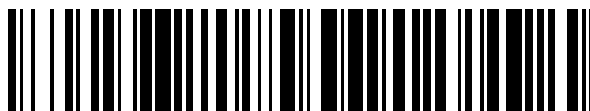


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 931**

51 Int. Cl.:

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12775854 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2756312**

54 Título: **Reactivo y método de calibración**

30 Prioridad:

14.09.2011 SE 1150834

14.09.2011 US 201161534578 P

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

16.09.2016

73 Titular/es:

PHADIA AB (100.0%)

Box 6460

751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

ELFVERSON, GÖRAN;

MATSSON, PER y

NYSTRAND, MATS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 931 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

Reactivo y método de calibración

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de análisis multiplex, y más específicamente a un sistema analítico multiplex, a un método para calibrar análisis multiplex y a un reactivo de calibración.

Antecedentes de la invención

10 En análisis singleplex un analito es el componente químico medido en un procedimiento analítico. En inmunoanálisis, el analito es un anticuerpo o un antígeno. Los anticuerpos son proteínas de la sangre que son producidas por el sistema inmunitario para la protección contra cuerpos extraños, mientras que los cuerpos extraños son los antígenos. Los anticuerpos se unen a los antígenos. Los antígenos o los anticuerpos se marcan antes del análisis, con el fin de dar una señal medible. Este marcador puede ser una enzima, un isótopo radiactivo o fluoresceína. Las señales obtenidas a partir de un inmunoanálisis pueden ser radiactividad o emisión de luz. Estas señales se llaman comúnmente respuestas. El inmunoanálisis implica reacciones químicas entre las muestras clínicas obtenidas de pacientes y reactivos (es decir, soluciones químicas) realizadas en condiciones normalizadas. El resultado es una respuesta que está relacionada con la concentración del analito en la muestra. En inmunoanálisis competitivo, el analito está sin marcar y compite con moléculas marcadas. La respuesta es entonces una función decreciente de la concentración de analito. En inmunoanálisis no competitivo las moléculas marcadas se unen al analito, y la respuesta es una función creciente. En cualquiera de los casos, se necesita estimar la relación exacta entre respuesta y concentración. Esta estimación se denomina calibración. Para la calibración, se requieren muestras con concentraciones conocidas. Estas muestras específicas se denominan calibradores o patrones, y se suelen preparar con antelación. Por ejemplo, una sola muestra con una alta concentración conocida se puede disolver en agua o suero animal para producir calibradores con unas concentraciones menores poco especificadas que cubren la gama de medición. Cuando se habla de diseño estadístico para la calibración, las concentraciones de los calibradores especificados se denominan puntos de diseño. Debido a que los calibradores están especialmente preparados, pero las muestras no lo están, los calibradores y las muestras clínicas pueden reaccionar de formas ligeramente diferentes. Por lo general, un conjunto de muestras clínicas con concentraciones desconocidas se analiza junto con los calibradores en una serie de análisis. Una curva de calibración se ajusta a las respuestas de los calibradores. Esta curva puede ser una línea recta o alguna otra función monótona. Las respuestas de las muestras clínicas se transforman en estimaciones de concentración mediante la curva de calibración ajustada. Este método para estimación de las concentraciones de las muestras se denomina predicción inversa. Debido a que la relación entre la respuesta y la concentración puede cambiar de una serie de pruebas a otra, los calibradores se incluyen a menudo en cada serie de análisis, de modo que cada uno puede calibrarse por separado. Sin embargo, en algunos sistemas, se supone que la relación es estable, por lo que la calibración se debe realizar con menos frecuencia, por ejemplo, sólo una vez al mes o cuando nuevos lotes de reactivos se tienen en uso (Forkman J., Tesis Doctoral, Universidad Sueca de Ciencias Agrónomas, Uppsala, 2008, ISSN 1652-6880, ISBN 978-91-86195-13-7).

40 Se conocen en la técnica los análisis multiplex, mediante los cuales se detectan analitos de múltiples especificidades en una única muestra de ejemplo utilizando una única mezcla de reacción de reactivos. Un componente importante de estos análisis es el sistema de calibración utilizado para definir el nivel de reactivo es decir, anticuerpo o biomarcador que se mide por el análisis. Clásicamente, estos niveles se publicaron empleando un número de unidades arbitrarias, en función del grado de cuantificación proporcionado por el sistema analítico. En los análisis cualitativos, la molécula objetivo en la muestra de suero se señala como positiva o negativa en función del nivel de la señal de respuesta medida, en comparación con un nivel umbral positivo preasignado. En una serie de análisis semicuantitativos, ambos resultados positivo/negativo, la magnitud de la señal medida (p. ej., unidades luminiscentes [LU], milivoltios [mVolts]), la puntuación de la clase, los recuentos ajustados o normalizadas (a partir de sistemas de puntuación modificados), o se publicó el porcentaje del control más bajo (sistema de puntuación alternativo). La magnitud de la señal está relacionada desde el punto de vista de orden de posición con (pero no de manera constante directamente proporcional a) la cantidad de la molécula presente en el suero de análisis.

Aquí vamos a ejemplificar con tres tipos diferentes de pruebas de análisis multiplex conocidas en la técnica:

- 1) Análisis de IgE específica;
- 50 2) Análisis de IgG específica; y
- 3) Análisis de biomarcadores distintos de inmunoglobulina (antígenos).

Los métodos de análisis corrientes para inmunoglobulinas específicas son: 1) análisis de IgE específicos para detectar alergia/hipersensibilidad, y 2) análisis de IgG específico para detectar, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades infecciosas. Los antígenos relevantes de enfermedades se depositan sobre un chip en lugares definidos. Estos antígenos se exponen a una muestra de paciente incluidas las inmunoglobulinas

que pueden unirse a un antígeno seleccionado. La inmunoglobulina específica se detecta con un reactivo específico de inmunoglobulina (molécula informadora) que interactúa con la inmunoglobulina específica, y esta interacción se puede analizar mediante el sistema de detección. Es posible por lo tanto detectar todas las diferentes inmunoglobulinas específicas para un determinado antígeno. Para el tipo de prueba 3), el análisis de biomarcadores (antígenos) no de inmunoglobulina, tales como biomarcadores de cáncer de próstata en el suero, moléculas que tienen capacidad para unirse a los biomarcadores de interés se depositan sobre un chip en lugares definidos. Las moléculas depositadas pueden ser por ejemplo anticuerpos específicos para biomarcadores, enzimas u otras moléculas que son complementarias a los biomarcadores de interés. Las moléculas depositadas se exponen a una muestra de paciente incluidos biomarcadores que pueden unirse a una molécula depositada seleccionada. El biomarcador específico se detecta con un reactivo específico de biomarcadores (molécula informadora) que interactúa con el biomarcador específico, y esta interacción se puede analizar mediante el sistema de detección.

Por ejemplo, en el campo de la detección específica de IgE, la patente WO2002029415 A1 describe un método para la detección de una inmunoglobulina específica de alérgenos en una muestra, y un método para el diagnóstico *in vitro* de alergias en un individuo. Las manifestaciones clínicas tales como asma, fiebre del heno, eccema atópico y síntomas gastrointestinales se desarrollan después de la exposición a alérgenos específicos. La determinación del patrón de sensibilización a componentes alérgenos específicos y/o reactivas cruzar ayuda a una evaluación más detallada del paciente alérgico.

Los inmunoanálisis de anticuerpos IgE disponibles en el mercado pueden clasificarse en un análisis cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo, dependiendo del grado para el que el resultado del análisis refleja con exactitud la cantidad de anticuerpo IgE en la muestra de prueba y los requisitos de precisión del análisis. Dichos inmunoanálisis miden tradicionalmente cualquiera de las concentraciones de IgE total en el suero o de las concentraciones de IgE específicas de alérgeno.

Sin embargo, aunque diferentes plataformas tecnológicas publican sus resultados de IgE en clases o unidades aparentemente idénticas, los estudios han demostrado diferencias entre las plataformas tecnológicas en la capacidad para detectar actividad total de IgE y específica de IgE (Wood R. A. *et al.*, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2007, 99: 34-41).

Los análisis cuantitativos de anticuerpos IgE emplean los métodos más avanzados de calibración de análisis. La finalidad de la parte de calibración del análisis cuantitativo es definir la relación dosis-respuesta del análisis para que los resultados de la respuesta obtenidos mediante el análisis de los sueros de los pacientes puedan ser interpolados en dosis individuales que se relacionan con la cantidad relativa de anticuerpo IgE en el suero. Tanto los métodos de interpolación homólogos como heterólogos se han utilizado con éxito. El procedimiento de interpolación homóloga fomenta el paralelismo general de análisis y maximiza el margen de trabajo del análisis utilizando el mismo alérgeno en fase sólida durante todo el análisis, y construyendo una curva de calibración con el anticuerpo IgE humano de la misma especificidad del alérgeno como debe detectarse en los sueros de prueba. En general, la mezcla de suero de referencia que contiene anticuerpos IgE se diluye de la misma manera que la IgE del suero de prueba, asegurando así el paralelismo del análisis. La principal limitación de este método es la necesidad de cantidades de de litro de mezclas de suero humano que contienen anticuerpo IgE específico para cada especificidad de alérgeno a ensayar. Es difícil mantener un banco de suero que pueda suministrar estas grandes cantidades de suero humano de una manera reproducible entre lotes, especialmente para las especificidades de los alérgenos menos comunes. Debido a las restricciones impuestas a los análisis que utilizan la calibración de interpolación homóloga como resultado de las mezclas de suero humano limitadas que contienen anticuerpos IgE, se ha adoptado la interpolación heteróloga de una curva de calibración total IgE como estrategia de calibración para análisis cuantitativos de anticuerpos IgE el presente día lo que implica cientos de diferentes especificidades de alérgenos. El sistema de interpolación heteróloga se ha convertido en norma industrial. En el sistema de interpolación heteróloga, una curva de calibración de IgE en suero completo se ejecuta simultáneamente con la parte de IgE específica del alérgeno del análisis, usando un calibrador de IgE que es traceable con la Norma OMS 75/502 (características de rendimiento analítico I/LA20-A2 y utilidad clínica de análisis inmunológicos para anticuerpos de inmunoglobulina E (IgE) humana y especificidades de alérgenos definidas; directrices aprobadas, ISBN n° 1-56238-695-6).

ImmunoCAP ISAC® es una prueba de diagnóstico *in vitro* que utiliza la tecnología de chip. Permite la medición simultánea de moléculas específicas en una sola prueba, usando sólo unos pocos µl de líquido, p. ej. muestra de suero o plasma. Se puede utilizar para el análisis de cualquier biomarcador, como IgE, IgG y biomarcadores que no son de inmunoglobulina (antígenos).

Por ejemplo, en caso de analizar anticuerpos IgE específicos utilizando ImmunoCAP ISAC®, un chip de IgE específica (sIgE) ofrece resultados de más de cien componentes de más de 50 fuentes de alérgenos. Los componentes alérgenos que están inmovilizados sobre un sustrato sólido en un formato de chip reaccionan con la IgE específica en la muestra del paciente. Después de lavar la IgE inespecífica, se añade anticuerpo anti-IgE humana marcada con fluorescencia para formar un complejo. Después de la incubación, los anticuerpos anti-IgE humanos marcados con fluorescencia no unida se eliminan por lavado. El procedimiento se sigue por medición de la

fluorescencia utilizando un escáner de chip apropiado. Cuanto mayor sea el valor de respuesta, más presente está en la muestra la IgE específica.

5 Los resultados del análisis se analizan con el programa informático de análisis por imagen de chip Phadia® (MIA) y se calculan unidades normalizadas ISAC para la IgE específica (ISU-E) (chips de proteínas para el diagnóstico de enfermedades alérgicas: estado de la técnica y el desarrollo futuro, Clinical Chemical Laboratory Medicine, volumen 43, número 12, páginas 1321-1326).

Los resultados se presentan de forma semicuantitativa en cuatro clases (0 = indetectable o muy baja, 1 = baja, 2 = moderada a alta, 3 = muy alta). El programa informático Phadia MIA realiza automáticamente este cálculo.

10 La calibración de un chip de ADN ImmunoCAP ISAC® se hace frente a una preparación de referencia interna o el reactivo de calibración, y las concentraciones de anticuerpos IgE medidas se expresan como unidades arbitrarias; unidades ISAC normalizadas para IgE (ISU-E). La preparación interna de referencia ImmunoCAP ISAC® se calibra contra ImmunoCAP IgE específica (con concentraciones de anticuerpo expresadas en unidad kilo de IgE por litro; kU_A/l), que está normalizada frente a la preparación de referencia 75/502 de la OMS para IgE (Hamilton R. G., Assessment of human allergic diseases. En: Clinical Immunology, Principles and Practice, ed. Rich R. R., 3^a ed., 2008, págs. 1471-84; véase la página 1476).

15 ImmunoCAP ISAC® también puede utilizarse de manera similar para analizar la IgG específica y/o otros biomarcadores (antígenos y anticuerpos).

20 Los presentes sistemas de calibración incluyen normalmente la calibración independiente de cada antígeno para con el correspondiente anticuerpo específico. Esto puede ilustrarse por la detección Bioplex ANA de Biorad, que utiliza el flujo de inmunoanálisis multiplex, y que detecta la presencia de autoanticuerpos circulantes clínicamente relevantes en suero o plasma. Al mismo tiempo, este es un ejemplo del segundo tipo de análisis multiplex como se mencionó anteriormente, es decir, el análisis de la IgG específica. El sistema Bioplex utiliza un formato de análisis multiplex basado en granos y el proceso de calibración se describe a continuación: *"Si bien la identidad de los granos teñidos se determina por la fluorescencia de los colorantes, la cantidad de anticuerpo captado por el antígeno se determina por la fluorescencia de la FE unida" (es decir, ficoeritrina; la molécula de detección fluorescente). "El dato en bruto se calcula en intensidad relativa de fluorescencia (IRF) y relación de fluorescencia (RF). Tres granos teñidos más, el grano patrón interno (GPI), el grano de verificación del suero (GVS) y un grano blanco (GB) están presentes en cada mezcla de reacción para verificar la respuesta del detector, la adición de suero o plasma al recipiente de reacción y la ausencia de unión inespecífica significativa en el suero o el plasma. Para más información consultar el Manual de Operación del Sistema BioPlex 2200. El instrumento se calibra utilizando un conjunto de seis (6) viales calibradores distintos, suministrado por separado por Bio Rad Laboratories. Para la calibración cuantitativa de ADN bicatenarios, se utilizan seis (6) viales, que representan seis (6) niveles diferentes de concentraciones de anticuerpos, y los resultados de las muestras de pacientes se expresan en UI/ml. Los resultados de sA UI/ml son negativos, 5-9 UI/ml son indeterminados y los resultados de 10 UI/ml o mayores se consideran positivos para anticuerpos ADN bicatenarios. Para los otros doce (12) granos, para la calibración semi-cuantitativa se utilizan cuatro (4) viales que representan a cuatro (4) concentraciones diferentes de anticuerpos. El resultado para cada uno de estos anticuerpos se expresa como un índice de anticuerpo (IA). Un IA de 1,0 indica una concentración límite de anticuerpo que corresponde a aproximadamente el percentil 99º de los valores obtenidos a partir de una población no enferma; resultados de 1,0 o superiores se describen como positivos. Resultados de <1,0 se describen como negativos"* (Biorad, Bioplex 2200 Ana Screen SIO(k) Summary, FDA 510(k), SIO(k) número k041658).

45 El tercer tipo de análisis multiplex incluye el análisis de biomarcadores (antígenos) distintos de inmunoglobulina, p. ej., biomarcadores de cáncer de próstata. Este es un ejemplo en el que un inmunoanálisis singleplex tradicional se convierte en un formato multiplex. Esto se ha ejemplificado mediante varios análisis basados en granos, así como multiplexación limitada utilizando diversas matrices sólidas. En todos estos análisis es esencial que cada prueba se calibre por separado, lo que tiende a volverse tedioso y engorroso cuando se ejecutan formatos multiplex.

50 Beckman Coulter describe la calibración de su análisis de Access Hybritech free PSA, que es un análisis de la forma libre del biomarcador PSA del cáncer de próstata, como un conjunto de 5 puntos patrón diferentes y una muestra negativa totalizando 6 intervalos de calibración diferentes. También es evidente que las concentraciones de PSA libre dependen del patrón utilizado para calibrar el análisis (Beckman Coulter, Inc., 2010, A85087C, Access Hybritech free PSA).

55 En la actualidad, como se describió anteriormente, la calibración de los inmunoanálisis para la detección de diferentes tipos de moléculas por lo general necesita ejecutar varias muestras de calibración para cada análisis, incluidas muestras de calibración de diferentes concentraciones y muestras de calibración que contienen diferentes moléculas de calibrador. En consecuencia, dicha técnica de calibración es lenta y puede ser imprecisa debido a la variabilidad sistemática del sistema analítico en el tiempo.

El objeto de la presente invención es proporcionar un preparado de referencia o un reactivo de calibración que elimina o al menos reduce los problemas mencionados anteriormente conectados a las técnicas actualmente conocidas.

Breve descripción de los dibujos

5 Las fig. 1A y B muestran curvas de calibración obtenidas por la realización del análisis ImmunoCAP ISAC® sIgE en un reactivo de calibración que comprende 15 diferentes anticuerpos híbridos según el Ejemplo 1 (a continuación). Los cuatro puntos de calibración se encuentran en 1,0, 4,0, 15,0 y 50 ISU-E. Las curvas de calibración dan la correlación entre la intensidad de la fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para la IgE específica (ISU-E), unidades arbitrarias (eje x). Los puntos representados en el diagrama
10 representan los puntos de calibración. En la fig. 1A, la ecuación utilizada es $y = x + 6,22$ $R^2 = 1,00$. En la fig. 1B, la ecuación utilizada es $\ln(FI) = 5,87 + 1 \cdot \ln(\text{ISU-E})$ $R^2 = 0,99$.

Las fig. 2A y B muestran gráficos de correlación para diferentes componentes alérgenos, donde se ha utilizado un reactivo de calibración según el Ejemplo 1 (a continuación) para el cálculo de los valores ISU-E. La línea recta simboliza un gráfico de ajuste doble logarítmico transformado. Los puntos negros representan en la figura
15 anticuerpos IgE específicos para Phi p 5 (fig. 2A) y para Bet v 1 (fig. 2B), respectivamente, detectados en muestras de pacientes ejecutadas en el análisis ImmunoCAP ISAC® sIgE y en comparación con el método de referencia, análisis ImmunoCAP sIgE. La fig. 2A muestra un gráfico de correlación para el componente alérgeno Phi p 5. Ajuste bivariable de ISU/chipplot por kUA/l Phi p 5. $\text{Log}(\text{ISU/chipplot}) = 0,1735344 + 0,8732028 \cdot \text{log}(kUA/l)$. La fig. 2B muestra un gráfico de correlación para el componente alérgeno Bet v 1. Ajuste bivariable de ISU/chipplot por kUA/l Bet v 1. $\text{Log}(\text{ISU/chipplot}) = 0,4851362 + 0,8967003 \cdot \text{log}(kUA/l)$.

La fig. 3 muestra cinco curvas de calibración obtenidas al realizar el análisis ImmunoCAP ISAC® sIgG cinco veces en un reactivo de calibración que comprende cinco sueros humanos combinados de pacientes con artritis reumatoide, según el Ejemplo 2 (más adelante). Las curvas de calibración dan la correlación entre la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para IgG específica, unidades arbitrarias (eje x) en un gráfico doble logarítmico. Las flechas en la figura representan los intervalos/puntos de calibración específicos
25 seleccionados.

La fig. 4 muestra valores promedio de la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para IgG específica, unidades arbitrarias (eje x) en un gráfico ln/ln, basado en los resultados que se muestran en la fig. 3.

30 La fig. 5 muestra cinco curvas de calibración obtenidas al realizar el análisis de biomarcadores de antígenos ImmunoCAP ISAC® en un reactivo de calibración que comprende cinco biomarcadores antigénicos diferentes para cáncer de próstata, según el ejemplo 3 (más adelante). Las curvas de calibración dan la correlación entre la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para los biomarcadores antigénicos, unidades arbitrarias (eje x). Cuatro intervalos de calibración diferentes, divididos por líneas de puntos finas, se representan en la figura. La flecha de puntos en negrita en diagonal representa un promedio calculado basado en la interrelación entre los 20 puntos patrón. Las flechas delgadas que se extienden entre las curvas de calibración y la flecha de puntos en negrita ilustran que cada curva de calibración independiente de intervalo dinámico y el intervalo de concentración pueden describirse en función de, en este caso, los 20 puntos patrón diferentes.

Términos

40 Todos los términos utilizados en la presente memoria se pretende que tengan el significado que se les suele dar en la técnica. En aras de la claridad, algunos términos se describen a continuación.

Un "análisis multiplex" se interpretará en el sentido de un procedimiento por el cual se detectan analitos de múltiples especificidades y, en algunos casos, se cuantifican en una sola muestra de suero usando una sola mezcla de reacción de reactivos. Por ejemplo, un análisis multiplex sería el que mide anticuerpos IgE para múltiples especificidades de alérgenos usando una sola etapa de reacción. Un ejemplo de un análisis multiplex de IgE es un análisis con chip de ADN en la que cada uno de los alérgenos purificados (a menudo recombinados en la naturaleza) se adsorben sobre puntos por triplicado en un microchip de silicio. La incubación de una pequeña cantidad de suero con el chip de ADN expone el suero de un paciente a muchas especificidades diferentes de alérgenos de una vez. Después de un lavado con tampón para eliminar las proteínas séricas no unidas, la IgE unida se detecta entonces con conjugado de anti-IgE humana y adición posterior de sustrato.
50

La expresión "agente captador" se interpreta como una molécula capaz de unir directa o indirectamente un analito de interés. Un agente captador puede ser un antígeno, tal como un alérgeno cuando el analito es anticuerpos IgE.

Una "molécula de detección" se define como una estructura con dos características esenciales, es decir, 1) tiene capacidad para unirse específicamente a un agente captador, y 2) tiene una característica detectable común. Ejemplos de moléculas de detección son: un anticuerpo con una región variable y una constante, un aptámero
55

5 consistente en ADN, pero con una estructura de unión definida, una bacteria con un antígeno de superficie que se une y que contiene ADN, que pueden etiquetarse y detectarse. Se conocen anticuerpos específicos para IgE humana para ser utilizados como moléculas de detección en análisis de anticuerpos IgE totales y específicos de alérgeno. Estos reactivos clave confieren la especificidad en los análisis, y por lo tanto deben ser muy específicos para determinantes únicos en cadenas pesadas épsilon. Una vez purificados, los anticuerpos reactivos de anti-IgE humana policlonales o monoclonales se utilizan ya sea directamente como un anticuerpo en fase de solución o sometidos a modificación química en forma de marcado radiactivo, marcaje enzimático o inmovilización química y física en matrices en fase sólida.

10 Según la presente invención, una "molécula de unión" se interpreta en el sentido de una molécula que tiene dos características esenciales, es decir, 1) capacidad para unirse específicamente a un agente captador, y 2) capacidad para unirse a una molécula de detección. Las inmunoglobulinas y fragmentos de los mismos son ejemplos de dichas moléculas de unión. Otros ejemplos incluyen receptores celulares, receptores solubles y sus ligandos, y otros biomarcadores de péptidos y biomarcadores de proteínas, tales como biomarcadores antigénicos.

Compendio de la invención

15 La presente invención resuelve los problemas mencionados anteriormente relacionados con la calibración de los análisis multiplex para la detección de moléculas de unión, tales como inmunoglobulinas solas y/o en combinación con otras moléculas de unión.

La presente invención proporciona un método para calibrar un análisis multiplex, que comprende:

20 añadir un reactivo de calibración a una fase sólida sobre la que están inmovilizados un gran número de agentes captadores,

lavar opcionalmente la fase sólida para eliminar el reactivo de calibración no unido,

añadir una molécula de detección que tiene capacidad para unirse al reactivo de calibración,

lavar opcionalmente la fase sólida para eliminar la molécula de detección no unida,

detectar la molécula de detección no unida,

25 creando de ese modo una curva de calibración que comprende un número de puntos/intervalos de calibración, caracterizados por que el reactivo de calibración comprende al menos dos moléculas de unión diferentes, en donde cada molécula de unión tiene capacidad para unirse específicamente a un agente captador inmovilizado sobre la fase sólida y capacidad para unirse a una molécula de detección, y en donde al menos dos de las moléculas de unión están presentes en diferentes concentraciones en el reactivo de calibración, representando de esta manera 30 diferentes puntos/intervalos de calibración de la curva de calibración.

En una realización, los agentes captadores están inmovilizados en una serie de puntos en la fase sólida.

En otra realización, la fase sólida está en forma de granos, en la que los agentes captadores están inmovilizados. Dichos granos pueden estar presentes en una fase líquida.

35 En una realización del método, las moléculas de unión son anticuerpos recombinados, anticuerpos naturales tales como autoanticuerpos o biomarcadores peptídicos o proteínicos como biomarcadores antigénicos.

En una realización más específica del método, las moléculas de unión son anticuerpos híbridos, tales como anticuerpos híbridos de ratón-humanos que comprenden el dominio variable de la cadena pesada de una IgG monoclonal de ratón específica de alérgenos y una cadena pesada de IgE humana.

40 En una realización del método, el gran número de agentes captadores es de al menos 5 diferentes agentes captadores, tales como al menos 10, al menos 50, o al menos 100 agentes captadores diferentes.

En una realización del método, los agentes captadores son componentes alérgenos, tales como componentes alérgenos naturales o recombinados o antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunitarias tales como la artritis reumatoide, o anticuerpos específicos para biomarcadores peptídicos o proteínicos.

45 En una realización del método, la molécula de detección es un conjugado de anti-inmunoglobulina, tal como un conjugado de anti-IgE humana o un conjugado de anti-IgG humana, o es un anticuerpo específico para un biomarcador peptídico o proteínico.

50 En una realización del método, las moléculas de unión son anticuerpos recombinados, preferiblemente anticuerpos IgE híbridos, los agentes captadores son componentes alérgenos, como componentes alérgenos naturales o recombinados, y la molécula de detección es un conjugado de anti-IgE humana.

En otra realización del método, las moléculas de unión son anticuerpos naturales, preferiblemente autoanticuerpos IgG, los agentes captadores son antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas o autoinmunitarias, preferiblemente enfermedades autoinmunitarias, y la molécula de detección es un conjugado de anti-IgG humana.

5 En otra realización más del método, las moléculas de unión son biomarcadores peptídicos o proteínicos, preferiblemente biomarcadores para el cáncer de próstata, los agentes captadores son anticuerpos específicos para dichos biomarcadores peptídicos o proteínicos, y las moléculas de detección son anticuerpos específicos para dichos biomarcadores de péptido/proteína.

10 En una realización del método, el reactivo de calibración comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 moléculas de unión diferentes, tales como anticuerpos recombinados, anticuerpos naturales tales como autoanticuerpos o biomarcadores peptídicos o proteínicos.

15 En una realización más específica del método, el reactivo de calibración comprende al menos 5, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 15 anticuerpos IgE híbridos diferentes, en el que cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.

En una realización del método, el análisis multiplex se lleva a cabo en un chip de ADN.

20 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un sistema analítico multiplex para la detección de una molécula de interés, tal como (a) una inmunoglobulina o (b) un biomarcador peptídico o proteínico presente en una muestra biológica, que comprende:

un recipiente de reacción,

un gran número de agentes captadores inmovilizados sobre una fase sólida,

una molécula de detección, tal como (a) una molécula de detección de anti-inmunoglobulina o (b) una unión de moléculas de detección a un biomarcador peptídico o proteínico,

25 un reactivo de calibración,

un medio tamponante de reacción,

30 caracterizado por que el reactivo de calibración comprende al menos dos moléculas de unión diferentes, en donde cada molécula de unión tiene capacidad para unirse específicamente a un agente captador inmovilizado en la fase sólida y capacidad para unirse a la molécula de detección, y en donde al menos dos de las moléculas de unión están presentes a diferentes concentraciones en el reactivo de calibración.

El recipiente de reacción puede ser en forma de un tubo de plástico (polietileno) o de vidrio, pocillos de placa de microvaloración de plástico, varilla de plástico, tapón de polietileno con una matriz de esponja interna y chip con filamento de hidratos de carbono recubierto de silicona.

35 En una realización, los agentes captadores se inmovilizan en una serie de puntos en la fase sólida. Alternativamente, la fase sólida está en forma de granos en la que se inmovilizan agentes captadores. Dichos granos pueden estar presentes en una fase líquida.

En una realización del sistema, la molécula de interés es (i) un anticuerpo IgE o (ii) un anticuerpo IgG o (iii) un biomarcador peptídico o proteínico para enfermedades tales como el cáncer.

40 En una realización del sistema, la molécula de detección es (i) un conjugado de anti-IgE humana, (ii) un conjugado de anti-IgG humana o (iii) un anticuerpo específico para un biomarcador peptídico o proteínico.

En una realización del sistema, la muestra biológica es una muestra de suero o plasma humano.

En una realización del sistema, el reactivo de calibración comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 moléculas de unión diferentes.

45 En una realización del sistema, las moléculas de unión son anticuerpos recombinados, tales como anticuerpos híbridos, anticuerpos naturales tales como autoanticuerpos o biomarcadores peptídicos o proteínicos.

En una realización del sistema, los agentes captadores son componentes alérgenos, tales como componentes alérgenos naturales o recombinados o antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas, o componentes antigénicos relacionados con enfermedades autoinmunitarias, o anticuerpos específicos para biomarcadores peptídicos o proteínicos.

En una realización del sistema, las moléculas de unión son anticuerpos recombinados, preferiblemente anticuerpos de IgE híbridos, los agentes captadores son componentes alérgenos, tales como componentes alérgenos naturales o recombinados, y la molécula de detección es una anti-IgE humana conjugada.

5 En otra realización del sistema, las moléculas de unión son anticuerpos naturales, preferiblemente autoanticuerpos IgG, los agentes captadores son antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas o autoinmunitarias, preferiblemente enfermedades autoinmunitarias, y la molécula de detección es una anti-IgG humana conjugada.

10 En otra realización más del sistema, las moléculas de unión son biomarcadores peptídicos o proteínicos, preferiblemente biomarcadores para el cáncer de próstata, los agentes captadores son anticuerpos específicos para dichos biomarcadores peptídicos o proteínicos, y las moléculas de detección son anticuerpos específicos para dichos biomarcadores peptídicos o proteínicos.

15 En una realización del sistema, el reactivo de calibración comprende quince anticuerpos IgE híbridos diferentes de ratón-humanos, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.

La presente invención proporciona además un reactivo de calibración que comprende al menos dos anticuerpos híbridos diferentes, en donde cada molécula de unión tiene capacidad para unirse específicamente a al menos uno de los componentes alérgenos enumerados en la Tabla 1 adjunta.

20 En una realización, el reactivo de calibración comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 anticuerpos IgE híbridos de ratón-humanos diferentes.

En otra realización, cada anticuerpo IgE híbrido de ratón-humano del reactivo de calibración tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.

25 En una realización, el reactivo de calibración se consiste en quince soluciones diferentes de anticuerpo IgE híbrido de ratón-humano, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.

El reactivo de calibración según la presente invención puede comprender opcionalmente un conservante, tal como Kathon CG o azida de sodio, u otros conservantes conocidos por el experto en la técnica.

30 La presente invención proporciona además un equipo que comprende un reactivo de calibración descrito anteriormente, que está adaptado para su uso en un método de calibración descrito anteriormente.

Además, la presente invención proporciona un método para producir un reactivo de calibración para un análisis multiplex, que comprende

35 - proporcionar al menos dos moléculas de unión diferentes, en donde cada molécula de unión tiene capacidad para unirse específicamente a un agente captador inmovilizado en una fase sólida del análisis y capacidad para unirse a una molécula de detección,

- ajustar la concentración de dichas moléculas de unión a la gama de medición correspondiente del análisis,

- preparar una mezcla de dichas moléculas de unión,

obteniendo de esta manera un reactivo de calibración.

40 **Descripcion detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método de calibración rápido y preciso y un reactivo de calibración, que comprende una mezcla de moléculas de calibración, incluidos una multitud de antígenos y/o puntos de unión de biomarcadores en una configuración multiplex. Según la presente invención, todas las moléculas de calibración se han combinado en una sola muestra de calibración y se demuestra que se pueden utilizar varias moléculas de unión presentes en la misma solución, incluidas moléculas de unión de diferentes concentraciones, así como de diferentes especificidades.

45 En la actualidad, en una situación frecuente con 6 inmunoanálisis diferentes (moléculas de calibración diana) que requieren 5 concentraciones de calibración cada una requeriría ejecutar el análisis de $6 \times 5 = 30$ análisis diferentes. Utilizando la presente invención, esto se reduce a un mínimo. Además, el análisis de un conjunto de moléculas de calibración combinados presentes en diferentes concentraciones permite la posibilidad de establecer la interrelación relativa entre las diferentes moléculas de unión sin la variabilidad sistema analítico potencialmente sistemático que

puede ser el resultado de los 30 análisis individuales diferentes que se necesita realizar. Esta invención puede reducir de este modo el número de intervalos de concentración necesarios para satisfacer los requisitos de calibración y la calidad requerida en comparación con un análisis singleplex tradicional.

5 La presente invención se describe a continuación con más detalle haciendo referencia a tres realizaciones específicas de la invención:

1) Análisis de anticuerpos IgE específicos, en donde el reactivo de calibración comprende al menos dos anticuerpos IgE híbridos diferentes, cada uno de los cuales tiene una capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno inmovilizado en un chip de ADN que debe calibrarse.

10 2) Detección de autoanticuerpos IgG específicos, en donde el reactivo de calibración comprende al menos dos anticuerpos IgG diferentes, cada uno de los cuales tiene capacidad para unirse específicamente a un componente antigénico (tales como péptidos o proteínas) inmovilizado en un chip de ADN que debe calibrarse.

15 3) Detección de biomarcadores peptídicos o proteínicos, en donde el reactivo de calibración comprende al menos dos biomarcadores peptídicos o proteínicos diferentes. En un chip de ADN que debe calibrarse, los anticuerpos se inmovilizan. Cada uno de dichos anticuerpos es capaz de unirse específicamente a un tipo de los biomarcadores peptídicos o proteínicos.

Ejemplo 1

20 Este método se utiliza para crear una curva de calibración para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgE específicos presentes en individuos alérgicos. El calibrador consiste en una muestra que contiene moléculas de unión en forma de anticuerpos IgE híbridos en un tampón. Cada uno de los anticuerpos IgE híbridos tiene una especificidad diferente, y los anticuerpos IgE híbridos están presentes en diferentes concentraciones en la muestra.

25 Para la preparación de anticuerpos híbridos, se utilizan estirpes celulares de ratón para producir anticuerpos IgG monoclonales. El exón y el intrón para el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal IgG específica para alérgenos se clonan y se insertan en un vector de expresión junto con la secuencia señal y la secuencia codificante de una cadena pesada de IgE humana. El vector de expresión se transforma en una estirpe celular de mieloma Sp 2/0, dando como resultado la expresión de una cadena pesada de IgE humana específica para alérgenos. Las células Sp 2/0 que producen la cadena pesada de IgE se fusionan con una estirpe celular de hibridoma que expresa la cadena pesada y la cadena ligera de IgG, y a partir de la cual el dominio variable se clonó inicialmente. Las células fusionadas, que expresan correctamente un anticuerpo IgE híbrido, que comprende una cadena pesada de IgE humana y una cadena ligera de IgG de ratón, se identifican con ELISA que comprende el alérgeno relevante y un conjugado de anti-IgE. Preferiblemente, para la producción de anticuerpos híbridos se seleccionan solamente los clones celulares que producen exclusivamente anticuerpos IgE y han perdido la capacidad para producir la cadena pesada de IgG.

35 Un método alternativo para la preparación de anticuerpos híbridos comprende transformar un vector de expresión según la descripción anterior directamente en la estirpe celular de hibridoma a partir del cual se clonó inicialmente el dominio variable. Los clones de hibridoma positivos de IgE así creados producirán anticuerpos IgG además de IgE. Los anticuerpos IgE pueden purificarse por cromatografía de afinidad en una columna de anti-IgE (Bohman *et al.* 2007, *Allergy*, vol. 62, suplemento 83, pág. 49).

40 La concentración en una solución de un anticuerpo híbrido así producido y purificado puede determinarse utilizando el análisis ImmunoCAP sIgE, que, como se mencionó anteriormente, está normalizado frente al preparado 75/502 de referencia de la OMS para IgE (Hamilton R. G., véase anteriormente).

Cuando se ha determinado la concentración utilizando el análisis cuantitativo ImmunoCAP sIgE, expresado en kU_A/l, dicha solución de un anticuerpo híbrido luego se ejecuta entonces en el análisis semicuantitativo ImmunoCAP ISAC® sIgE para determinar la concentración del anticuerpo híbrido en dicho análisis, expresada en unidades arbitrarias, ISU-E.

45 Según la presente invención, el análisis ImmunoCAP ISAC® sIgE se calibra utilizando un reactivo de calibración que comprende soluciones de varios anticuerpos híbridos, cuyas concentraciones definidas se han determinado en el sistema ImmunoCAP.

50 Cada anticuerpo híbrido para utilizar en el reactivo de calibración se diluye en un suero agotado de anticuerpos IgE específicos (denominado suero negativo) en el intervalo de medición clínicamente relevante de 0,3-100 ISU-E. 1 kU_A/l corresponde a 2,42 ng sIgE/ml, que se utiliza para calcular el factor de dilución para cada anticuerpo híbrido.

Como alternativa al suero negativo, puede utilizarse un tampón para la dilución de anticuerpos híbridos. Por ejemplo, los tampones utilizados en el análisis ImmunoCAP podrían utilizarse para la dilución, y por lo tanto podrían formar parte del reactivo de calibración según la presente invención.

El valor de ImmunoCAP (kU_A/l) y el valor de ImmunoCAP ISAC® (ISU-E) para un anticuerpo IgE específico, detectados en las muestras de pacientes, pueden representarse uno frente al otro en un gráfico, demostrando que el concepto de calibración híbrida según la presente invención es válido. Dicho gráfico de correlación se ilustra por la línea recta en la fig. 2A y la fig. 2B, respectivamente (kU_A/l en el eje x e ISU-E en el eje y).

5 Un reactivo de calibración según la presente invención se obtiene:

- determinando al menos dos puntos de calibración dentro del intervalo de medición clínicamente aplicable, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro puntos de calibración;
- utilizando al menos un anticuerpo híbrido por punto de calibración, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres o cuatro anticuerpos híbridos;

10 - seleccionando los puntos de calibración de tal manera que todos los puntos de calibración dan más o menos la misma respuesta medida como intensidad de fluorescencia (IF) en el análisis ImmunoCAP ISAC®, es decir, de tal manera que todas las soluciones de anticuerpos híbridos utilizados tengan concentraciones casi iguales.

Como se mencionó anteriormente, el análisis ImmunoCAP ISAC® es semicuantitativo, presentando los resultados en cuatro clases (0 = indetectable o muy bajo, 1 = bajo, 2 = moderado a alto, 3 = muy alto).

15 Cada punto de calibración puede situarse en principio en cualquier lugar en el intervalo de medición. Sin embargo, ya que el análisis es semicuantitativo, conviene seleccionar los puntos de calibración en los puntos finales de al menos algunas de las clases. Los valores ISU-E inferiores a 0,3 pertenecen a la clase 0; los valores ISU-E de 0,3 a 1,0 son de clase 1; la clase 2 indica los valores ISU-E de 1,0 a 15,0; y los valores ISU-E superiores a 15 pertenecen a la clase 3. Preferiblemente, un punto de calibración se encuentra en 1 ISU-E y otro punto de calibración se encuentra en 15 ISU-E.

Además, los puntos de calibración se extienden preferiblemente de manera bastante uniforme en todo el intervalo de medición. Por lo tanto, se eligen dos puntos de calibración más para cubrir las partes restantes del intervalo de medición. Más preferiblemente, dichos otros dos puntos de calibración se encuentran en 4 ISU-E y 50 ISU-E, respectivamente.

25 Un reactivo de calibración según la presente invención se produjo de la forma siguiente. Se utilizaron quince soluciones diferentes de anticuerpos híbridos, cada uno específico para uno de los siguientes alérgenos:

Tabla 2. Anticuerpos IgE híbridos específicos para alérgenos

Anti-Gal d 1 ovomucoide
Anti-Gal d 2 ovoalbúmina
Anti-Phl p1
Anti-Phl p 5
Anti-Bet v 1
Anti-Fel d1
Anti-Der p1
Anti-Der p2
Anti-Amb a1
Anti-Ole e 1
Anti-Art v 1
Anti-Can F1
Anti-Can F2
Anti-Can F5
Anti-Pru p 3

30 Los anticuerpos híbridos específicos para alérgenos en la Tabla 2 fueron los anticuerpos híbridos de ratón-humanos, que comprende cada uno el dominio variable de la cadena pesada de una IgG monoclonal de ratón específica para alérgenos y una cadena pesada de IgE humana.

Las concentraciones de dichas soluciones de anticuerpos se determinaron en primer lugar utilizando el análisis ImmunoCAP (dando valores en kU_A/l), y se comprobaron los valores correspondientes de ISU-E introduciendo las soluciones en el análisis ImmunoCAP ISAC®.

5 Tenían que determinarse cuatro puntos de calibración, utilizando tres o cuatro anticuerpos híbridos para cada punto de calibración, de la forma siguiente:

Punto a, 1,0 ISU-E: Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1.

Punto b, 4,0 ISU-E: Art v 1, Fel d 1, Phl p 1.

Punto c, 15,0 ISU-E: Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2.

Punto d, 50 ISU-E: Can f 2, Can f 5, Phl p 5, Pru p 3.

10 Cada solución de anticuerpo híbrido se diluyó de manera que diese el valor ISU-E deseado mencionado anteriormente (Tabla 3). El medio de dilución utilizado fue suero humano agotado de IgE específica.

Tabla 3. Protocolo de dilución para los anticuerpos IgE híbridos del reactivo de calibración

Lote híbrido ISU	Factor de dilución 1/X
1_Bet v 1_009125	10.114
1_Der p 2_011571	5.088
1_Gal d 1_011534	2.968
1_Ole e 1_006381	6.033
4_Art v 1_009834	1.822
4_Fel d 1_07128	10.602
4_PhI p 1_007121	1.855
15_Amb a 1_06310	1.865
15_Can f 1_009119	1.004
15_Der p 1_007121	948
15_Gal d 2_011583	58
50_Can f 2_009844	344
50_Can f 5_009853	2.513
50_PhI p 5_007132	825
50_Pru p 3_012813	953

15 Después de la dilución individual de cada anticuerpo híbrido, las quince soluciones de anticuerpos híbridos se mezclaron entre sí, obteniendo así un reactivo de calibración según la presente invención.

Se utilizó el reactivo de calibración para crear una curva de calibración según la fig. 1A y la fig. 1B, respectivamente, que presentan la correlación entre la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para IgE específica (ISU-E), unidades arbitrarias (eje x).

20 Cuando se añade el reactivo de calibración a un chip de ADN ImmunoCAP ISAC® sIgE, los quince anticuerpos híbridos descritos anteriormente se unirán a los quince componentes alérgenos, para los que dichos anticuerpos híbridos tienen especificidad. Además, sin embargo, los anticuerpos híbridos también reaccionarán de forma cruzada con otros componentes alérgenos inmovilizados en el chip de ADN, que tienen estructuras similares a cualquiera de los quince componentes alérgenos.

25 Opcionalmente, dichos componentes alérgenos adicionales pueden utilizarse por lo tanto como referencia para el reactivo de calibración, y no habrá necesidad de una muestra de referencia aparte. En este ejemplo, otros tres alérgenos se utilizaron como referencia:

A un nivel bajo de intensidad de fluorescencia (un valor ISU-E inferior a 1,0): Mal d 1 o Acd 8

Nivel moderado (1-15 ISU-E): Der f 1, Pla a 2 o Pla a 3

Nivel alto (> 15 ISU-E): Art v 3

La molécula de detección utilizada en el análisis fue un conjugado de anti-IgE humana.

Ejemplo 2

5 Este método se utilizó para crear una curva de calibración para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG específicos presentes en pacientes que tienen artritis reumatoide (AR). El calibrador consistía en una muestra que contiene moléculas de unión en forma de autoanticuerpos IgG de diferentes especificidades y de diferentes concentraciones. Éste es análogo al calibrador IgE descrito en el Ejemplo 1 anterior, excepto que la muestra consistía en una mezcla de diferentes sueros humanos de pacientes con AR. En este ejemplo, se agruparon los sueros de cinco pacientes diferentes. Sin embargo, podría ser un número menor o mayor de sueros los que se agrupan, siempre que la muestra resultante contenga las diversas especificidades diferentes de anticuerpos IgG que representan a diversas concentraciones que abarcan el número requerido de puntos/intervalos de calibración.

El calibrador AR consistió en cinco sueros diferentes de los siguientes volúmenes:

Suero 1 = 5 µl

Suero 2 = 5 µl

15 Suero 3 = 5 µl

Suero 4 = 10 µl

Suero 5 = 5 µl

Volumen total = 30 µl

La mezcla de suero se diluyó 1:50 en diluyente para el análisis ISAC.

20 Agentes captadores en forma de componentes antigénicos (tales como péptidos o proteínas) relevantes para la AR se inmovilizan en un chip de ADN. En este ejemplo, se inmovilizaron 32 antígenos diferentes (antígenos n^{os} 1-32 en la Tabla 4).

La molécula de detección utilizada en el análisis fue un conjugado de anti-IgG humana.

TABLA 4. Antígenos inmovilizados en el chip de ADN.

Antígeno nº	Unidades arbitrarias
1	38
2	41
3	43
4	47
5	88
6	93
7	97
8	98
9	101
10	103
11	142

Antígeno nº	Unidades arbitrarias
12	174
13	336
14	446
15	487
16	564
17	595
18	652
19	691
20	1.259
21	1.325
22	1.389
23	2.293
24	2.692
25	2.706
26	2.918
27	3.226
28	3.344
29	4.008
30	4.394
31	4.597
32	4.722

Se utilizó el reactivo de calibración para crear las curvas de calibración según la fig. 3, que muestra la correlación entre la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para IgG específica, gráfico log/log en unidades arbitrarias (eje x). En este ejemplo, se ha analizado la muestra de calibración cinco veces y la fig. 3 muestra la estrecha correlación entre las 5 veces diferentes que se analizó la muestra. Las 32 antígenos diferentes se unieron con inmunoglobulinas de suero de pacientes seleccionadas y se diluyeron de tal manera que se cubrió todo el intervalo de la curva. Las flechas en la figura representan los intervalos/puntos de calibración específicos seleccionados. La fig. 4 muestra valores promedio de la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para IgG específica, unidades arbitrarias (eje x) en un gráfico ln/ln, basado en los resultados mostrados en la fig. 3, y la generación de una curva de calibración muy estable utilizando los 32 valores que garantizan que la integridad de cada variable en la matriz está intacta.

5

10

Ejemplo 3

Este método se utilizó para crear una curva de calibración para la determinación cuantitativa de los componentes peptídicos o proteínicos, que se utilizan como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de próstata en hombres. El calibrador consistió en una muestra que contenía moléculas de unión en forma de diferentes biomarcadores peptídicos o proteínicos de diferentes concentraciones.

Los agentes captadores en forma de anticuerpos específicos para los diferentes componentes peptídicos o proteínicos relevantes para el cáncer de próstata se inmovilizaron en un chip de ADN.

Las moléculas de detección utilizadas en el análisis eran anticuerpos secundarios específicos para diferentes epítomos en los componentes antigénicos (es decir, las moléculas de unión) que los epítomos para los que eran específicos los anticuerpos inmovilizados (es decir, los agentes captadores).

Se utilizó el reactivo de calibración para crear una curva de calibración según la fig. 5, que muestra la correlación entre la intensidad de fluorescencia observada (eje y) y unidades normalizadas ISAC para los biomarcadores antigénicos, unidades arbitrarias (eje x).

La fig. 5 representa un ejemplo que explica cómo la interrelación entre biomarcadores con diferentes lapsos de concentración puede interconectarse a medida que los biomarcadores se analizan en una sola matriz y minimizando de este modo el uso de una multitud de diferentes concentraciones. Todas las concentraciones detectadas forman un promedio común que se utiliza para volver a calcular la concentración real. Estos cálculos deben optimizarse para cada conjunto de grupo único de biomarcadores analizados simultáneamente en una sola matriz. En este ejemplo, se utilizaron cinco componentes peptídicos o proteínicos diferentes y se analizaron en cuatro concentraciones diferentes en comparación con los presentes métodos para análisis de PSA singleplex que normalmente requieren 6 puntos patrón diferentes. De hecho, por la presente se han reducido significativamente el número de análisis individuales y se ha aumentado la precisión utilizando los 20 puntos patrón para definir las curvas de calibración para los cinco análisis diferentes. Cuatro intervalos de calibración diferentes, divididos por líneas de puntos finos, se representan en la figura. La flecha de puntos en negrita en diagonal representa un promedio calculado basado en la interrelación entre los 20 puntos patrón. Las flechas finas que se extienden entre las curvas de calibración y la flecha de puntos en negrita ilustran que cada curva de calibración independiente de intervalo dinámico y el intervalo de concentración pueden describirse en función de, en este caso, los 20 puntos patrón diferentes. Esto permite una precisión mejorada en comparación con cada uno de los 6 puntos de calibración que normalmente están presentes para un único análisis utilizando concentraciones menores de la muestra de calibración.

La razón para utilizar varias moléculas de unión (p. ej., anticuerpos recombinados, tales como anticuerpos híbridos (ejemplo 1), autoanticuerpos IgG humanos (ejemplo 2) o biomarcadores de péptido/proteínas (ejemplo 3)) para cada punto de calibración es disminuir posibles variaciones en el calibración debido a las variaciones en la inmovilización de los agentes captadores (p. ej., componentes alérgenos (ejemplo 1), antígenos a los que se unen los autoanticuerpos IgG humanos (ejemplo 2), o anticuerpos específicos para los biomarcadores peptídicos o proteínicos de interés (ejemplo 3), lo que puede ocurrir durante la fabricación del chip de ADN. Por lo tanto, incluso si uno o dos componentes se desviasen del valor esperado, esto no influiría notablemente en la curva de calibración.

La curva de calibración puede estar en forma de una aproximación lineal (como se muestra en la fig. 1 por ejemplo) o de curva sigmoidea. También está comprendido dentro del alcance de la presente invención el utilizar un mayor número de moléculas de unión (p. ej., anticuerpos recombinados, tales como anticuerpos híbridos (ejemplo 1), autoanticuerpos IgG humanos (ejemplo 2), o biomarcadores peptídicos o proteínicos (ejemplo 3)) y determinar varias curvas de calibración diferentes, compensando de este modo aún más las diferencias en la forma de la curva debido a propiedades variables de los agentes captadores (p. ej., componentes alérgenos (ejemplo 1), antígenos a los que se unen anticuerpos IgG humanos (ejemplo 2) o anticuerpos específicos para biomarcadores peptídicos o proteínicos de interés (ejemplo 3).

Los ejemplos anteriores ilustran la presente invención relacionada con un reactivo de calibración, su método de producción y sus usos. Los ejemplos son sólo ilustrativos y no deben ser considerados como limitativos de la invención, que está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 1. Componentes alérgenos que pueden utilizarse en un análisis multiplex

ES 2 582 931 T3

FUENTE	COMPONENTE	Recombinado/Natural	Familia o función de proteínas
Kiwi	Act d 1	N	Cisteína proteasa
	Act d 2	N	Proteína similar a la taumatina
	Act d 5	N	Kiwelina
	Act d 8	R	PR-10
Aliso	Aln g 1	R	PR-10
Alternaria	Alt a 1	R	Glucoproteína ácida
	Alt a 6	R	Enolasa
Ambrosía	Amb a 1	N	Pectato-liasa
Anacardo	Ana o 2	R	Proteína de reserva, albúmina 2S
Anisakis	Ani s 1	R	Inhibidor de serina proteasa
	Ani s 3	R	Tropomiosina
Apio	Api g 1	R	PR-10
Abeja	Api m 1	R	Fosfolipasa A2
	Api m 4	N	Melitina
Cacahuete	Ara h 1	R	Proteína de reserva, globulina 7S
	Ara h 2	R	Proteína de reserva, albúmina 2S
	Ara h 3	R	Proteína de reserva, globulina 11S
	Ara h 6	N	Proteína de reserva, albúmina 2S
	Ara h 8	R	PR-10
	Ara h 9	R	LTP
Artemisa	Art v 1	N	Defensina
	Art v 3	N	LTP
<i>Aspergillus</i>	Asp f 1	R	Familia mitogillina
	Asp f 3	R	Proteína peroxisómica
	Asp f 6	R	Superóxido de Mn dismutasa
Nuez de Brasil	Ber e 1	R	Proteína de reserva, albúmina 2S

ES 2 582 931 T3

FUENTE	COMPONENTE	Recombinado/Natural	Familia o función de proteínas
Abedul	Bet v 1	N	PR-10
	Bet v 2	R	Profilina
	Bet v 4	R	Polcalcina
Cucaracha	Bla g 1	R	Cucaracha del grupo 1
	Bla g 2	R	Aspártico-proteasa
	Bla g 5	R	Glutación S-transferasa
	Bla g 7	N	Tropomiosina
Blomia	Blo t 5	R	
Leche	Bos d 4	N	Alfa-lactoalbúmina
	Bos d 5	N	Beta-lactoglobulina
Vaca	Bos d 6	N	Albúmina de suero
Leche	Bos d 8	N	Caseínas
	Bos d lactoferrina	N	Transferrina
Perro	Can f 1	R	Lipocalina
	Can f 2	R	Lipocalina
	Can f 3	N	Albúmina de suero
	Can f 5	R	Arginina-esterasa
Quinoa	Che a 1	R	Inhibidor de tripsina
<i>Cladosporium</i>	Cla h 8	R	Manitol-deshidrogenasa
Avellano	Cor a 1.0101	R	PR-10
Avellana	Cor a 1.0401	R	PR-10
	Cor a 8	R	LTP
	Cor a 9	N	Proteína de reserva, globulina 11S
Cedro japonés	Cry j 1	N	Pectato-liasa
Ciprés	Cup al 1	N	Pectato-liasa
Bermuda	Cyn d 1	N	Hierba grupo 1

ES 2 582 931 T3

FUENTE	COMPONENTE	Recombinado/Natural	Familia o función de proteínas
	Der f 1	N	Cisteína-proteasa
	Der f 2	R	Familia NPC2
<i>Dermatophagoides</i>	Der p 1	N	Cisteína-proteasa
	Der p 2	R	Familia NPC2
	Der p 10	R	Tropomiosina
Caballo	Equ c 1	R	Lipocalina
	Equ c 3	N	Albúmina de suero
Alforfón	Fag e2	N	Proteína de reserva, albúmina 2S
Gato	Fel d 1	R	Uteroglobina
	Fel d 2	N	Albúmina de suero
	Fel d 4	R	Lipocalina
Bacalao	Gad c 1	R	Parvalbúmina
Clara de huevo	Gal d 1	N	Ovomucoide
	Gal d 2	N	Ovoalbúmina
	Gal d 3	N	Conalbúmina
Yema de huevo/pollo	Gal d 5	N	Livetina (albúmina de suero pero específica de la especie)
	Gly m 4	R	PR-10
	Gly m 5	N	Proteína de reserva, beta-conglicinina
	Gly m 6	N	Proteína de reserva, glicinina
Látex	Hev b 1	R	Factor de elongación del caucho
	Hev b 3	R	Proteína de partículas pequeñas de caucho
	Hev b 5	R	Proteína ácida
	Hev b 6.01	R	Heveína
	Hev b 8	R	Profilina
Nuez	Jug r 1	N	Proteína de reserva, albúmina 2S
	Jug r 2	N	Proteína de reserva de semilla vicilina

ES 2 582 931 T3

FUENTE	COMPONENTE	Recombinado/Natural	Familia o función de proteínas
	Jug r 3	N	LTP
<i>Lepidoglyphus</i>	Lep d 2	R	Familia NPC2
Manzana	Mal d 1	R	PR-10
Mercurio	Mer a 1	R	Profilina
Ratón	Mus m 1	N	Lipocalina
	MUXF3	N	CCD
Aceituna	Ole e 1	N	Inhibidor de tripsina
	Ole e 7	N	LTP
	Ole e 9	R	Glucanasa
Parietaria	Par j 2	R	LTP
Camarón	Pen m 1	N	Tropomiosina
	Pen m 2	N	Arginina-cinasa
	Pen m 4	N	Proteína de unión al Ca sarcoplásmico
Fleó	Phl p 1	R	grupo 1 de la hierba
	Phl p 2	R	Hierba del grupo 2
	Phl p 4	N	Enzima del puente de berberina
	Phl p 5b	R	Hierba del grupo 5
	Phl p 6	R	Hierba del grupo 6
	Phl p 7	R	Polcalcina
	Phl p 11	R	Inhibidor de tripsina
	Phl p 12	R	Profilina
Llantén	Pla a 1	R	Inhibidor de invertasa
	Pla a 2	N	Poligalacturonasas
	Pla a 3	R	LTP
Plátano	Pla l 1	R	Pectato-liasa
Avispa del papel	Pol d 5	R	Ag 5

ES 2 582 931 T3

FUENTE	COMPONENTE	Recombinado/Natural	Familia o función de proteínas
Melocotón	Pru p 1	R	PR-10
	Pru p 3	R	LTP
Salicornia	Sal k 1	N	Pectina-metilesterasa
Sésamo	Ses i 1	N	Proteína de reserva, albúmina 2S
Trigo	Tri a 14	R	LTP
	Tri a 19.0101	N	Gliadina omega 5
	Tri a aA_T1	N	Inhibidores de alfa-amilasa/tripsina
Avispa	Ves v 5	R	Ag 5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la calibración de un análisis multiplex, que comprende:
 - la adición de un reactivo de calibración a una fase sólida sobre la que se inmoviliza un gran número de agentes captadores,
 - 5 la adición de una molécula de detección que tiene capacidad para unirse al reactivo de calibración, y
 - la detección de moléculas de detección unidas,
 - creando de este modo una curva de calibración que comprende un número de puntos/ intervalos de calibración, caracterizados por que el reactivo de calibración comprende al menos dos moléculas de unión diferentes, en donde cada molécula de unión tiene capacidad para unirse específicamente a un agente captador inmovilizado sobre la fase sólida y capacidad para unirse a una molécula de detección, y en donde
 - 10 al menos dos de las moléculas de unión tienen especificidades diferentes y están presentes en diferentes concentraciones en el reactivo de calibración, representando de esta manera diferentes puntos/intervalos de calibración en la curva de calibración.
2. El método de la reivindicación 1 en donde las moléculas de unión son anticuerpos recombinados, anticuerpos naturales tales como autoanticuerpos o biomarcadores peptídicos o proteínicos tales como biomarcadores antigénicos, preferiblemente en donde las moléculas de unión son anticuerpos híbridos, tales como anticuerpos híbridos de ratón-humano que comprenden el dominio variable de la cadena pesada de una IgG monoclonal de ratón específica de alérgeno y una cadena pesada de IgE humana.
3. El método de cualquier reivindicación precedente en donde el gran número de agentes captadores es de al menos 5 agentes captadores diferentes, tales como al menos 10, al menos 50 o al menos 100 agentes captadores diferentes; preferiblemente en donde los agentes captadores son componentes alérgenos, tales como componentes alérgenos naturales o recombinados o antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas o enfermedades autoinmunitarias, o anticuerpos específicos para biomarcadores peptídicos o proteínicos.
4. El método de cualquier reivindicación precedente en donde la molécula de detección es un conjugado de anti-inmunoglobulina, tal como un conjugado de anti-IgE humana o un conjugado de anti-IgG humana, o es un anticuerpo específico para un biomarcador peptídico o proteínico.
5. El método de cualquier reivindicación precedente en donde el reactivo de calibración comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 moléculas de unión diferentes.
6. El método de la reivindicación 5 en donde el reactivo de calibración comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 anticuerpos IgE híbridos diferentes, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.
7. El método de cualquier reivindicación precedente en donde el análisis multiplex se lleva a cabo en un chip de ADN.
8. Un sistema analítico multiplex para la detección de una molécula de interés, tal como (a) una inmunoglobulina o (b) un biomarcador peptídico o proteínico presente en una muestra biológica, que comprende:
 - un recipiente de reacción,
 - un gran número de agentes captadores inmovilizados en una fase sólida,
 - 40 - una molécula de detección, tal como (a) una molécula de detección de anti-inmunoglobulina o (b) una molécula de detección que une a un biomarcador peptídico o proteínico,
 - un reactivo de calibración,
 - un medio tamponante de reacción,
 - 45 caracterizado por que el reactivo de calibración comprende al menos dos moléculas de unión diferentes, en donde cada molécula de unión tiene una capacidad para unirse específicamente a un agente de captura inmovilizado sobre la fase sólida y una capacidad para unirse a la molécula de detección, y en donde al menos dos de las moléculas de unión tienen especificidades diferentes y están presentes en diferentes concentraciones en el reactivo de calibración.

9. El sistema de la reivindicación 8 en donde la molécula de interés es (i) un anticuerpo IgE, (ii) un anticuerpo IgG o (iii) un biomarcador peptídico o proteínico para enfermedades.
- 5 10. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 en donde la molécula de detección es (i) un conjugado de anti-IgE humana, (ii) un conjugado de anti-IgG humana, o (iii) un anticuerpo específico para un biomarcador peptídico o proteínico; preferiblemente en donde las moléculas de unión son anticuerpos recombinados tales como anticuerpos híbridos, anticuerpos naturales tales como autoanticuerpos o biomarcadores peptídicos o proteínicos.
- 10 11. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde los agentes captadores son componentes alérgenos, tales como componentes alérgenos naturales o recombinados o antígenos relacionados con enfermedades, tales como componentes antigénicos relacionados con enfermedades infecciosas, o componentes antigénicos relacionados con enfermedades autoinmunitarias, o anticuerpos específicos para biomarcadores peptídicos o proteínicos.
- 15 12. El sistema cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en donde el reactivo de calibración comprende quince anticuerpos IgE diferentes híbridos de ratón-humanos, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.
- 20 13. Un reactivo de calibración que comprende al menos dos anticuerpos híbridos diferentes, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente al menos a uno de los componentes alérgenos enumerados en la Tabla 1, y en donde al menos dos de los anticuerpos híbridos tienen diferentes especificidades y están presentes en diferentes concentraciones en el reactivo de calibración.
- 25 14. El reactivo de calibración de la reivindicación 13 que comprende al menos 5, tal como al menos 10, tal como al menos 15 anticuerpos IgE híbridos diferentes de ratón-humanos.
- 30 15. El reactivo de calibración de la reivindicación 14 en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.
16. El reactivo de calibración de la reivindicación 15 que consiste en quince soluciones distintas de anticuerpo IgE híbrido de ratón-humano, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse específicamente a un componente alérgeno seleccionado del grupo que consiste en Bet v 1, Der p 2, Ole e 1, Gal d 1, Art v 1, Fel d 1, Phl p 1, Amb a 1, Can f 1, Der p 1, Gal d 2, Can f 2, Can f 5, Phl p 5 y Pru p 3.
17. Un equipo que comprende un reactivo de calibración según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 adaptado para su uso en un método de calibración según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde cada anticuerpo híbrido tiene capacidad para unirse a una molécula de detección, y en donde al menos dos de los anticuerpos híbridos están presentes en diferentes concentraciones en el reactivo de calibración, representando de esta manera diferentes puntos/intervalos de calibración en la curva de calibración que se crea al llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Fig. 1A

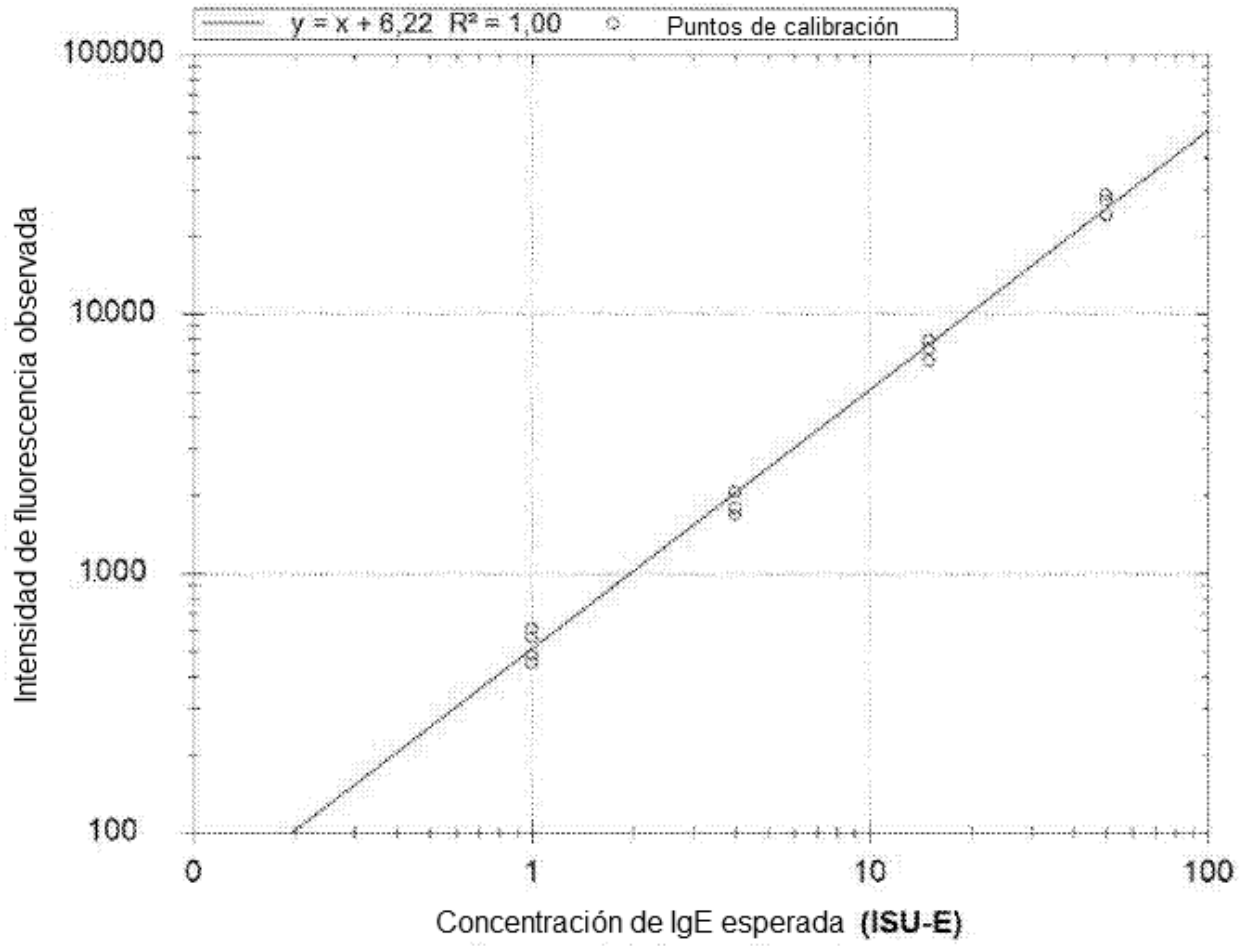


Fig. 1B

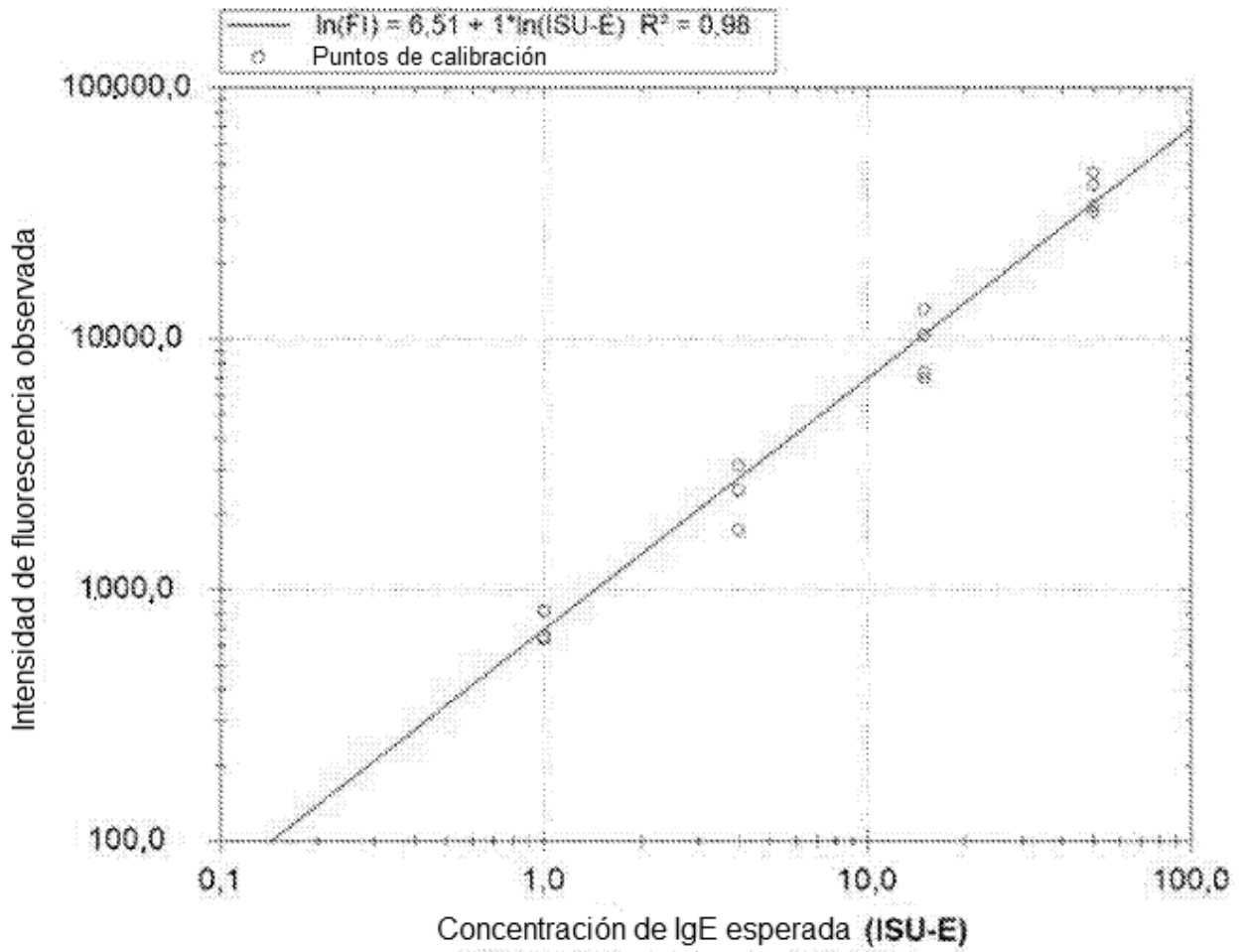


Fig. 2A

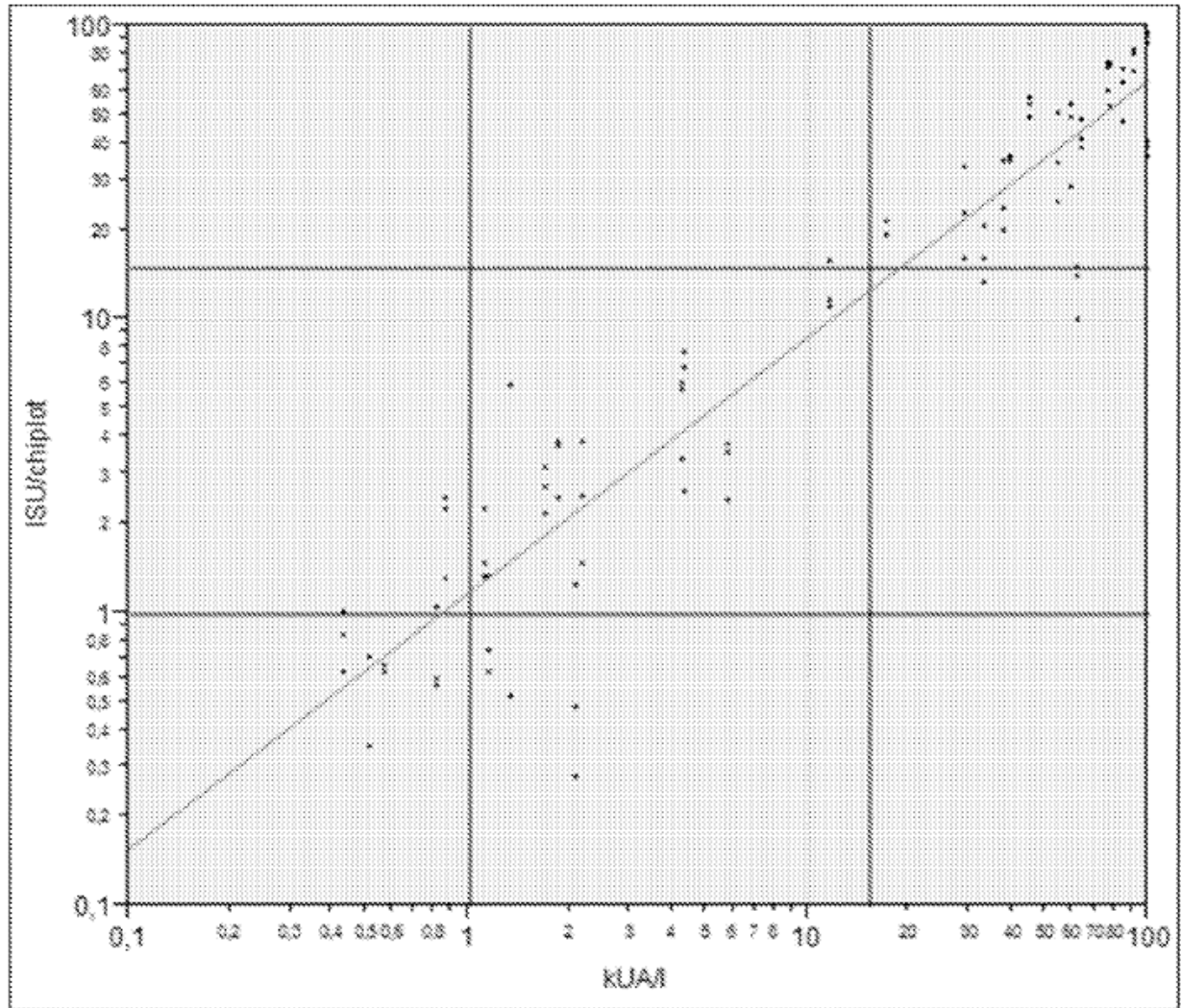


Fig. 2B

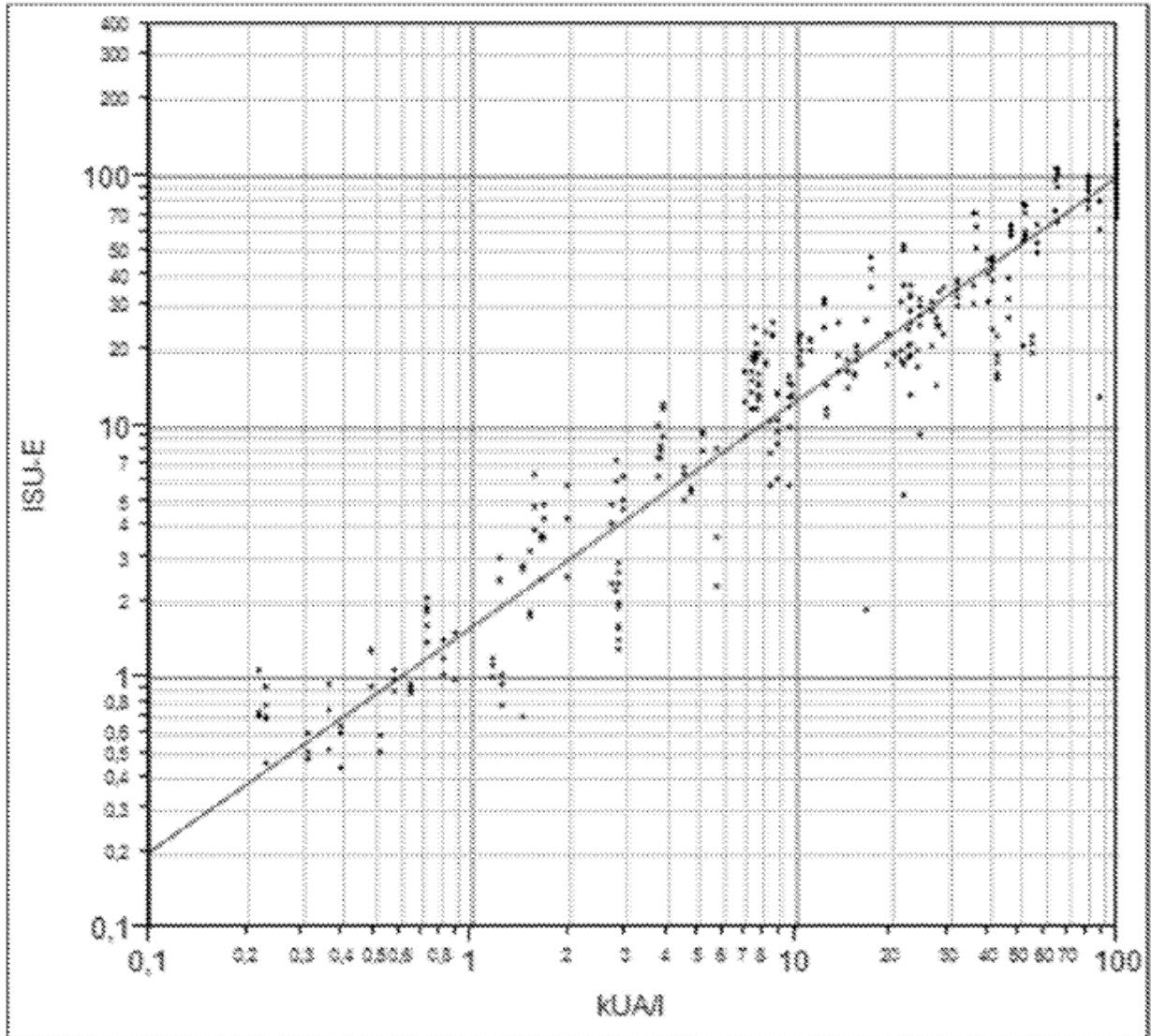


Fig. 3

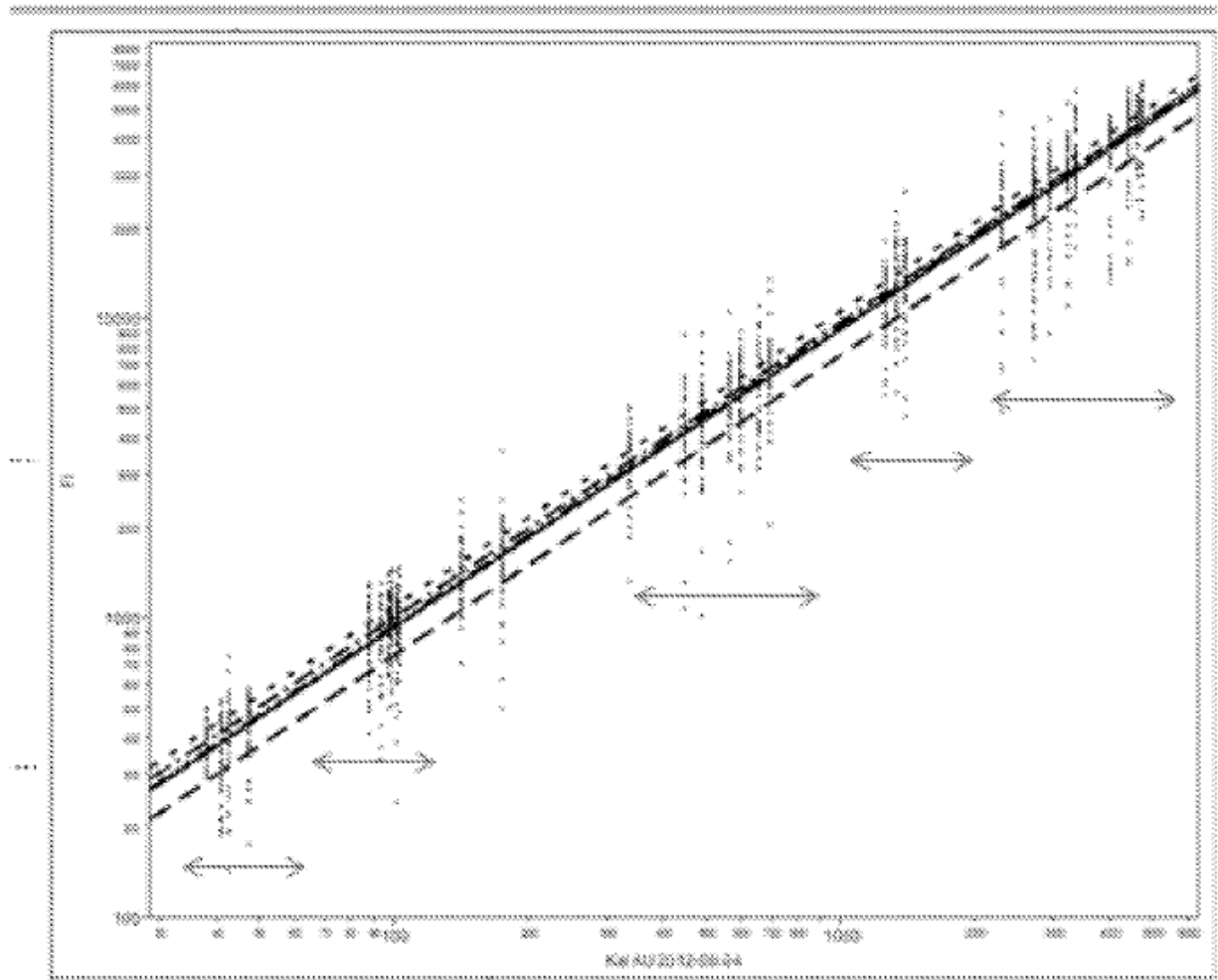


Fig. 4

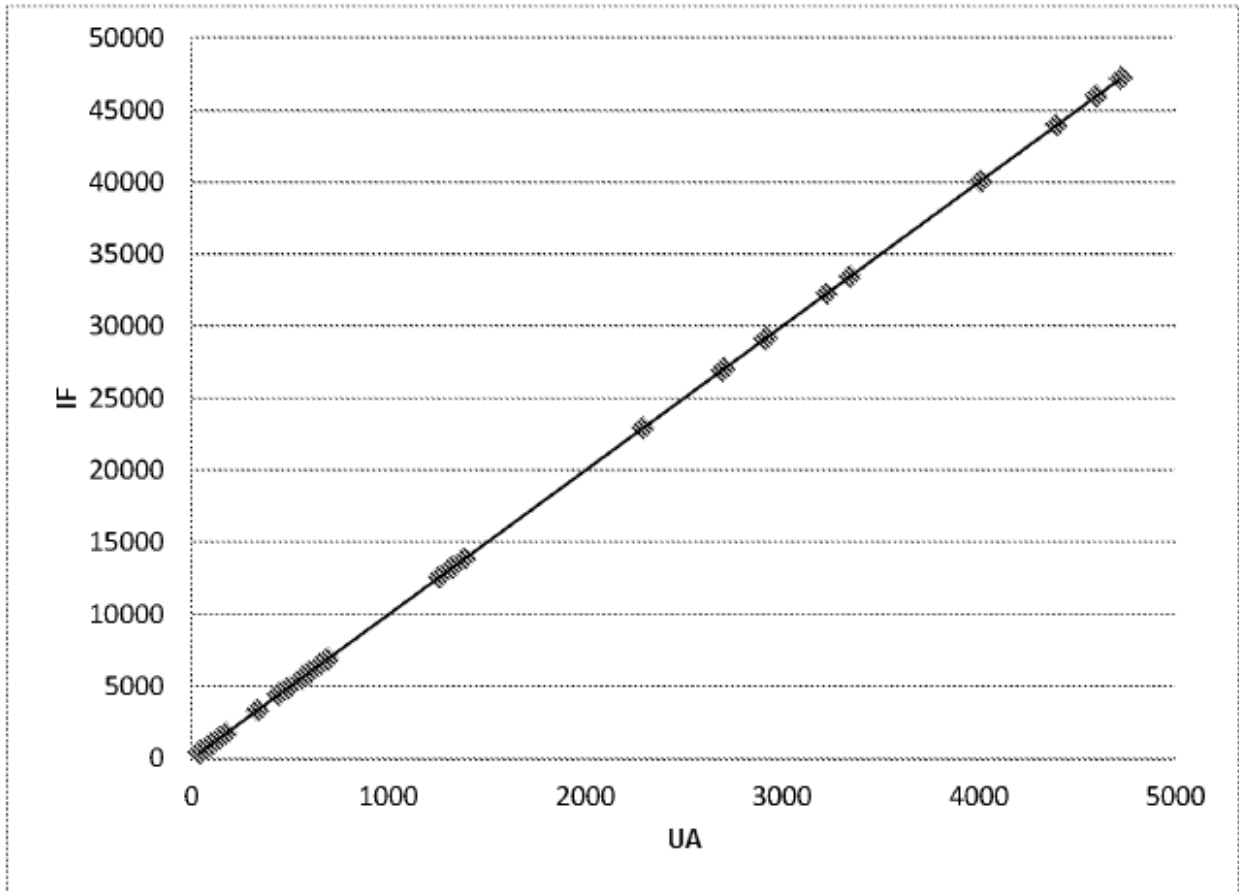


Fig. 5

