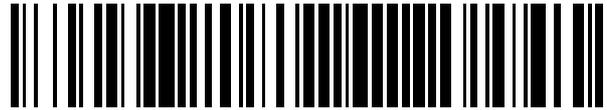


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 487**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08850523 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2210103**

54 Título: **Método para la inmovilización de una molécula de captura sobre un soporte sólido**

30 Prioridad:

12.11.2007 EP 07021878

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

22.06.2015

73 Titular/es:

**EURODIAGNOSTICA AB (100.0%)
P.O. BOX 50117
202 11 MALMÖ, SE**

72 Inventor/es:

**VAN BOEKEL, MARTINUS ADRIANUS MARIA;
VERHEIJEN, RONALD y
SALDEN, MARTINUS HUBERTUS LEONARDUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 538 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la inmovilización de una molécula de captura sobre un soporte sólido

Campo de la invención

5 Esta invención se encuentra en el campo de ensayos de diagnóstico, más en particular inmunoensayos, en donde una molécula de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido con el fin de capturar un analito.

Antecedentes de la técnica

10 Uno de los principales objetivos de los investigadores en los campos del diagnóstico (clínico) y los programas de control de la contaminación consiste en proporcionar nuevas estrategias analíticas para obtener datos precisos lo más rápidamente posible. Cuando se requiere un nuevo ensayo de rastreo con fines comerciales, el método tiene que ser sensible, específico, rápido, barato y fácil de realizar. En general, las técnicas inmunológicas (inmunoensayos) pueden satisfacer estas necesidades en gran medida.

15 Durante la última década, inmunoensayos de flujo lateral de un solo uso han tenido un éxito extremo tanto en los entornos de laboratorio, clínica ambulatoria como de atención primaria. En este tipo de ensayos, típicamente todos los componentes de la reacción pueden estar impregnados o inmovilizados sobre una fase sólida porosa, habitualmente una membrana de nitrocelulosa, y se ponen en contacto con la muestra, opcionalmente después de la adición de un diluyente (Zuk RF, Ginsberg VK, Houts T et al. (1985) Clin Chem 31:1144-1150, Bunce RA, Thorpe GH, Keen L (1991) Anal Chim Acta 249:263-269, y May K (1994) En: D Wild (comp.): The Immunoassay Handbook. Macmillan Press, Londres, 233-235).

20 Este formato de inmunoensayo también se conoce como ensayo de la tira, ensayo de la tira de una etapa, ensayo inmunocromatográfico, diagnóstico de flujo rápido, inmunoensayo rápido (test), inmunoensayo de flujo lateral (LFI), test en el sitio (ensayo) o test cercano al paciente (NPT).

Los inmunoensayos son sistemas de medición analíticos que se basan en la unión entre antígenos y anticuerpos para la detección de analitos específicos en muestras tales como, por ejemplo, muestras clínicas.

25 En un inmunoensayo típico, los antígenos o anticuerpos se unen habitualmente a algún tipo de etiqueta y luego se utilizan como un reactivo de detección para detectar el analito. A un reactivo de detección tal como un anticuerpo o antígeno se le alude habitualmente como un conjugado. La etiqueta puede ser, por ejemplo, una etiqueta radiactiva o una enzima para la detección colorimétrica o una partícula coloidal de color tales como oro, carbono, sílice o látex para la visualización directa de la inmunorreacción (Leuvering JHW, Thal PJHM, Van der Waart M, Schuurs AHWM (1980) J Immunoassay 1(1): 77-91).

30 En la práctica, partículas de oro coloidal o nanorracimos de oro que tienen un diámetro de 25-40 nm son probablemente las etiquetas más comúnmente empleadas en inmunoensayos de flujo lateral (Verheijen, R., en: Analytical Biotechnology 2002, editorial Birkhauser Comp: T. Schalkhammer págs. 134-166).

Un inmunoensayo típico comprende una tira de ensayo tal como la ilustrada en la figura 1. Una tira de ensayo de este tipo puede estar montada en una carcasa de plástico tal como la ilustrada en la figura 2.

35 En un entorno comercial, una tira de ensayo típica puede estar compuesta de un cierto número de componentes, incluyendo una almohadilla de muestra, una almohadilla conjugada, una almohadilla absorbente y una membrana de flujo lateral que contiene los reactivos de captura en la zona de captura, habitualmente en forma de dos líneas de captura; una línea de ensayo y una línea de control. El reactivo de captura está inmovilizado típicamente sobre la membrana de flujo lateral. El reactivo de captura en el ensayo comprende una molécula que es capaz de unirse al (de capturar el) analito. A esta molécula se la alude en esta memoria como una molécula de captura.

40 El propósito principal de la carcasa es fijar los diversos componentes de la tira de ensayo y mantenerlos en estrecho contacto unos con otros. Además, la carcasa puede determinar las dimensiones del pocillo de muestra y contiene habitualmente la ventana de visualización con indicaciones de lectura.

Al describir el principio del inmunoensayo, se tiene que distinguir entre el ensayo directo que se utiliza habitualmente para detectar analitos de alto peso molecular tales como proteínas, y el ensayo indirecto o competitivo, habitualmente utilizado para detectar analitos de baja masa molecular tales como residuos de fármacos, antibióticos, hormonas, etc.

5 En ambos tipos de ensayos, el usuario dispensa una muestra de líquido (extracto de tampón, leche, orina, suero, plasma, sangre entera, etc.) a la almohadilla de muestra. En un ensayo típico, la muestra fluye entonces a través de la almohadilla de muestra hacia la almohadilla de conjugado en donde se libera y se mezcla con el conjugado. También son conocidas en la técnica otras configuraciones, por ejemplo en los casos en los que la muestra se pone en contacto primero con los reactivos de captura y el conjugado se pone subsiguientemente en contacto con la
10 región de captura (Verheijen, R., en: *Analytical Biotechnology 2002*, editorial Birkhauser Comp.: T. Schalkhammer págs.134-166).

Los ensayos de flujo lateral disponibles en la actualidad emplean a menudo conjugados que se encuentran adyacentes a o aguas abajo del punto de deposición de la muestra (figura 1). La muestra en sí es invocada para volver a suspender el conjugado de la almohadilla de conjugado y llevarlo a la zona de captura. Inmunoensayos de este tipo pueden requerir un tamaño de muestra relativamente grande con el fin de proporcionar un flujo adecuado de la muestra y el conjugado.

Alternativamente, el conjugado puede estar situado aguas arriba del punto de deposición de la muestra. Inmunoensayos de este tipo requieren un volumen de muestra mucho menor. Diluyente adicional se puede añadir luego para volver a suspender el conjugado de la almohadilla de conjugado y para proporcionar un flujo adecuado de la muestra y el conjugado a la zona de captura.

Téngase en cuenta que "aguas arriba" y "aguas abajo" se refieren a la posición de un elemento con relación a la dirección de flujo de una muestra en el inmunoensayo.

En el formato de ensayo directo para la detección de analitos de alta masa molecular tales como proteínas, el conjugado puede consistir en nanorracimos de oro recubiertos con anticuerpos específicos reactivos con el analito.
25 Si ese analito está presente en la muestra, reaccionará con el conjugado. Los complejos de analito-conjugado formados son móviles y son capaces de moverse libremente de la almohadilla de conjugado a la membrana con el flujo del fluido. En la línea de ensayo, los complejos serán capturados por la molécula de captura tal como anticuerpos anti-analito inmovilizados. Por lo tanto, la presencia del analito en la muestra resultará en una línea de ensayo de color. La intensidad del color de la línea de ensayo puede ser proporcional a la concentración del analito
30 en la muestra.

Cuando la concentración de la proteína de interés es menor que la concentración de detección más baja o cuando el analito está completamente ausente, no será visible línea de ensayo alguna. El exceso de muestra que fluye más allá de las líneas de ensayo y control se recoge en la almohadilla absorbente (Verheijen, R., en: *Analytical Biotechnology 2002*, editorial Birkhauser Comp.: T. Schalkhammer, págs. 134-166).

35 En el formato de ensayo competitivo para la detección de analitos de bajo peso molecular, el conjugado consiste en nanorracimos de oro recubiertas con anticuerpos contra el analito. La línea de ensayo consiste en este caso en el analito acoplado a la denominada proteína de soporte. Cuanto más analito esté presente en la muestra, más eficazmente competirá con el analito inmovilizado en la membrana por la unión a la cantidad limitada de anticuerpos del conjugado. Así, la ausencia del analito en la muestra resultará en una línea de ensayo de color, mientras que un
40 aumento en la cantidad de analito resultará en una disminución de la señal en la zona de detección. A una cierta concentración de analito en la muestra, la línea de ensayo ya no será visible. El límite de detección se define como la cantidad de analito en la muestra que sólo causas una invisibilidad total de la línea de captura de ensayo.

Inmunoensayos que comprenden una tira de ensayo están disponibles comercialmente para un número creciente de analitos (de alta y baja masa molecular). El primer analito diana importante para este formato de ensayo fue la gonadotropina coriónica humana (HCG) para la detección del embarazo. En la actualidad, está disponible una gran diversidad de inmunoensayos (Anónimo, *Syllabus of a two-day seminar on Solid Phase Membrane-Based Immunoassays*, París, 25-26 de septiembre de 1997, Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU., Anónimo, *Syllabus of The Latex Course*, Londres, 1-3 de octubre, 1997, Organizado por Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN, EE.UU., Price CP, Thorpe GHG, Hall J, Bunce RA (1997) En: CP Price, DJ Newman (comps.): *Principles and Practices of Immunoassays* (2ª edición). MacMillan Reference Ltd, Londres, 579-603, Hobbs FDR, Delaney BC, Fitzmaurice DA et al (1997). *Health Technology Assessment* 1(5)).

Ejemplos de inmunoensayos comercialmente disponibles son, p. ej., inmunoensayos para la detección de hormonas (embarazo, fertilidad, ovulación, menopausia, trastorno sexual, funciones de la tiroides), marcadores tumorales (próstata, colorrectal, etc.), virus (VIH, hepatitis B y C), bacterias (*Streptococcus A y B*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*, etc.), IgE (alergia) y troponina T en monitorización cardíaca. Todos estos analitos se miden sobre la base de su presencia o ausencia. Una extensa revisión del ensayo cercano al paciente en atención primaria ha sido publicada por Hobbs et al., véase más arriba.

Aunque los inmunoensayos parecen simples, complejas interacciones entre sus diversos componentes conducen a una serie de desafíos, tanto en los entornos de desarrollo como de fabricación. Estos desafíos son aún mayores para los ensayos cuantitativos, en donde la intensidad del color de la línea de ensayo debe ser repetible entre lotes de producción. Desde una perspectiva de desarrollo, la creación de un sistema de ensayo con éxito significa optimizar las interacciones entre sus materias primas, diseño de componentes y técnicas de fabricación.

En un inmunoensayo típico se distingue entre una fase móvil y una fase inmóvil. La fase móvil consiste en todas las moléculas que se mueven por encima de la membrana y/o las diferentes almohadillas utilizadas en el inmunoensayo, mientras que la fase inmóvil consiste en aquellas moléculas que no se mueven por encima de las almohadillas o la membrana. Típicamente, la fase móvil comprende la muestra, el analito en la muestra, los diluyentes y el conjugado, mientras que la fase inmóvil comprende típicamente los reactivos de captura inmovilizados sobre las líneas de captura de control y las líneas de captura de ensayo.

Un dilema típico común a cada uno de los inmunoensayos es que se desea que la fase móvil pueda moverse libremente sobre o a través de la membrana al tiempo que experimenta el menor impedimento posible de la membrana mientras que la fase inmóvil debería estar unida de forma inamovible a la membrana. El tamaño de poro de la membrana determina los caudales de la fase móvil. Para los ensayos rápidos, se prefiere una membrana que fluya rápidamente y membranas de este tipo se caracterizan por tamaños de poro relativamente grandes. Es un problema para este tipo de membranas retener los reactivos de captura, en particular si el reactivo de captura consiste en pequeñas moléculas tales como péptidos.

La nitrocelulosa es probablemente el polímero más utilizado para las membranas de flujo lateral en el inmunoensayo. El tamaño de poro de membranas de este tipo varía entre 5 y 20 μm , que es grande en comparación con un tamaño de poro de 0,2 a 1,2 μm de una membrana de nitrocelulosa utilizada para la transferencia de proteínas. Un tamaño de poro grande implica un pequeño área de superficie de la membrana y, por consiguiente, una baja capacidad de unión a una proteína, es decir, de 20-30 μg de IgG/cm^2 , en lugar de los 110 μg de IgG/cm^2 para una membrana de transferencia con un tamaño de poro de 0,45 μm .

En la técnica se han descrito muchos inmunoensayos y en la técnica se conocen métodos para la inmovilización de reactivos de captura, lo más notablemente antígenos o anticuerpos. En general, los métodos para inmovilizar péptidos pequeños emplean el principio de conjugar el péptido pequeño a una molécula mayor tal como, por ejemplo, un péptido mayor, una proteína tal como albúmina de suero bovino (BSA) o azúcar. También se ha descrito utilizar proteínas de fusión, comúnmente producidas en organismos recombinantes.

Un método bien conocido en la técnica es el acoplamiento de una molécula de captura tal como un péptido pequeño a proteínas mayores tales como BSA u ovoalbúmina con el fin de obtener un reactivo de captura que quede retenido mejor en una membrana que la propia molécula de captura (Verheijen, R., en: *Analytical Biotechnology 2002*, editorial Birkhauser Comp: T. Schalkhammer, págs. 134-166). Otros métodos conocidos se basan en la inmovilización de una molécula de captura a un soporte sólido en los que se emplea la unión de alta afinidad de biotina y estreptavidina. En esos métodos de la técnica anterior, avidina o estreptavidina se inmoviliza primero sobre un soporte sólido y se utilizan después para capturar una molécula de captura biotinilada tal como un péptido.

El acoplamiento de biotina a otras moléculas es un proceso conocido en la técnica como biotinilación. La biotina se une fuertemente a proteínas tales como avidina y estreptavidina, y moléculas biotiniladas son fácilmente capturadas por una superficie que tiene moléculas de avidina o estreptavidina inmovilizadas. Los complejos de biotina-avidina y biotina-estreptavidina tienen constantes de asociación extremadamente grandes ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ para avidina y 10^{13} M^{-1} para estreptavidina), energéticamente equivalentes a enlaces covalentes, y son estables a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas y pH.

La biotinilación se logra típicamente utilizando una forma químicamente activa de biotina para marcar residuos de lisina expuestos en proteínas diana. La lisina es uno de los aminoácidos que se producen con más frecuencia, y la biotinilación química puede, por lo tanto, utilizarse para biotinar esencialmente todas las proteínas.

Interacciones de biotina/estreptavidina han sido utilizadas de otras maneras en procesos de inmunoensayo durante algún tiempo. Por ejemplo, en el documento US 5.126.241, estreptavidina adsorbida a un soporte sólido se utiliza para unir antígeno biotinilado en un proceso que implica la incubación para formar un complejo en el que el analito a determinar compete con la etiqueta y el soporte sólido por el acceso a un anticuerpo capaz de unir los tres.

- 5 El documento US 4.496.654 describe un ensayo para gonadotropina coriónica humana llevado a cabo por la captura de un anticuerpo biotinilado utilizando un disco de papel acoplado a avidina, haciendo reaccionar el anticuerpo sobre un disco con una disolución de la que se sospecha que contiene hCG, y luego determinando la cantidad de hCG sobre el disco utilizando técnicas de determinación estándares. Este ensayo resulta en un sándwich de hCG formado a partir de anti-hCG unido a un soporte sólido a través del enlace de biotina/avidina y anti-hCG marcada.
- 10 Este ensayo no implica un flujo lateral de la muestra.

El documento US 5.001.049 describe un método para la determinación de anticuerpos contra el VIH humano, que implica incubar un soporte sólido derivatizado de estreptavidina con un péptido biotinilado reactivo con anti-VIH, y después detectar cualquier anticuerpo unido con el receptor de anticuerpo marcado. De nuevo, en estos ensayos no tiene lugar un flujo lateral.

- 15 El documento RE 34.132, que es una re-expedición de la Patente Número 4.945.042, describe un ensayo directo para un anticuerpo en el que el analito sirve como un enlace entre un epítipo marcado y un epítipo unido al sustrato a través de un enlace de estreptavidina/biotina. De nuevo, la velocidad de reacción no es crítica, ya que no se requiere un formato de flujo lateral.

- 20 Es el objeto de esta solicitud proporcionar al menos una tecnología alternativa para la inmovilización de reactivos de captura en inmunoensayos, preferiblemente una tecnología de inmovilización con ventajas frente a la técnica anterior. Tales ventajas se pueden encontrar en la especificidad, sensibilidad, coste o facilidad de fabricación de los inmunoensayos y/o en ventajas en costos o facilidad de manipulación del propio ensayo de diagnóstico final.

Compendio de la invención

- 25 Sorprendentemente, se encontró que una especificidad y/o sensibilidad mejorada podría lograrse cuando una molécula de captura tal como un antígeno o anticuerpo se inmovilizó sobre una membrana al tiempo que estaba conjugada con biotina y un miembro de unión tal como un anticuerpo anti-biotina, avidina, captavidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida o derivados de la misma, antes de inmovilizar el complejo así obtenido sobre el soporte sólido.

- 30 Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la inmovilización de una molécula de captura sobre un soporte sólido, en el que la molécula de captura se une covalentemente a una molécula de biotina para obtener una molécula de captura biotinilada y en el que la molécula de captura biotinilada se pone en contacto subsiguientemente con un miembro de unión para formar un complejo, en el que el complejo se pone en contacto con el soporte sólido.

Descripción detallada de la invención

- 35 Se encontró que un método en el que una molécula de captura se marcó con biotina y luego se conjugó a un miembro de unión tal como un anticuerpo anti-biotina, estreptavidina, avidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida en disolución antes de inmovilizar el complejo así obtenido a un soporte sólido, proporcionó ventajas particulares sobre técnicas de inmovilización conocidas, en el que la molécula marcada con biotina es capturada por un miembro de unión ya inmovilizado sobre el soporte sólido.

- 40 Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la inmovilización de una molécula de captura sobre un soporte sólido en el que la molécula de captura se fija covalentemente a una molécula de biotina para obtener una molécula de captura biotinilada y en el que la molécula de captura biotinilada se pone en contacto primero con un miembro de unión para formar un complejo, tras lo cual el complejo se pone en contacto con el soporte sólido.

- 45 En los métodos de la técnica anterior, el acoplamiento de biotina a un miembro de unión se realiza típicamente mientras que el miembro de unión está fijado a un soporte sólido. Esta invención se dirige a la inmovilización de la molécula de captura después de haberse formado un complejo entre la molécula de captura biotinilada y un miembro de unión en disolución. Sólo después de ello la molécula de captura biotinilada y el miembro de unión se inmovilizan sobre el soporte sólido.

Un miembro de unión de alta afinidad en este contexto debe interpretarse como una molécula capaz de unirse a biotina. Ésta puede ser una molécula capaz de formar una unión reversible con biotina tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-biotina. También puede ser un miembro de unión de alta afinidad tal como una molécula con una constante de afinidad elevada. Un miembro de unión de alta afinidad de este tipo puede formar un enlace con el complejo biotinilado que es equiparable a un enlace covalente. El experto en la materia reconocerá que éste se encontrará en el orden de $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ a 10^{11} M^{-1} , típicamente de 10^{13} M^{-1} para estreptavidina.

El miembro de unión de alta afinidad puede ser ventajosamente seleccionado entre el grupo que consiste en avidina, captavidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida o derivados de las mismas.

Ha de entenderse que este método difiere de los métodos de la técnica anterior descritos anteriormente en que el miembro de unión de alta afinidad no está acoplado al soporte sólido cuando se mezcla con la molécula de captura biotinilada; sólo después de la formación del enlace entre biotina y el miembro de unión, el complejo obtenido de este modo se inmoviliza sobre el soporte sólido. Para evitar dudas, la puesta en contacto de la molécula de captura biotinilada con un miembro de unión para formar un complejo de molécula de captura se realiza en disolución o en cualquier otra forma en la que ni la molécula de captura biotinilada ni el miembro de unión de alta afinidad está fijado a un soporte sólido.

La expresión molécula de captura en este contexto debe interpretarse como una molécula capaz de unirse a otra molécula tal como un analito, en particular un antígeno o anticuerpo. Los antígenos pueden consistir en una amplia gama de moléculas tales como haptenos, azúcares, péptidos, proteínas oligosacáridos y muchos más conocido por la persona experta. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pueden derivarse de muestras clínicas humanas o fluidos corporales tales como, por ejemplo, saliva, sudor, esputo, orina, sangre, plasma, suero, fluido vaginal o líquido cefalorraquídeo. También se pueden derivar de animales de experimentación tales como ratones, ratas, conejos, lamas y camellos, o de fuentes recombinantes tales como bacterias, levaduras o células humanas.

El método de acuerdo con la invención puede ventajosamente emplearse cuando la molécula de captura consiste en moléculas pequeñas. En este contexto, la expresión molécula pequeña se ha de interpretar en el sentido de una molécula con una masa molecular inferior a 100.000 (cien mil) Da, preferiblemente inferior a 50.000 Da, tal como 40.000, 30.000, 20.000 ó 10.000 Da. Particularmente, se obtienen ventajas cuando la molécula pequeña es incluso más pequeña que 10.000 Da tal como, por ejemplo, menor que 8000, 6000, 4000, 2000 ó 1000 Da. Ejemplos de tales moléculas pequeñas pueden ser fragmentos de anticuerpos, péptidos sintéticos o naturales o haptenos.

Alternativamente, la expresión moléculas pequeñas también puede definirse funcionalmente, por ejemplo como una función del tamaño de poro del soporte sólido tal como una membrana. Es conocido en la técnica que la adherencia o unión de moléculas a soportes sólidos depende del tamaño de poros del soporte sólido. Si el tamaño de poro es más grande, la unión de una molécula de captura tal como un péptido al soporte sólido será más deficiente que la unión a un soporte sólido con poros más pequeños. Por lo tanto, una molécula pequeña también se puede definir como una molécula que no se pegará o no lo hará de forma detectable a una membrana dada con un tamaño de poros particular.

Se obtuvieron resultados particularmente ventajosos cuando las moléculas pequeñas eran péptidos. En este estudio, se utilizaron péptidos en el intervalo de 5 a 100 aminoácidos tales como, por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 19, 20, 30, 50 u 80 aminoácidos. Tales péptidos son conocidos por su deficiente unión a soportes sólidos, en particular membranas porosas, más en particular membranas porosas con grandes tamaños de poro. Cuando péptidos de este tipo se acoplaron a biotina y se utilizaron en el método de acuerdo con la invención, se observó una sensibilidad y especificidad mejoradas del ensayo resultante. Además de ello, el método de fabricación era más fácil y menos laborioso en comparación con los métodos de la técnica anterior. Además, las líneas resultantes de muestras positivas en la región de detección eran más claras y nítidas en comparación con los métodos de la técnica anterior.

La expresión soporte sólido en este sentido debe ser interpretada como cualquier soporte o superficie adecuado para la realización de un inmunoensayo. En particular, el método emplea un soporte sólido que es poroso para permitir un flujo capilar a través del material. Ejemplos de soportes sólidos porosos de este tipo son membranas de nitrocelulosa.

Se conocen en la técnica métodos para fijar covalentemente una molécula de biotina a cualquier molécula de captura tal como una molécula pequeña, y kits para la biotinilación están disponibles comercialmente, por ejemplo de Roche Diagnostics, Indianapolis, Cat N° 11 008960 001. La persona experta sabrá cómo manejar y unir una

molécula de captura de alta afinidad con miembro de unión tal como avidina, captavidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida a la molécula de captura biotinilada.

5 Se trató de unir péptidos sintéticos directamente a membranas de nitrocelulosa Millipore HF075, HF090, HF120, HF135, HF180 o HF240. Para ello, los siguientes péptidos 12-meros sintéticos según se describen en el documento WO 03/050542 fueron esparcidos sobre las membranas y se secaron.

0002-27	H Q K R G Cit G W S R A A
0002-29	H Q R R V Cit G W S R A A
0002-31	H Q R R T Cit G G S R A A
0002-32	H Q R K W Cit G A S R A A
0002-36	H Q F R F Cit G Cit S R A A
0002-37	H Q K W R Cit G R S Cit A A
0002-63	H Q F R F Cit G W S R A A
0107-32	K P Y T V Cit K F M R R P
0107-35	A R F Q M Cit H Cit R L I R
0107-45	Y S F V W Cit S H A R P R
0113-30	A R F Q M R H Cit R L I R
0218-36	R N L R L Cit R E R N H A

Aquí "Cit" representa citrulina y los otros aminoácidos se muestran en el código de una letra para los aminoácidos. Además, las variantes cíclicas de estos péptidos (ejemplo 1) también se ensayaron en la misma configuración.

10 Estos péptidos lineales y cíclicos son conocidos por su excelente reactividad con anticuerpos en los sueros de pacientes que padecen artritis reumatoide. Las membranas secas se sometieron a ensayo en cuanto a la reactividad con 20 de estos sueros que oscilan desde títulos de anticuerpo de bajos a muy altos y parecía que ninguno de los péptidos fueron retenidos en las membranas, lo cual era evidente por el hecho de que ninguna de las líneas en las que se empleaban los péptidos dio una reacción significativa con los anticuerpos.

15 Los mismos péptidos fueron luego biotinilados (ejemplo 2) y sometidos a ensayo en cuanto a la reactividad de la misma manera que la descrita anteriormente. De nuevo, no se observó reacción alguna, lo cual se atribuyó al hecho de que los péptidos biotinilados eran de nuevo demasiado pequeños como para quedar retenidos por las membranas. En la sección de ejemplos se muestran los resultados obtenidos con el panel de referencia de muestras de alto, medio y bajo contenido de plasma solamente.

20 Con el fin de proporcionar un ejemplo comparativo, se utilizó un método de la técnica anterior para inmovilizar los péptidos más eficazmente. Por lo tanto, se preparó un conjugado entre los péptidos y la albúmina de suero bovino (BSA) y ese conjugado fue esparcido sobre nitrocelulosa. Se obtuvieron algunos resultados falsos positivos, así como falsos negativos. En total, este fue calificado como un resultado medio (Tabla 1).

25 A continuación, los péptidos biotinilados se hicieron reaccionar con un medio de unión que comprende anticuerpos monoclonales o policlonales anti-biotina (Jackson Laboratories, fracción de IgG de producto 200-002-096) y luego se esparcieron sobre las membranas. Aunque esto mejoró la sensibilidad del ensayo, se observó la misma especificidad moderada que con el método de la técnica anterior que emplea un conjugado de péptido-BSA (Tablas 2 y 3).

30 Cuando los péptidos biotinilados se mezclaron con un miembro de unión de alta afinidad tal como avidina, captavidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida o derivados de las mismas antes de inmovilizar el complejo de molécula de captura en las membranas, los resultados mejoraron en gran medida. Se observaron menos falsos positivos en comparación con cualquiera de los métodos anteriores y se obtuvo una buena especificidad. En particular estreptavidina funcionó muy bien, esto se tradujo en un ensayo con 100% de especificidad y 100% de sensibilidad (Tablas 2 y 3).

5 En los ejemplos, varios péptidos fueron sometidos a ensayo en cuanto a su reactividad con anticuerpos de pacientes con artritis reumatoide (RA). Se demostró que en todos los casos se observó una reactividad mejorada en comparación con métodos de la técnica anterior. Reactividad mejorada en este sentido ha de interpretarse como una sensibilidad o especificidad mejorada del ensayo o ambas. La invención, por lo tanto, también se refiere a un método según se ha descrito anteriormente, en el que la molécula de captura es un antígeno reactivo con anticuerpos obtenidos de pacientes que padecen artritis reumatoide.

Se observó una reactividad mejorada con anticuerpos para RA cuando se utilizó un péptido citrulinado cíclico como molécula de captura (Tabla 3).

10 El método de acuerdo con la invención se puede emplear con una amplia gama de soportes sólidos. Se obtuvieron resultados ventajosos cuando el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en membranas que fluyen rápidamente tales como Millipore HF075, HF090, HF120, HF135, HF180 o HF240 o membranas con propiedades de flujo equiparables.

15 La invención también se refiere a un soporte sólido con un complejo de molécula de captura inmovilizada sobre el mismo, obtenible por el procedimiento de acuerdo con la invención. Un soporte sólido de este tipo se puede utilizar, por ejemplo, en un inmunoensayo para la detección de anticuerpos o antígenos, tal como la detección de anticuerpos específicos para la artritis reumatoide. En un inmunoensayo de este tipo un péptido cíclico citrulinado se inmoviliza ventajosamente sobre el soporte sólido.

20 En los ejemplos se describe cómo varios complejos de molécula de captura fueron puestos en contacto con el soporte sólido. Esto se hizo con la ayuda de una máquina, que no debe ser interpretado como que es obligatorio. Una persona experta será consciente de otras opciones para el depósito de un complejo de molécula de captura sobre un soporte sólido, incluyendo, pero no limitado a inmersión pulverización, secante, esparcido y muchos otros.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Esquema de una tira de ensayo típica. A. Vista en planta, B. Vista lateral.

Figura 2. Ejemplo de una carcasa utilizada en un dispositivo de ensayo de tira.

25 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Péptidos

Los siguientes péptidos lineales se obtuvieron comercialmente de Polipeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503.

2-27	H Q K R G Cit G W S R A A
2-29	H Q R R V Cit G W S R A A
2-31	H Q R R T Cit G G S R A A
2-32	H Q R K W Cit G A S R A A
2-36	H Q F R F Cit G Cit S R A A
2-37	H Q K W R Cit G R S Cit A A
2-63	H Q F R F Cit G W S R A A
107-32	K P Y T V Cit K F M R R P
107-35	A R F Q M Cit H Cit R L I R
107-45	Y S F V W Cit S H A R P R
113-30	A R F Q M R H Cit R L I R
218-36	R N L R L Cit R E R N H A

Variantes cíclicas de estos péptidos también se obtuvieron comercialmente de Polipeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503. Estos péptidos se ciclaron a través de sus residuos cisteína y tenían la siguiente secuencia primaria:

2-27 Cíclico	G S Q H C H Q K R G Cit G W S R A A C G-NH2
2-29 Cíclico	G S Q H C H Q R R V Cit G W S R A A C G-NH2
2-31 Cíclico	G S Q H C H Q R R T Cit G G S R A A C G-NH2
2-32 Cíclico	G S Q H C H Q R K W Cit G A S R A A C G-NH2
2-36 Cíclico	G S Q H C H Q F R F Cit G Cit S R A A C G-NH2
2-37 Cíclico	G S Q H C H Q K W R Cit G R S Cit A A C G-NH2
2-63 Cíclico	G S Q H C H Q F R F Cit G W S R A A C G-NH2
107-32 Cíclico	G S Q H C K P Y T V Cit K F M R R P C G-NH2
107-35 Cíclico	G S Q H C A R F Q M Cit H Cit R L I R C G-NH2
107-45 Cíclico	G S Q H C Y S F V W Cit S H A R P R C G-NH2
113-30 Cíclico	G S Q H C A R F Q M R H Cit R L I R C G-NH2
218-36 Cíclico	G S Q H C R N L R L Cit R E R N H A C G-NH2

El extremo C de los péptidos se amidó.

Ejemplo de la técnica anterior: Acoplamiento de péptidos a BSA

5 Complejos de BSA-péptido se prepararon mediante la reticulación de BSA a los péptidos lineales y cíclicos tal como se muestra en el ejemplo 1. Para ello, los péptidos se sintetizaron añadiendo un residuo cisteína a la parte N-terminal de los péptidos que se muestran en el ejemplo 1. La reticulación de BSA se logró utilizando el reticulante sulfo-SMCC obtenido de Pierce, Meridian Road Rockford IL, producto nº 22322 de acuerdo con el protocolo del fabricante. En esencia: BSA se activó cuando se disolvió en 1 mg/ml en PBS y se añadieron 20 ug de reticulante por 10 mg de BSA. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y la reacción se bloqueó con Tris-HCl 1 mM, pH 7,4 concentración final. Reticulante libre se separó con una columna PD10. Los péptidos se añadieron a razón de 1 mg por mg de BSA activado y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Péptidos libres se separaron mediante diálisis frente a PBS pH 7,4.

15 El análisis en gel de poliacrilamida reveló un peso molecular de 100 kDa para el complejo péptido-BSA, lo que significa que, en promedio, aproximadamente 13 moléculas de péptidos se fijaban a una molécula de BSA.

Se obtuvieron los siguientes péptidos.

BSA 2-27	BSA C H Q K R G Cit G W S R A A
BSA 2-29	BSA C H Q R R V Cit G W S R A A
BSA 2-31	BSA C H Q R R T Cit G G S R A A
BSA 2-32	BSA C H Q R K W Cit G A S R A A
BSA 2-36	BSA C H Q F R F Cit G Cit S R A A
BSA 2-37	BSA C H Q K W R Cit G R S Cit A A
BSA 2-63	BSA C H Q F R F Cit G W S R A A
BSA 107-32	BSA C K P Y T V Cit K F M R R P
BSA 107-35	BSA C A R F Q M Cit H Cit R L I R
BSA 107-45	BSA C Y S F V W Cit S H A R P R
BSA 113-30	BSA C A R F Q M R H Cit R L I R
BSA 218-36	BSA C R N L R L Cit R E R N H A

Ejemplo 2: Biotinilación de moléculas de captura

El conjunto de péptidos lineales y cíclicos mostrado en el Ejemplo 1 también se obtuvo de Polipeptide Laboratories, 365 Maple Avenue, Torrance CA 90503 con un residuo biotina N-terminal, Estos péptidos tenían la siguiente estructura primaria:

Biotina 2-27	Biotina H Q K R G Cit G W S R A A
Biotina 2-29	Biotina H Q R R V Cit G W S R A A
Biotina 2-31	Biotina H Q R R T Cit G G S R A A
Biotina 2-32	Biotina H Q R K W Cit G A S R A A
Biotina 2-36	Biotina H Q F R F Cit G Cit S R A A
Biotina 2-37	Biotina H Q K W R Cit G R S Cit A A
Biotina 2-63	Biotina H Q F R F Cit G W S R A A
Biotina 107-32	Biotina K P Y T V Cit K F M R R P
Biotina 107-35	Biotina A R F Q M Cit H Cit R L I R
Biotina 107-45	Biotina Y S F V W Cit S H A R P R
Biotina 113-30	Biotina A R F Q M R H Cit R L I R
Biotina 218-36	Biotina R N L R L Cit R E R N H A

Biotinilado y Cíclico:

5

Biotina-Cíclico 2-27	Biotina G S Q H C H Q K R G Cit G W S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-29	Biotina G S Q H C H Q R R V Cit G W S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-31	Biotina G S Q H C H Q R R T Cit G G S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-32	Biotina G S Q H C H Q R K W Cit G A S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-36	Biotina G S Q H C H Q F R F Cit G Cit S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-37	Biotina G S Q H C H Q K W R Cit G R S Cit A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 2-63	Biotina G S Q H C H Q F R F Cit G W S R A A C G-NH2
Biotina-Cíclico 107-32	Biotina G S Q H C K P Y T V Cit K F M R R P C G-NH2
Biotina-Cíclico 107-35	Biotina G S Q H C A R F Q M Cit H Cit R L I R C G-NH2
Biotina-Cíclico 107-45	Biotina G S Q H C Y S F V W Cit S H A R P R C G-NH2
Biotina-Cíclico 113-30	Biotina G S Q H C A R F Q M R H Cit R L I R C G-NH2
Biotina-Cíclico 218-36	Biotina G S Q H C R N L R L Cit R E R N H A C G-NH2

Ejemplo 3: Preparación de complejos de molécula de captura utilizando avidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida.

10 Péptidos como se han descrito arriba se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 1 mg/ml. Se mezclaron con un 1 mg/ml de disoluciones de avidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida en PBS en una relación molar de péptido:avidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida de 5:2. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se utilizó inmediatamente. Avidina, estreptavidina, neutravidina y estreptavidina-hidrazida se obtuvieron de Pierce.

15 En un experimento comparativo en el que los péptidos se mezclaron con avidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida en relaciones molares de 1:1, 2:1, 4:1 y 5:2 y se sometieron a ensayo con un conjunto limitado de anticuerpos para RA. La relación molar 5:2 parecía ser óptima. Las otras relaciones todavía proporcionaron resultados aceptables, por lo tanto se concluye que la relación no es crítica y puede ser optimizada para cada complejo de molécula de captura individual. En general, será ventajoso utilizar un exceso molar de péptido o proteína.

20 Ejemplo 4: Preparación de complejos de molécula de captura utilizando anticuerpos monoclonales anti-biotina.

Péptidos biotinilados como se describió anteriormente se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 1 mg/ml. Se mezclaron con una disolución de 1,3 mg/ml de anticuerpo anti-biotina monoclonal obtenido de Jackson Laboratories, fracción de IgG de producto 200-002-096. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se utilizó inmediatamente.

5 Ejemplo 5: inmovilización de complejos de molécula de captura en un soporte sólido.

Complejos de molécula de captura se esparcieron en forma de una línea delgada sobre un soporte sólido utilizando una máquina Kinematic 1600. Los soportes sólidos utilizados fueron membranas Millipore HF075, HF090, HF120, HF135, HF180 y HF240. La tasa de tira era 0,9 ul/cm a una velocidad de 10 cm/s. Las membranas se bloquearon utilizando una disolución de PBS que contenía 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y Pluronic F68 al 1%, un tensioactivo disponible comercialmente. Para ello, toda la tira se pulverizó utilizando una máquina BioDot XYZ 3000 equipada con un cabezal de dispensación de chorro de aire utilizando las siguientes configuraciones: velocidad del lecho 5 cm/s, dispensador 10 ul/s, eje y 20 micrómetros y 0,0. Las membranas se secaron en un ambiente seco a temperatura ambiente (21°C) durante 24 horas y se cortaron en tiras de 5 mm de anchura. La longitud de las tiras era de aproximadamente 30 mm y los complejos de molécula de captura fueron extendidos en tiras a aproximadamente 7 mm desde la parte superior. Los resultados obtenidos con los diversos tipos de membranas fueron esencialmente los mismos. Membranas HF 180 proporcionaron una combinación óptima de propiedades de flujo y sensibilidad/especificidad. Esos resultados se muestran en las tablas 1 - 3, los resultados obtenidos con las otras membranas fueron equiparables, si no idénticos.

Ejemplo 6: Realización de un inmunoensayo, es decir un ensayo de flujo lateral

20 Una almohadilla absorbente se fijó a la parte superior de la tira y la parte inferior de la tira se colocó en un recipiente de reacción Eppendorf de 1,5 ml que contenía 75 ul de disolución de anticuerpos. Se permitió que la disolución de anticuerpos migrara completamente a la tira. La tira se colocó después en otro recipiente que contenía 75 ul de una disolución de conjugado y se dejó que una corriente de fluido alcanzara la almohadilla absorbente. Esto se dejó continuar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

25 Disoluciones de anticuerpo se prepararon mezclando 15 ul de plasma humano con 60 ul de PBS/BSA al 1%. Se utilizaron cuatro muestras de plasma humano diferentes:

- 30
- a) Plasma humano normal, no reactivo
 - b) Plasma de artritis reumatoide de bajo título
 - c) Plasma de artritis reumatoide de título medio
 - d) Plasma de artritis reumatoide de alto título.

35 Las muestras de plasma se derivaron de una tanda patrón obtenida de Trina International Nanikon en Suiza. Cat. N° DA 1708. Plasma de alto título se preparó diluyendo el plasma de la tanda patrón en plasma humano normal hasta obtener un título de 1600 unidades/ml cuando se mide en el Kit de Ensayo EuroDiagnostica Immunoscan RA anti CCP; EuroDiagnostica BV Amhem, Países Bajos, Cat. N° RA-96RT. Plasma de título medio se obtuvo diluyendo el plasma de alto título hasta obtener un título de 400 unidades/ml, el plasma de bajo título se obtuvo por dilución adicional en el plasma humano normal hasta obtener un título de 25 unidades/ml.

Disolución de conjugado se preparó mezclando 30 ul de un conjugado de oro obtenido de British Biocell International (BBI); conjugado de IgG oro anti-humano Cat.N°: BA.GAHL 40 con 70 ul de tampón de desarrollo. El tampón de desarrollo utilizado consistía en PBS con BSA al 1%.

40 La intensidad del color de la línea en cada uno de los dispositivos se determinó utilizando una escala visual ("escala Rann") que va desde 0-11, en donde 0 representa ausencia de color y 11 representa el color más intenso. La escala RANN se utiliza como un comparador, en donde la intensidad de señal de ensayo se compara con la intensidad de escalas RANN equivalente y se le asigna un valor para fines de registro del resultado. La tarjeta de puntuación RANN consiste en 5 líneas con intensidad variable que oscila desde muy leve a muy intensa. Los extremos de la tarjeta corresponden a intensidades de línea de 1 y 10. Si la intensidad de una línea de ensayo está por debajo de la línea de menos intensidad en la tarjeta de puntuación, la intensidad de la línea de ensayo se puntúa como 0. Si la intensidad de una línea de ensayo iguala a la línea de menos intensidad en la tarjeta de puntuación, la intensidad de la línea de ensayo se califica como 1. Si la intensidad de una línea de ensayo se encuentra entre la línea menos intensa y la siguiente línea intensa en la tarjeta de puntuación, la intensidad de la línea de ensayo se califica como 2, y así sucesivamente. La puntuación máxima obtenible era 11, lo que significa más intensa que la línea más intensa en la tarjeta de puntuación de RANN.

La intensidad de las tiras en cada una de las zonas de ensayo que se obtuvo con los materiales descritos anteriormente se resume en las Tablas 1-3.

Tabla 1: Puntuación RANN de líneas de ensayo obtenida con las diversas moléculas de captura y complejos de moléculas de captura de acuerdo con la técnica anterior.

Péptido	lineal	cíclico	Biotina Lineal	Biotina Cíclica	BSA Lineal	BSA Cíclico
2-27	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/1/4	1/0/0/4
2-29	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/1/2/4	2/4/4/4
2-31	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	3/3/3/4	2/2/5/5
2-32	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	2/2/2/4
2-36	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/2/3	0/0/3/3
2-37	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/0	2/2/3/3	1/0/0/0
2-63	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/2	0/0/2/4
107-32	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	1/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/3
107-35	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/4	0/0/0/0
107-45	0/0/0/0	2/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0	2/0/0/3	1/0/0/0
113-30	0/0/0/0	0/0/0/0	0/0/0/1	0/0/0/0	0/0/0/3	0/0/2/4
218-36	0/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0	1/0/0/0	0/0/0/0

Tabla 1: Puntuación RANN de suero humano normal/título bajo/título medio/muestras de plasma de título alto obtenidas con tiras de ensayo que portan las moléculas de captura y complejos de molécula de captura según se indica.

Tabla 2: Puntuación RANN de líneas de ensayo obtenida con las diversas moléculas de captura y complejos de moléculas de captura de acuerdo con la invención en comparación con conjugados de BSA lineales de la técnica anterior. Se muestran los resultados con péptidos lineales.

Péptido	BSA Lineal	Péptido de avidina-biotina	Péptido de estreptavidina-biotina	Péptido de neutravidina-biotina	Péptido de estreptavidina-hidrazida-biotina	Péptido de anticuerpo-biotina
2-27	0/0/1/4	0/2/4/4	0/2/4/6	0/2/4/6	0/2/4/4	1/0/1/4
2-29	0/1/2/4	0/2/4/4	0/1/4/6	0/2/4/4	0/2/4/4	2/4/4/4
2-31	3/3/3/4	0/2/3/3	0/2/4/6	0/2/3/5	2/2/2/3	2/2/5/5
2-32	0/0/0/0	0/2/3/3	0/2/3/6	0/2/3/4	0/2/2/3	2/2/2/4
2-36	0/0/2/3	0/2/3/3	0/2/4/6	0/2/3/6	0/1/3/3	0/0/3/3
2-37	2/2/3/3	1/2/4/6	0/2/3/6	0/2/4/6	1/2/5/6	1/0/1/0
2-63	0/0/0/2	0/2/4/6	0/3/4/6	0/2/4/6	0/2/2/6	4/0/2/4
107-32	0/0/0/0	0/2/2/4	0/1/2/7	0/2/2/2	0/2/2/2	1/0/0/3
107-35	0/0/0/4	1/2/2/3	0/1/2/4	0/2/2/3	2/2/2/3	0/0/0/0
107-45	2/0/0/3	0/2/3/6	0/1/2/4	0/2/3/6	0/2/3/6	1/0/0/0
113-30	0/0/0/3	1/2/4/4	0/1/1/4	1/2/4/4	1/2/4/4	4/0/2/4
218-36	1/0/0/0	1/2/4/6	0/1/2/2	1/2/4/6	1/2/4/6	0/0/0/0

Tabla 2: Puntuación de RANN de muestras de plasma de suero humano normal/título bajo/título medio/título alto obtenidas con tiras de ensayo que portan las moléculas de captura y complejos de moléculas de captura de acuerdo con la invención según se indica.

Tabla 3: Puntuación RANN de líneas de ensayo obtenida con las diversas moléculas de captura y complejos de moléculas de captura de acuerdo con la invención en comparación con los conjugados de BSA. Los resultados se muestran con péptidos cíclicos.

Péptido	BSA Cíclico	Péptido de avidina-biotina	Péptido de estreptavidina-biotina	Péptido de neutravidina-biotina	Péptido de estreptavidina-hidrazida-biotina	Péptido de anticuerpo-biotina
2-27	1/0/0/4	0/2/4/7	0/2/6/11	0/2/4/8	1/2/6/8	1/0/0/8
2-29	2/4/4/4	0/2/4/7	0/1/6/10	0/2/4/8	0/2/6/6	3/4/4/8
2-31	2/2/5/5	0/0/5/6	0/2/6/9	0/2/3/7	0/2/6/8	2/2/5/8
2-32	2/2/2/4	0/2/5/6	0/2/6/9	0/2/3/6	1/2/5/7	3/2/2/4
2-36	0/0/3/3	0/2/5/8	0/2/5/9	1/2/3/7	0/1/7/7	3/0/3/3
2-37	1/0/0/0	0/2/5/9	0/2/5/9	0/2/4/8	1/2/5/8	1/0/8/8
2-63	0/0/2/4	0/2/5/9	0/2/7/11	0/2/4/9	0/2/2/8	4/0/8/6
107-32	0/0/0/3	0/2/2/6	0/1/4/9	0/2/2/9	0/2/8/8	1/2/6/6
107-35	0/0/0/0	1/2/2/7	0/1/4/9	0/2/2/9	1/2/3/5	0/2/2/7
107-45	1/0/0/0	0/0/3/7	0/1/2/8	0/2/3/9	0/2/3/8	1/3/4/6
113-30	0/0/2/4	0/2/4/8	0/1/3/8	0/2/4/6	1/2/4/8	4/0/2/4
218-36	0/0/0/0	1/2/4/7	0/1/4/8	0/2/4/6	1/2/4/8	0/2/2/6

Tabla 3: Puntuación de RANN de muestras de plasma de suero humano normal/título bajo/título medio/título alto obtenidas con tiras de ensayo que portan las moléculas de captura y complejos de moléculas de captura de acuerdo con la invención según se indica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la inmovilización de una molécula de captura sobre un soporte sólido, en el que la molécula de captura se une covalentemente a una molécula de biotina para obtener una molécula de captura biotinilada y en el que la molécula de captura biotinilada se pone en contacto primero con un miembro de unión para formar un complejo de molécula de captura, en el que el complejo se pone en contacto con el soporte sólido.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el miembro de unión es un miembro de unión de alta afinidad seleccionado del grupo que consiste en avidina, captavidina, estreptavidina, neutravidina o estreptavidina-hidrazida o derivados de las mismas.
3. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la molécula de captura es una molécula pequeña.
- 10 4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 3, en el que la molécula de captura es un péptido.
5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 4, en el que la molécula de captura es un antígeno reactivo con anticuerpos obtenidos de pacientes que padecen artritis reumatoide.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la molécula de captura es un péptido citrulinado cíclico.
7. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que el soporte sólido es una membrana de nitrocelulosa.
- 15 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el soporte sólido es una membrana de flujo rápido.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la membrana se selecciona del grupo que consiste en Millipore HF075, HF090, HF120, HF135, HF180 o HF240 o membranas con propiedades de flujo equiparables o equivalentes.
- 20 10. Un soporte sólido con un complejo de molécula de captura inmovilizado sobre el mismo, obtenido mediante el método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9.
11. Inmunoensayo para la detección de anticuerpos o antígenos que comprenden un soporte sólido de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 11 para la detección de anticuerpos específicos para la artritis reumatoide.
- 25 13. Inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde un péptido citrulinado cíclico está inmovilizado sobre el soporte sólido.

Figura 1

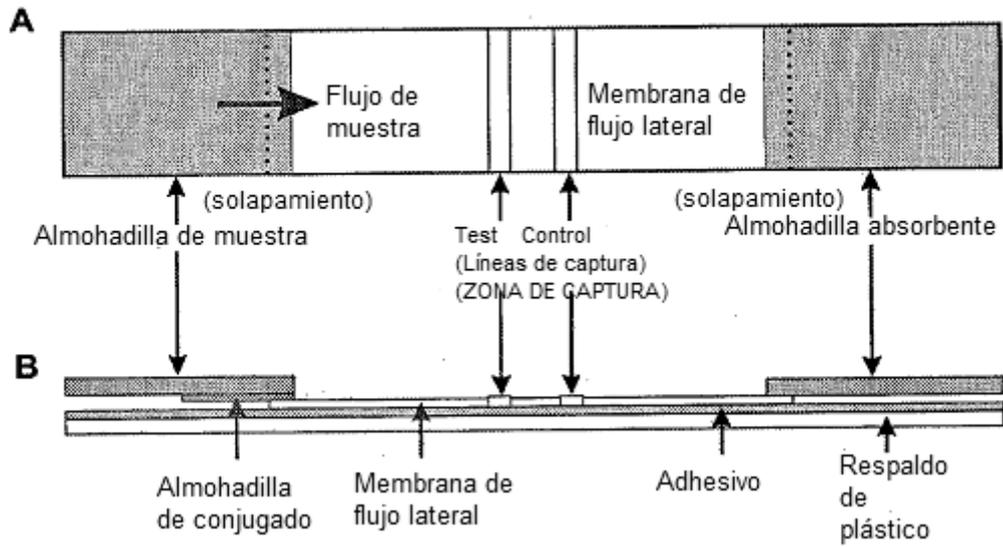


Figura 2

