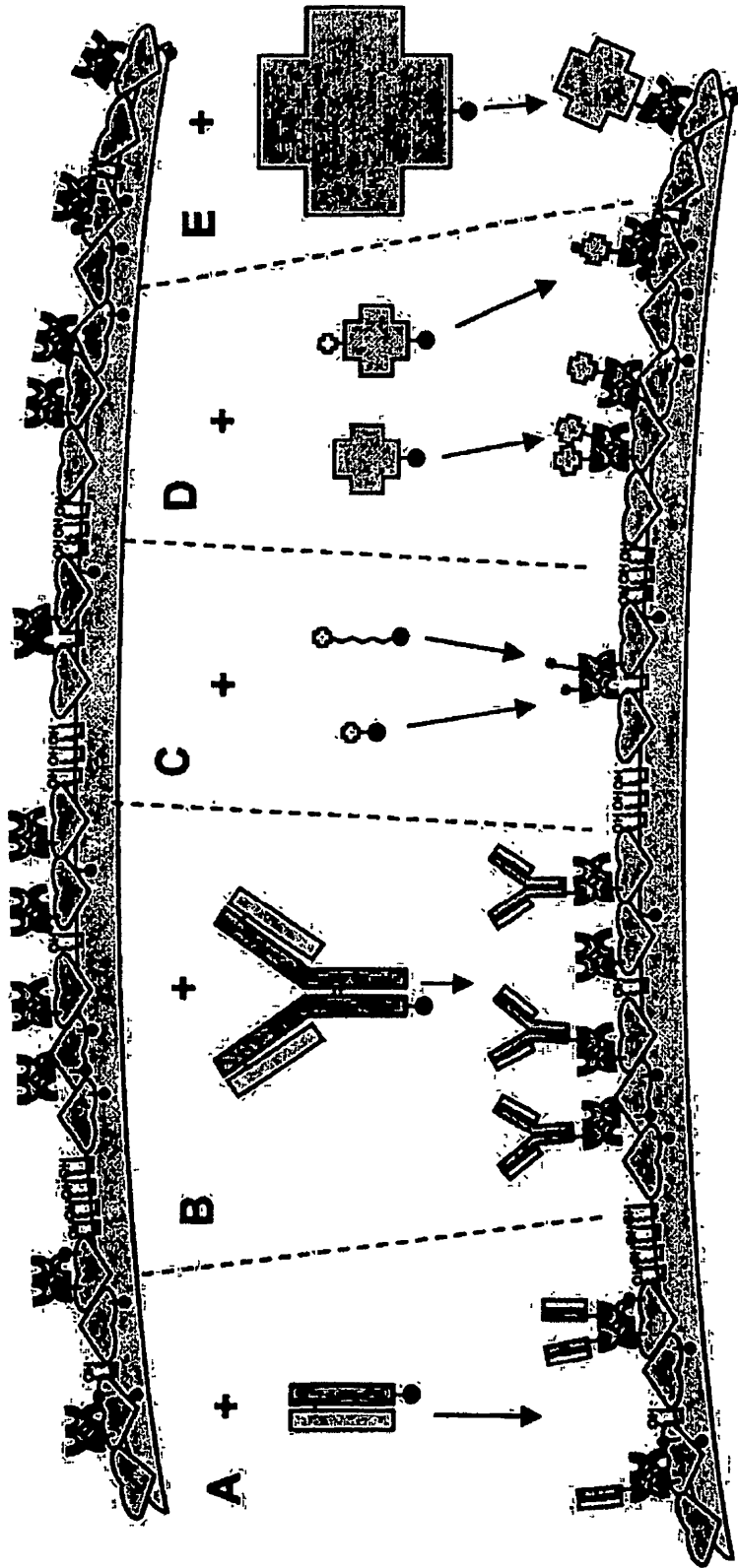


FIG. 8



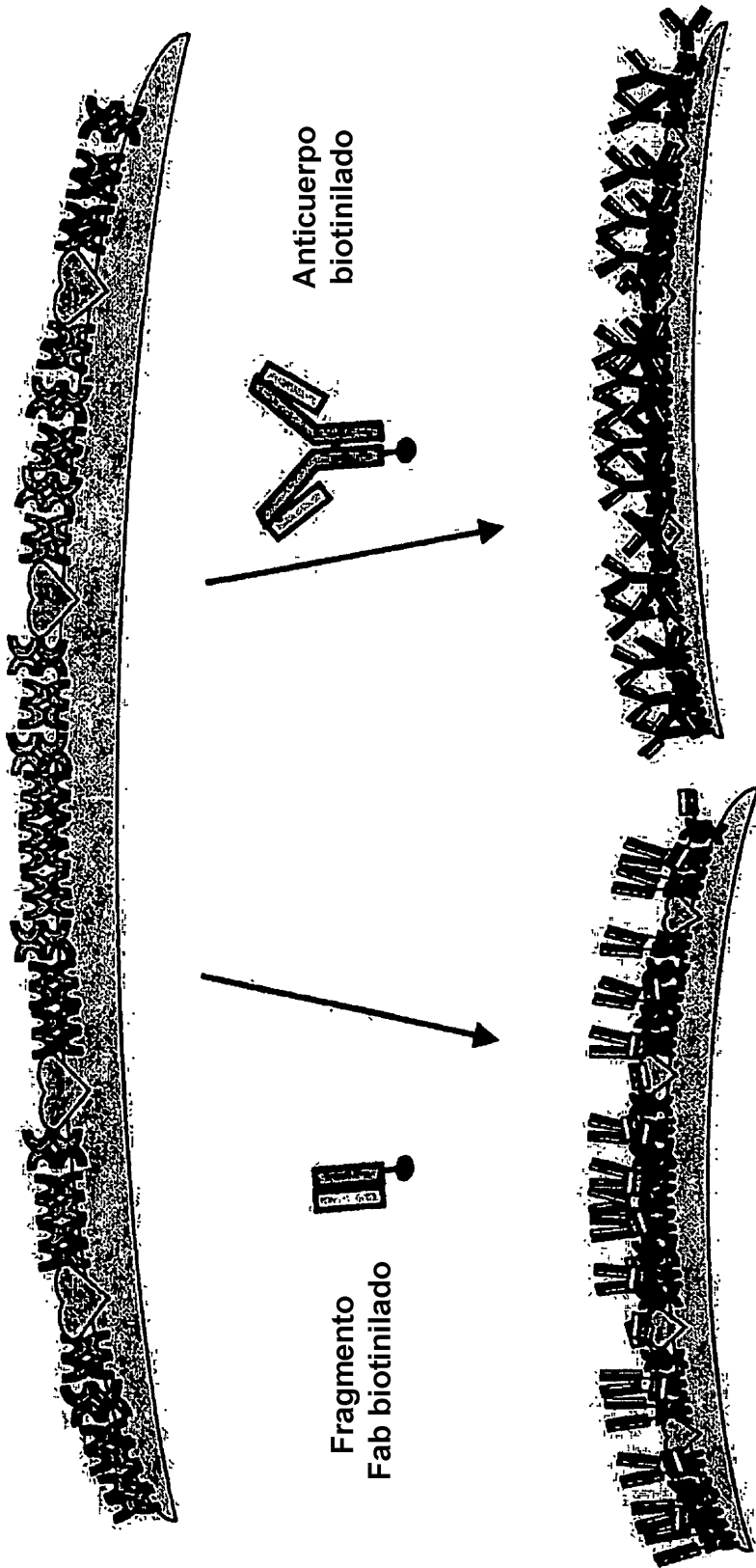


FIG. 9A

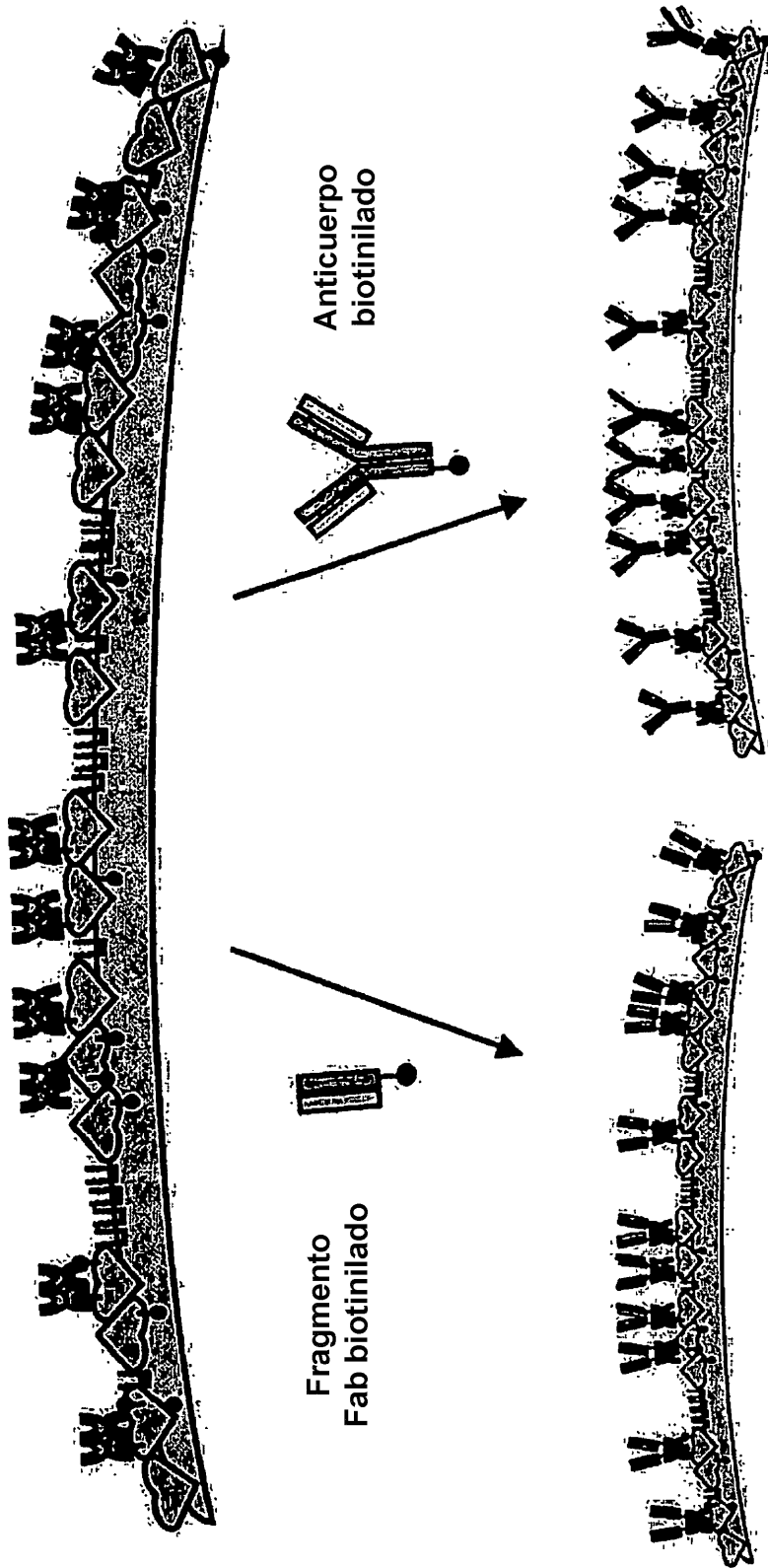


FIG. 9B

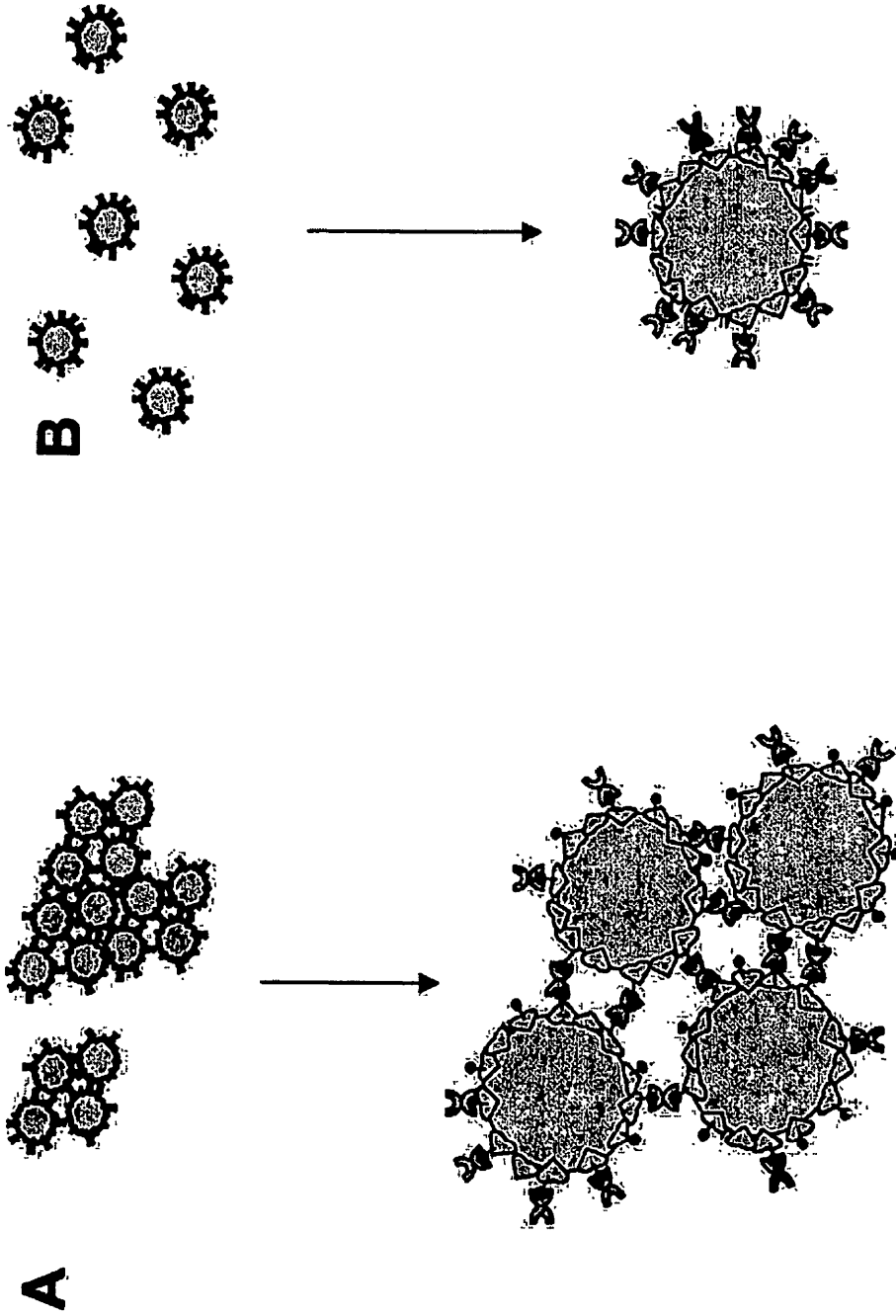


FIG. 10

Análisis desprendimiento biotina SEC-HPLC: 4C vs. 3 días a 37C

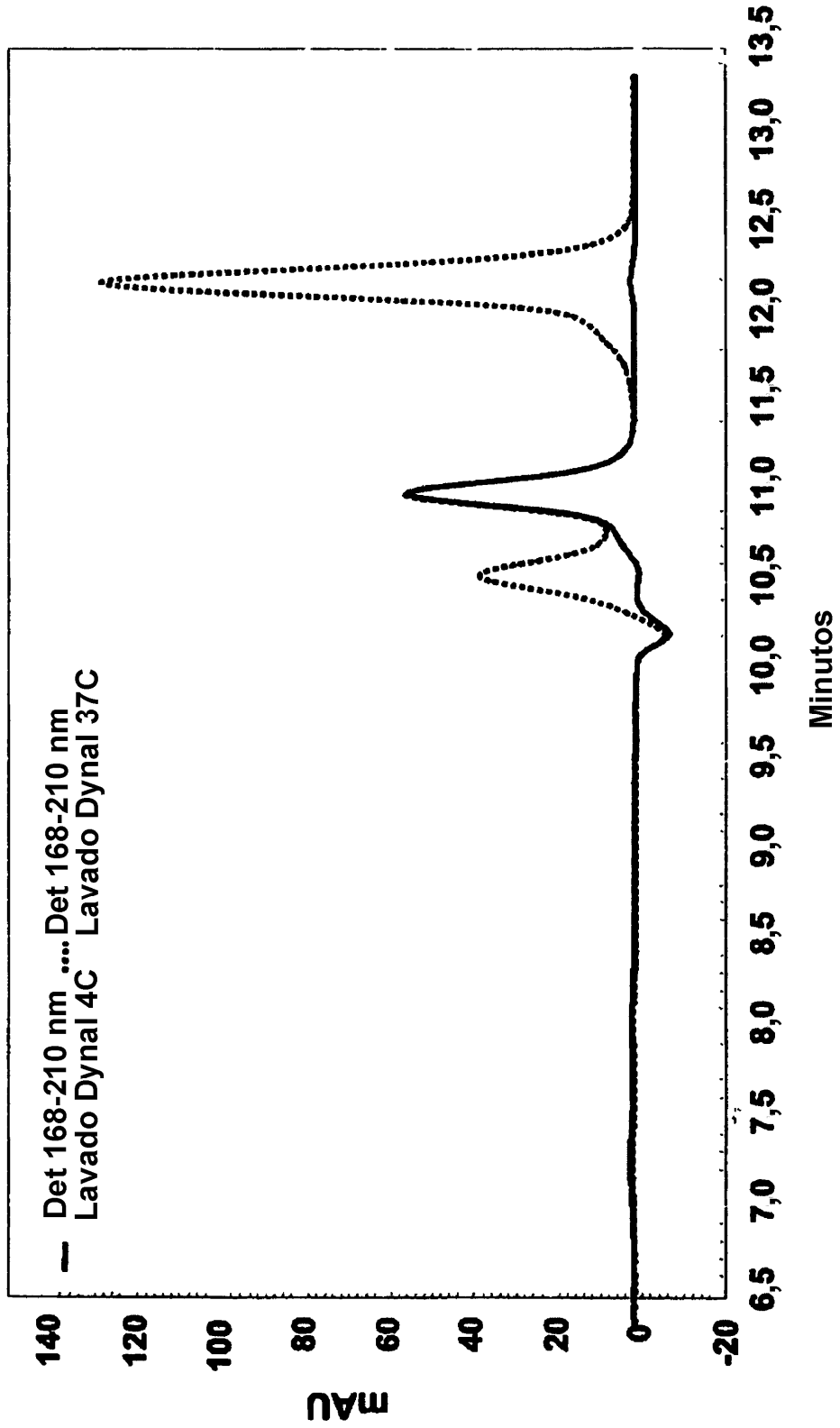


FIG. 11

RESULTADOS DE VALIDACIÓN PARA DOCE LOTES DE PMP PREPARADOS CON PROCESOS MANUALES Y SEMIAUTOMÁTICOS ENSAYADOS CONTRA VARIAS FUENTES DE ANALITOS, EJEMPLO 6											
DOSIS DE ANALITO (NG/ML)											
LOTE	ESCALA (ng)	Bio-Rad Líq. 1	Bio-Rad Líq. 2	Bio-Rad 1	Bio-Rad 2	Bio-Rad 3	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5
1 <sup>1</sup>	10.000	0,76	3,63	0,60	2,14	4,15	0,97	1,07	1,79	2,64	3,60
2 <sup>2</sup>	50	0,82	3,90	0,60	2,20	4,33	1,02	1,12	1,84	2,76	3,88
3 <sup>3</sup>	50	0,83	3,86	0,62	2,17	4,19	1,03	1,13	1,85	2,66	3,72
4 <sup>3</sup>	250	0,84	3,85	0,64	2,13	3,99	1,04	1,13	1,84	2,63	3,64
5 <sup>1</sup>	10.000	0,79	3,61	0,61	2,17	4,18	1,02	1,13	1,89	2,68	3,73
6 <sup>3</sup>	2.500	0,74	3,63	0,58	2,14	4,22	0,98	1,07	1,80	2,72	3,79
7 <sup>3</sup>	2.600	0,78	3,84	0,59	2,16	4,01	0,89	1,10	1,86	2,66	3,75
8 <sup>4</sup>	40.000	0,77	3,62	0,63	2,18	4,33	1,02	1,12	1,88	2,72	3,80
9 <sup>4</sup>	40.000	0,79	3,53	0,63	2,16	4,12	1,03	1,12	1,82	2,69	3,78
11 <sup>3</sup>	250	0,76	3,62	0,61	2,18	4,34	0,98	1,10	1,84	2,77	3,81
12 <sup>3</sup>	250	0,79	3,81	0,61	2,13	4,23	1,02	1,11	1,82	2,70	3,73
VAL 959 MEDIA GENERAL (ng/ml)		0,79	3,72	0,61	2,16	4,19	1,01	1,11	1,84	2,70	3,75
VAL 959 DESV. EST.		0,04	0,14	0,04	0,05	0,16	0,04	0,03	0,05	0,06	0,12
VAL 959%CV		4,97	3,84	6,03	2,20	4,19	3,51	3,05	2,47	2,82	3,11

Superíndice 1: significa un proceso semiautomático; Superíndice 2: significa un proceso manual; Superíndice 3: significa un segundo proceso semiautomático; Superíndice 4: significa un tercer proceso semiautomático

FIG. 12

ESTUDIOS DE REPRODUCIBILIDAD DE PROCESO, EJEMPLO 6						
	CONTROL 1	CONTROL 2	CONTROL 3	PACIENTE QC 1	PACIENTE QC 2	PACIENTE QC 3
LOTE VALIDACIÓN	LOTE C1-5190:150A	LOTE C2-5190:150A	LOTE C3-5190:150A	LOTE P1-5168-143	LOTE P2-5168-143	LOTE P3-5168-143
	DOSIS (PG/ML)	DOSIS (PG/ML)	DOSIS (PG/ML)	DOSIS (PG/ML)	DOSIS (PG/ML)	DOSIS (PG/ML)
1 <sup>1</sup>	66,7	621,9	1696,0	29,1	59,9	421,6
4 <sup>2</sup>	65,2	612,0	1729,6	29,3	58,5	413,9
5 <sup>1</sup>	65,7	614,4	1725,2	29,7	58,3	420,0
6 <sup>3</sup>	68,5	639,9	1838,3	32,1	63,2	423,9
7 <sup>1</sup>	67,0	628,7	1847,6	33,1	61,9	419,6
8/Piloto 1 <sup>4</sup>	67,0	624,6	1794,6	33,5	64,4	432,6
9/Piloto 2 <sup>4</sup>	66,8	621,8	1791,9	32,9	65,3	424,8
10 <sup>2</sup>	65,6	654,2	1824,9	32,8	58,5	443,8
11	67,8	644,1	1789,1	32,1	62,8	445,7
12	67,2	622,9	1762,3	34,3	62,6	429,2
VAL 959 MEDIA GENERAL (NG/ML)	66,8	628,5	1780,0	31,9	61,5	427,5
VAL 959 DESV. EST.	1,0	13,5	50,9	1,9	2,6	10,5
VAL 959%CV	1,5	2,1	2,9	5,8	4,2	2,4

<sup>1</sup> Superíndice 1: significa un proceso semiautomático; Superíndice 2: significa un proceso manual; Superíndice 3: significa un segundo proceso semiautomático; Superíndice 4: significa un proceso semiautomático 3.

FIG. 13

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD MEJORADA, EJEMPLO 7									
TIEMPO INCUBACIÓN:	4 DÍAS		127 DÍAS		% RECUPERACIÓN	127 DÍAS A 4 °C VS. 4 DÍAS A 4 °C %	127 DÍAS A 37 °C VS. 4 DÍAS A 4 °C %		
	TEMP:	4 °C	37 °C						
LOTE PAQUETE REACTIVOS	422782		518533						
LOTE CALIBRACIÓN:	420611		517451						
PARÁMETRO T4L									
RESPUESTA MEDIA CALIBRADOR	INTERVALO ACEPTABLE								
S0	1.000.000-2.500.000	1.777.895	1.405.170	1.464.900	104,3	n/a	n/a		
S1	n/a	847.098	647.556	650.873	100,5	n/a	n/a		
S2	n/a	412.507	310.886	295.772	95,1	n/a	n/a		
S3	n/a	155.959	119.449	123.880	103,7	n/a	n/a		
S4	n/a	93.311	75.511	75.989	100,6	n/a	n/a		
S5	n/a	53.939	38.593	42.298	109,6	n/a	n/a		
MEDIA	n/a	n/a	n/a	n/a	102,3	n/a	n/a		
PROPORCIONES	INTERVALO ACEPTABLE								
S1/S0	40-60	47,6	46,1	44,4	96,4	98,7	93,3		
S2/S0	20-30	23,2	22,1	20,2	91,3	95,4	87,0		
S3/S0	8-11	8,8	8,5	8,5	99,5	96,9	86,4		
S4/S0	4-6,5	5,2	5,4	5,2	96,5	102,4	98,8		
S5/S0	<3,5	3,0	2,7	2,9	105,1	90,5	95,2		
MEDIA	n/a	n/a	n/a	n/a	97,8	96,4	94,1		

FIG. 14A

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD MEJORADA, EJEMPLO 7, CONTINUACIÓN											
TIEMPO INCUBACIÓN:	4 DÍAS		127 DÍAS		% RECUPERACIÓN	127 DÍAS A 4 °C VS. 4 DÍAS A 4 °C %	127 DÍAS A 37 °C VS. 4 DÍAS A 4 °C %				
	4 °C	4 °C	4 °C	37 °C							
TEMP:											
LOTE PAQUETE REACTIVOS	422782		518533								
LOTE CALIBRACIÓN:	420611		517451								
PARÁMETRO T4L											
DOSIS MEDIA	MEDIA 2DE DECLARADA INTERVALO										
	0,84	0,54-0,74	0,65	0,61	0,66	107,6	94,5	101,7			
Lote Bio-Rad Lyphocheck 1 n.º40161	2,18	1,84-2,52	2,19	2,29	2,14	93,7	104,3	97,7			
Lote Bio-Rad Lyphocheck 2 n.º40162	4,19	3,51-4,87	4,32	4,27	4,31	101,0	98,8	89,8			
Lote Bio-Rad Lyphocheck 3 n.º40163		n/a	n/a	n/a	n/a	100,8	99,2	99,7			
MEDIA											
Paciente 1	1,02	0,86-1,18	n/a	1,08	1,05	97,4	n/a	n/a			
Paciente 2	1,12	0,94-1,30	n/a	1,10	1,13	102,7	n/a	n/a			
Paciente 3	1,83	1,53-2,13	n/a	1,86	1,89	101,5	n/a	n/a			
Paciente 4	2,74	2,30-3,18	n/a	2,76	2,77	100,2	n/a	n/a			
Paciente 5	3,80	3,20-4,40	n/a	3,92	3,82	97,5	n/a	n/a			
MEDIA		n/a	n/a	n/a	n/a	99,9	n/a	n/a			

FIG. 14B



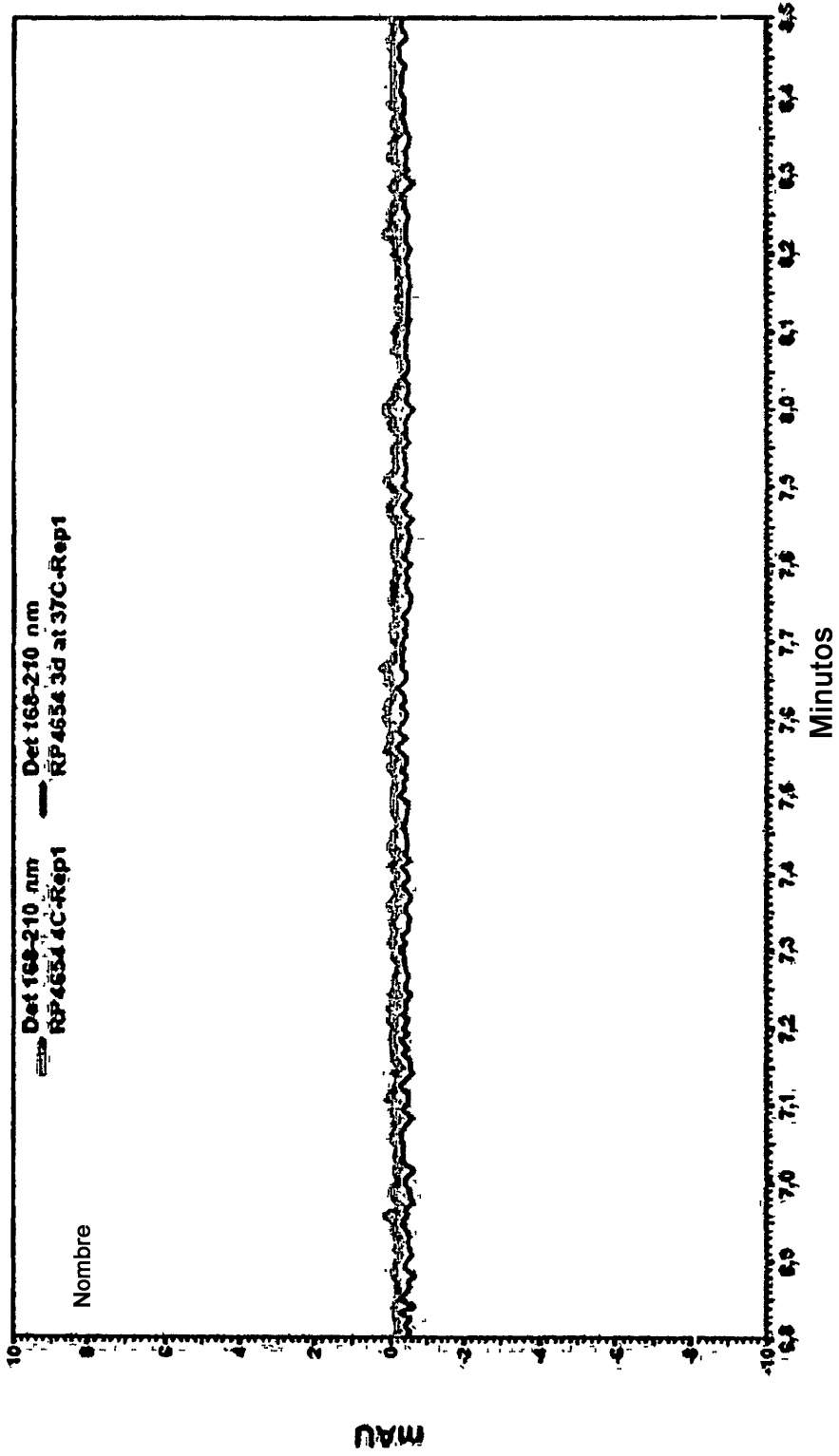


FIG. 15A

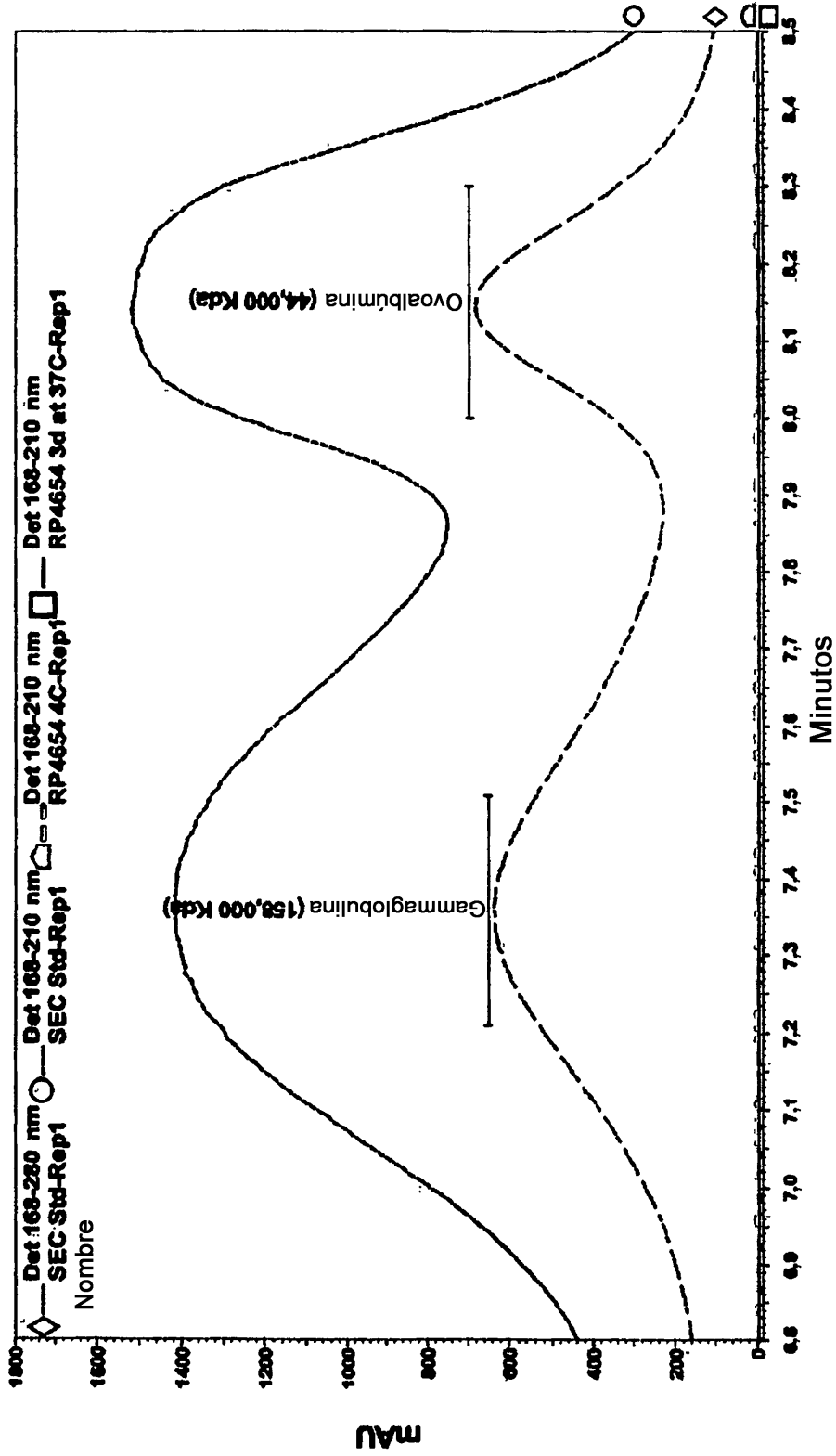


FIG. 15B

CÁLCULOS DE DENSIDAD SUPERFICIAL PARA MICROPARTÍCULAS, EJEMPLO 11													
	HABA		BSA		BIOTINA				SA			BIOTINA-IgG	
	MIN.	INTER.	MAX.	MIN.	MIN/INTER.	INTER.	INTER./MAX.	MAX.	MIN.	INTER.	MAX.	MIN.	MAX.
BIOTINA/BSA ( $\mu\text{MOL}/\mu\text{MOL}$ )	1,2	1,85	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSA/PMP ( $\mu\text{G}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BSA/PMP ( $\mu\text{MOL}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	1,3E-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BIOTINA/PMP ( $\mu\text{G}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	0,03860	0,05950	0,09575	0,11904	-	-	-	-	-
BIOTINA/PMP ( $\mu\text{MOL}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	1,6E-04	2,4E-04	3,9E-04	4,9E-04	-	-	-	-	-
SA/PMP ( $\mu\text{G}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	5,8	6,1	7,8	-	-
SA/PMP ( $\mu\text{MOL}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0E-04	1,1E-04	1,4E-04	-	-
BIOTINA/ IGG/PMP ( $\mu\text{G}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2	6,1
BIOTINA/ IGG/PMP ( $\mu\text{MOL}/\mu\text{G}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1E-05	4,1E-05
Pesos moleculares: Biotina: 244 Da; BSA: 66.000 Da; SA: 56.000 Da; IgG: 150.000 Da													

FIG. 16A

**CÁLCULOS DE DENSIDAD SUPERFICIAL PARA MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO UNA HIPÓTESIS DE RUGOSIDAD, EJEMPLO 11**

	BSA			BIOTINA			SA			BIOTINA-IGG			
	MIN.	INTER.	MAX.	MIN/INTER.	INTER.	INTER./MÁX.	MAX.	MIN.	INTER.	MAX.	MIN.	INTER.	MAX.
<b>BSA</b> ( $\mu\text{MOL}/\text{M}^2$ )	1,6E-02	1,7E-02	2,9E-02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1,6E-02	—	2,5E-02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<b>BIOTINA</b> ( $\mu\text{MOL}/\text{M}^2$ )	—	—	—	2,1E-02	3,3E-02	3,2E-02	6,6E-02	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	1,9E-02	2,9E-02	—	4,7E-02	5,8E-02	—	—	—	—	—
<b>SA</b> ( $\mu\text{MOL}/\text{M}^2$ )	—	—	—	—	—	—	—	1,4E-02	1,9E-02	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	1,2E-02	1,7E-02	—	—	—	—
<b>BIOTINA-IGG</b> ( $\mu\text{MOL}/\text{M}^2$ )	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,9E-3	2,8E-3	5,5E-3
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2,5E-3	—	4,8E-3

El área superficial de partícula osciló desde un mínimo de 7,4 m<sup>2</sup>/g hasta un máximo de 8,4 m<sup>2</sup>/g, con un intermedio de 7,7 m<sup>2</sup>/g. Los cálculos de área superficial de partícula se refieren al peso sólido seco.

Los cálculos de densidad superficial ( $\mu\text{MOL}/\text{M}^2$ ) para soportes que están en forma de partículas y que no están en forma de partículas se basaron en los cálculos de  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de la Figura 16A.

**FIG. 16B**

**CÁLCULOS DE DENSIDAD SUPERFICIAL PARA MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO UNA HIPÓTESIS DE LISURA, EJEMPLO 11**

DIÁMETRO PARTICULA ( $\mu\text{m}$ )	0,90	1,00	1,10	0,90	1,00	1,10	0,90	1,00	1,10
DENSIDAD PARTICULA ( $\text{g/cm}^3$ )	1,40	1,40	1,40	1,60	1,60	1,60	1,80	1,80	1,80
DENSIDAD PARTICULA ( $\text{mg/cm}^3$ )	1400	1400	1400	1600	1600	1600	1800	1800	1800
DIÁMETRO/PARTÍCULA ( $\text{cm}$ )	0,00009	0,0001	0,00011	0,00009	0,0001	0,00011	0,00009	0,0001	0,00011
RADIUS/PARTICLE ( $\text{cm}$ )	0,000045	0,00005	0,000055	0,000045	0,00005	0,000055	0,000045	0,00005	0,000055
VOLUMEN/PARTÍCULA ( $\text{cm}^3$ )	3,81704E-13	5,23599E-13	6,9691E-13	3,81704E-13	5,23598E-13	6,9691E-13	3,81704E-13	5,23599E-13	6,9691E-13
ÁREA SUPERFICIAL/PARTÍCULA ( $\text{cm}^2$ )	2,54469E-08	3,14159E-08	3,80133E-08	2,54469E-08	3,14159E-08	3,80133E-08	2,54469E-08	3,14159E-08	3,80133E-08
MG/PARTÍCULA	5,34E-10	7,33E-10	9,76E-10	6,11E-10	8,38E-10	1,12E-09	6,87E-10	9,42E-10	1,25E-09
PARTÍCULA/MG	1,87E+09	1,36E+09	1,02E+09	1,64E+09	1,19E+09	8,97E+08	1,46E+09	1,06E+09	7,97E+08
ÁREA SUPERFICIAL/MG ( $\text{cm}^2$ )	47,52	42,86	39,96	41,67	37,50	34,09	37,04	33,33	30,30
ÁREA SUPERFICIAL/MG ( $\text{m}^2$ )	0,0048	0,0043	0,0039	0,0042	0,0038	0,0034	0,0037	0,0033	0,0030

Los cálculos de área superficial de partícula se basan en partículas que tienen diámetros desde un mínimo de 0,90  $\mu\text{m}$  hasta un máximo de 1,10  $\mu\text{m}$ , con un intermedio de 1,00  $\mu\text{m}$ , y densidades de partícula desde un mínimo de 1,40  $\text{g/cm}^3$  hasta un máximo de 1,80  $\text{g/cm}^3$ , con un intermedio de 1,60  $\text{g/cm}^3$ .

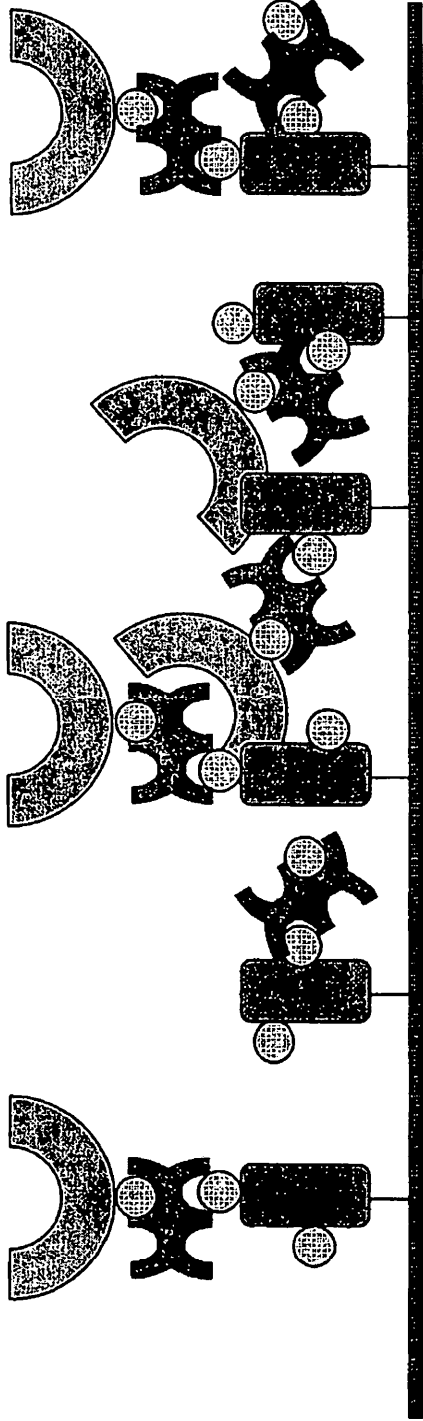
**FIG. 16C**

CÁLCULOS DE DENSIDAD SUPERFICIAL PARA MICROPARTÍCULAS UTILIZANDO UNA HIPÓTESIS DE LISURA, EJEMPLO 11														
	BSA			BIOTINA						SA			BIOTINA-IGG	
	MIN.	MAX.		MIN.	MÍN/INTER.	INTER.	INTER./MÁX.	MAX.	MIN.	INTER.	MAX.	MIN.	MAX.	
BSA ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	4,4E-02	7,1E-02		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
	2,8E-02	4,5E-02		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
BIOTINA ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	--	--	5,2E-02	8,0E-02	8,0E-02	1,3E-01	1,6E-01	--	--	--	--	--	--	
	--	--	3,3E-02	5,1E-02	5,1E-02	8,2E-02	1,0E-01	--	--	--	--	--	--	
SA ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	--	--	--	--	--	--	--	--	3,3E-02	3,6E-02	4,6E-02	--	--	
	--	--	--	--	--	--	--	--	2,1E-02	2,3E-02	2,9E-02	--	--	
BIOTINA-IGG ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ )	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	7,1E-03	1,4E-02	
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,4E-03	8,5E-03	

El área superficial de partícula de superficie lisa osciló desde un mínimo de 0,0030 m<sup>2</sup>/mg hasta un máximo de 0,0048 m<sup>2</sup>/g (ver Figura 16C).  
 Los cálculos de densidad superficial ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) para micropartículas utilizando una hipótesis de lisura se basaron en los cálculos de  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de la Figura 16A y los cálculos de m<sup>2</sup>/mg de la Figura 16C.

FIG. 16D

Insaturado



Insaturado y orientado

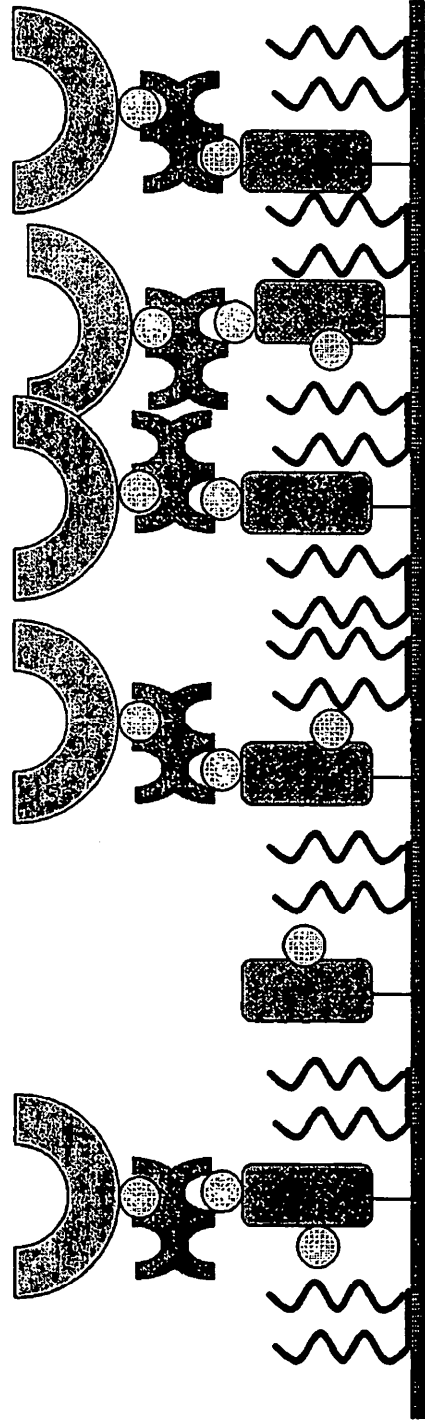


FIG. 17