

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 483**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/US2013/027060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13752350 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2817423**

54 Título: **Métodos y sistemas para la amplificación de señal de bioensayos**

30 Prioridad:

21.02.2012 US 201261601244 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS (100.0%)
358 South Main Street
Burlington, North Carolina 27215, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSON, DWIGHT LYMAN;
CONRAD, ANDREW J.;
ERICKSON, STEPHEN ERIC y
HOPKINS, BEN BARRETT**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 636 483 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

Métodos y sistemas para la amplificación de señal de bioensayos

Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud de Patente USA Provisional 61/601 244 presentada el 21 de febrero de 2012.

5 Campo de la invención

Esta invención está relacionada con métodos y kits para la amplificación de señal de los bioensayos.

Antecedentes

Los inmunoensayos son importantes herramientas, tanto para los ensayos de investigación como de diagnóstico. Por tanto, es necesario mejorar la sensibilidad de tales ensayos.

10 WO 2004/009848 divulga la amplificación basada en micropartículas, donde las micropartículas van unidas a moléculas de señalización y moléculas de unión de analitos.

WO 03/104424 divulga conjugados moleculares que amplifican la señalización mediante reactivos de unión específicos de analitos con una etiqueta detectable.

15 Galikowska et al, *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis***30 (9)**: 1067-1073(2011) demuestra que las bacterias pueden ser detectadas por bacteriófagos utilizando el ensayo de detección basado en ELISA.

Gutierrez et al., *J Food Protection***60 (1)**:23-27 (1997) expone que las bacterias pueden ser detectadas por anticuerpos monoclonales en un ensayo de detección basado en ELISA.

Resumen

20 Las realizaciones de la presente divulgación comprenden métodos de amplificación para la detección de un analito de interés, y kits para realizar tales ensayos. La presente divulgación puede ser realizada de diversas maneras.

En una realización, la invención, como viene definida en las reivindicaciones, comprende un método para la amplificación de señal que incluye: añadir al analito de interés un soporte de detección que comprende un soporte sólido, que incluye diversas moléculas de un agente de unión que reconoce y se une al analito de interés; y detectar por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. En una realización, el método puede comprender además añadir un soporte de captura, comprendiendo dicho soporte de captura por lo menos un agente de unión de soporte de captura que reconoce y se une al analito de interés para inmovilizar el analito de interés sobre el soporte de captura. En determinadas realizaciones, el método puede comprender además la adición de un agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. El agente de unión que puede reconocer específicamente y unirse a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección, puede comprender en algunas realizaciones una fracción detectable.

En otras realizaciones, la invención comprende kits para llevar a cabo los métodos que se divulgan aquí.

35 Breve descripción de las figuras

La presente invención puede entenderse mejor remitiéndose a las siguientes figuras, entre otras.

La Figura 1, paneles A y B, ilustra un ensayo según una realización de la presente invención, donde el panel A representa una realización de un inmunoensayo amplificado de la invención, y el panel B representa un inmunoensayo tipo sándwich estándar de la técnica anterior.

40 La Figura 2, paneles A-E, ilustra diversos métodos de detección para proteínas de interés según realizaciones alternativas de la invención.

Descripción detalladaDefiniciones

45 Salvo que aquí se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el significado entendido habitualmente por los expertos en la técnica. Además, y salvo que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales, y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de las proteínas y ácidos nucleicos e hibridación que se describen aquí, son bien conocidas y utilizadas habitualmente en la técnica. Los métodos y las técnicas conocidos se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como vienen descritos en diversas referencias generales y más específicas que se comentan en la presente especificación, salvo que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo habitualmente en la técnica o como se describen aquí. Las nomenclaturas utilizadas en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio

descritos aquí son bien conocidas y utilizadas comúnmente en la técnica.

Salvo que se indique lo contrario, los siguientes términos deben ser interpretados de acuerdo con estos significados:

5 Tal como se utilizan aquí, los términos "uno", "una", y "el" "la" pueden referir a uno o más, salvo que se indique específicamente lo contrario.

El término "o" se emplea con el significado "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas, o que estas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación contenga una definición que se refiera a solo alternativas y "y/o". Tal como se utiliza aquí "otro/a" puede significar por lo menos un segundo o más.

10 En esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación de error inherente al dispositivo, el método empleado en la determinación del valor o la variación que existe entre muestras.

15 El término "soporte sólido" o "soporte" significa una estructura que proporciona un sustrato sobre el que pueden ligarse biomoléculas. Por ejemplo, un soporte sólido puede ser un pocillo de ensayo (es decir, tal como una placa de microtitulación), o el soporte sólido puede ser un lugar sobre una matriz, o un soporte móvil, como una perla.

20 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos y anticuerpos quiméricos, ej., generados por mutagénesis combinatoria y exposición de fagos. El término "anticuerpo" incluye también miméticos o peptidomiméticos de anticuerpos. Los peptidomiméticos son compuestos basados en o derivados de péptidos y proteínas. Los peptidomiméticos de la presente invención pueden ser obtenidos típicamente por modificación estructural de una secuencia de péptidos conocida utilizando aminoácidos no naturales, restricciones conformacionales, reemplazo isostérico y similares.

25 El término "agente de unión" se refiere a una molécula que puede unirse específica y selectivamente a una segunda (es decir, distinta) molécula de interés. La interacción puede ser no covalente, por ejemplo, como resultado de enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, o interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, o puede ser covalente. El término "agente de unión soluble" se refiere a un agente de unión que no va asociado (es decir, unido de forma covalente o no covalente) a un soporte sólido.

30 Como se utiliza aquí, un "analito" se refiere a una molécula o compuesto que están siendo medidos. En algunas realizaciones, el analito interactúa con un agente de unión. Como se describe aquí, el término "analito" puede referirse a una proteína o un péptido de interés. Un analito puede ser un agonista, un antagonista o un modulador. O un analito puede no tener un efecto biológico. Los analitos pueden incluir pequeñas moléculas, azúcares, oligosacáridos, lípidos, péptidos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos y similares.

35 El término "fracción detectable" o "biomolécula detectable" o "reporter" se refiere a una molécula que puede ser medida en un ensayo cuantitativo. Por ejemplo, una fracción detectable puede comprender un enzima que puede ser utilizado para convertir un sustrato en un producto que puede ser medido (ej., un producto visible). O una fracción detectable puede ser un radioisótopo que puede ser cuantificado. O una fracción detectable puede ser un fluoróforo. O una fracción detectable puede ser una molécula luminiscente. O se pueden utilizar otras moléculas detectables.

40 Como se utiliza aquí, el término "zona de equivalencia" indica la región en una reacción de precipitación en la que la concentración de antígeno y anticuerpo conduce a la máxima precipitación. Por tanto, si hay un exceso de antígeno o anticuerpo no se produce la precipitación.

Métodos de amplificación de señal

45 En determinados aspectos, la presente invención utiliza la elevada especificidad de biomoléculas que han sido acopladas a un soporte sólido para amplificar aún más una señal, como un medio para detectar niveles bajos de los analitos (ej., una proteína de interés) presentes en una muestra. En determinadas realizaciones, para ensayos inmunoquímicos (por ejemplo, ELISA o RIA) o de inmunofluorescencia, en los que una proteína que debe ser identificada se liga directamente o por anticuerpos de captura a una superficie pasivada, se puede alcanzar una amplificación de señal de por lo menos 10 000 veces.

50 Por tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención comprende un método de amplificación de señal que incluye añadir al analito de interés un soporte de detección, comprendiendo dicho soporte de detección un soporte sólido que incluye diversas moléculas de un agente de unión que reconoce y se une al analito de interés; y detectando como mínimo algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. En determinadas realizaciones, el método puede comprender además la adición de un soporte de captura, comprendiendo este por lo menos un agente de unión de soporte de captura que reconoce y se une al analito de interés para inmovilizar el analito de interés sobre el soporte de captura. En una realización, el analito de interés se une al soporte de captura antes de interactuar con el soporte de detección. O el analito de interés puede unirse al soporte de captura después de interactuar con el soporte de detección. El método comprende además añadir un agente de unión que pueda

reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. En una realización, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección es un agente de unión soluble.

5 En una realización, el soporte sólido de captura puede ser un pocillo de ensayo (es decir, como una placa de microtitulación). O el soporte sólido de captura puede ser un lugar sobre una matriz, o un soporte móvil, como una perla. En una realización, el soporte de detección es un soporte móvil, como pueden ser perlas. En determinadas realizaciones, el analito de interés puede estar en solución. O el analito de interés puede ser una proteína dentro de un microorganismo y/o un tejido, de forma que, al fijarlo, las
10 macromoléculas en la célula funcionan como soporte de captura. Por ejemplo, en una realización se pueden emplear los métodos de amplificación de inmunoensayo para la detección in situ de proteínas.

En una realización, el soporte de detección que comprende diversas moléculas de un agente de unión que reconoce específicamente el analito de interés, se añade en exceso a una muestra que comprende el analito de interés. También en una realización, el soporte de detección comprende diversas moléculas que incluyen una fracción detectable. Alternativamente, donde se utiliza un agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección, el agente de unión soluble puede comprender una fracción detectable.
15

Se pueden utilizar diversos agentes de unión en los métodos de la invención. Por ejemplo, los diversos agentes de unión ligados al soporte de detección pueden ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión ligado al soporte de captura puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente al menos a algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. O el agente de unión en cualquiera de los soportes de captura o detección, o el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente al menos a algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección puede comprender una proteína que se liga a una diana no proteica (es decir, como una proteína que se une específicamente a un analito de interés de moléculas pequeñas, o un receptor que se une a una proteína).
20
25

En una realización, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección no reconoce el agente de unión de captura utilizado para unir el analito de interés al soporte de captura sólido.
30

El empleo de un soporte de detección que comprenda diversos agentes de unión que reconozcan el analito de interés proporciona la amplificación de la señal. En realizaciones alternativas, el soporte de detección comprende más de 1000, o más de 10 000, o más de 100 000, o más de 500 000, o más de 1 000 000 de moléculas de agente de unión específicas para el analito de interés. Así, en realizaciones alternativas, el método de la invención proporciona una amplificación de 1000, o más de 10 000, o más de 100 000, o más de 500 000, o más de 1 000 000 veces la señal captada en un inmunoensayo estándar no amplificado que no comprenda un soporte de detección incluyendo diversos agentes de unión de detección. Así, en realizaciones alternativas, el método de la invención proporciona una amplificación que va de 1000 a 1 000 000 000, o de 1000 a 100 000 000, o de 5000 a 10 000 000, o de 10 000 a 1 000 000, o de 10 000 a 500 000, o de 50 000 a 500 000 veces la señal captada en un inmunoensayo estándar no amplificado, que no comprenda un soporte de detección incluyendo diversos agentes de unión de detección. O pueden lograrse rangos dentro de esos rangos.
35
40

En determinadas realizaciones el analito de interés es una proteína, y los agentes de unión son anticuerpos. Así, en determinadas realizaciones la presente invención comprende un método para la amplificación de señal de la detección de proteínas por un inmunoensayo.
45

El uso del soporte de detección y/o el soporte de captura puede incluir diversos formatos.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el analito de interés puede ligarse primero al soporte de captura, y permitirle luego interactuar con el soporte de detección. Por tanto, el método puede comprender los pasos de ligar diversos agentes de unión que pueden unirse específicamente a una proteína de interés en un soporte de captura. El método puede comprender además añadir el analito de interés al soporte de captura. A continuación, el método puede comprender añadir al analito de interés ligado al soporte de captura un soporte de detección comprendiendo diversos agentes de unión de detección específicos para el analito de interés, de forma que la detección de los diversos agentes de unión de detección proporcione amplificación de la señal.
50
55

En determinadas realizaciones, el método puede comprender también añadir un tercer agente de unión que pueda reconocer y unirse específicamente a los diversos agentes de unión de detección. En una realización, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a los diversos agentes de unión de detección es un agente de unión soluble. El tercer agente de unión puede comprender una fracción detectable. Así, en algunas realizaciones, proceder a los pasos del método genera un complejo comprendiendo el soporte de captura: el agente de unión de captura: el analito de interés: el agente de unión de detección: el soporte de detección: el agente de unión soluble: la fracción detectable. La Figura
60

1A representa una realización de un inmunoensayo amplificado de la invención según el formato indicado más arriba. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1 A, el método puede comprender los pasos de fijar diversos agentes de unión 208 a un soporte sólido de captura 214 de forma que los agentes de unión pueden reconocer y capturar específicamente una proteína de interés 206.

5 En una realización, la proteína puede ser aislada de una membrana celular, o liberada de una célula de interés, y añadida luego a la fase sólida. En una realización, el agente de unión de captura ligado al soporte sólido de captura es un anticuerpo primario, o un fragmento de anticuerpo que reconoce la proteína. Por ejemplo, en una realización, el soporte de captura 214 puede ser un pocillo de microtitulación recubierto de anticuerpos 208 para la proteína de interés 206 (ej., anticuerpo de conejo). O se pueden utilizar otros agentes de unión, ej., receptores que reconocen a ligandos específicos, moléculas de ácido nucleico que pueden hibridar a secuencias complementarias, polisacáridos, lípidos, lipopolisacáridos, ácidos teicoicos o ácidos lipoteicoicos que reconocen a ligandos específicos y similares. Los anticuerpos inmovilizados 208 pueden reconocer específicamente el analito de interés 206, mientras que otras proteínas o biomoléculas 202, 204 no se ligan.

15 A continuación se puede añadir un soporte de detección 216 (ej., una perla) recubierto con diversas moléculas de un agente de unión de detección 211 que reconoce también el analito de interés 206. En una realización, el soporte de detección puede comprender de miles, a decenas de miles, a centenares de miles del agente de unión de detección. En una realización, el agente de unión de detección es un anticuerpo. Por ejemplo, el agente de unión de captura puede ser un anticuerpo de conejo que reconoce una proteína de interés, mientras que el agente de unión de detección puede ser un anticuerpo primario de cobaya que también reconoce la proteína de interés. De esta forma, la proteína de interés 206 liga el soporte de detección 216 que comprende las diversas moléculas del agente de unión de detección 211 que reconocen la proteína de interés 206 ligada al agente de unión de captura 208 inmovilizado sobre el soporte sólido de captura 214.

25 A continuación, se puede añadir un agente de unión soluble (ej., un anticuerpo secundario, como un anticuerpo anti-cobaya) 212 que reconoce el agente de unión de detección 211. En una realización, el agente de unión soluble 212 va marcado con una fracción detectable 210 (es decir, un reporter). Por ejemplo, el agente de unión soluble puede ser marcado con una fracción fluorescente (ej., QDOTS®) o un enzima (ej., peroxidasa de rábano). O, en una realización, los agentes de unión de detección sobre el soporte secundario pueden ser marcados con tales fracciones detectables. Así puede originarse una gran amplificación de la señal a partir de una sola molécula proteica 206.

35 Así, como se muestra en la Figura 1A, dado que la proteína 206 puede reconocer ambos anticuerpos primarios (es decir, un anticuerpo de cobaya 211 sobre la perla 216 y un anticuerpo de conejo 208 sobre el soporte de captura 214), se puede facilitar la formación de un complejo sándwich entre por lo menos una de las perlas 216 y el anticuerpo 208 ligado en la superficie sólida 214. Luego, tras eliminar por lavado las perlas no ligadas 216, las perlas ligadas a la proteína 206 de interés pueden ser detectadas utilizando un anticuerpo secundario 212 que reconoce el anticuerpo primario 211 ligado a la perla. En una realización, el anticuerpo secundario va ligado a una fracción detectable 210 que puede ser un enzima, un fluoróforo, QDOTS®, o similares.

40 Por tanto, el método puede comprender los pasos de fijar diversos agentes de unión a un soporte sólido ("soporte de captura"), de modo que los agentes de unión pueden reconocer y capturar específicamente un analito de interés. A continuación, el método puede incluir la adición de un segundo soporte móvil (ej., una perla o perlas) recubierto con decenas de miles de un segundo agente de unión ("soporte de detección") que puede específicamente ligarse a por lo menos una molécula inmovilizada sobre el primer soporte. El método puede incluir además el paso de añadir un tercer complejo agente de unión-reporter (ej., un agente de unión soluble acoplado a una fracción detectable) que se une específicamente a por lo menos alguna de la pluralidad del segundo agente de unión en el segundo soporte. El método puede incluir luego el paso de detectar el complejo compuesto por el soporte de captura: agente de unión de captura: analito de interés: agente de unión de detección: soporte de detección: agente de unión soluble: fracción detectable. Como se ilustra en la Figura 1A, debido al gran número de moléculas del agente de unión 211 ligadas al soporte de detección 216, que puede ligar el agente de unión soluble 212 con moléculas reporter 210, la amplificación de señal (es decir, proteínas 206 ligadas al agente de unión 208 sobre el soporte de captura 214) aumenta espectacularmente.

55 La Figura 1B proporciona una ilustración de un inmunoensayo no amplificado del tipo anterior para comparación. Así, el inmunoensayo de la Figura 1B comprende la formación de un sándwich que incluye un soporte de captura 214: primer anticuerpo primario 208: analito de interés 206: segundo anticuerpo primario 211: anticuerpo secundario 212: fracción detectable 210.

60 La Figura 2 ilustra diversas realizaciones alternativas de inmunoensayos amplificados que pueden utilizarse para detectar analitos de interés, donde varía el orden en que los diversos componentes se añaden al ensayo.

Como se muestra en la Figura 2A (Método 1), en algunas realizaciones, el analito de interés puede ir ligado a un agente de unión de captura 230, y luego el agente de unión de captura unirse al soporte de captura 240. A continuación, puede añadirse el soporte de detección 233 comprendiendo diversos

agentes de unión 211. Finalmente, se añade un agente de unión soluble 212 comprendiendo una fracción detectable 210 y que reconoce los agentes de unión de detección 211.

5 Por ejemplo, en una realización, se añaden moléculas de un anticuerpo primario 230 (ej., conejo) específico para un analito de interés 206 (ej., una proteína de interés) y marcadas con biotina 205 para que se unan a las moléculas de analito 206 en solución. Los anticuerpos biotinilados 230 pueden reconocer específicamente el analito de interés 206, mientras que otras proteínas o biomoléculas, 202, 204 no se ligan. En este punto, se puede añadir una perla (o perlas) de "captura" recubierta de estreptavidina magnética 240 (ej., de aproximadamente un micrómetro de diámetro) para ligar
10 incluir bloquear los complejos perla-proteína mediante la adición de biotina y albúmina de suero bovino (BSA).

15 En este punto, se añade una perla o perlas de "detección" 233 recubiertas con miles, decenas de miles, a cientos de miles de moléculas de un segundo anticuerpo primario 211 que reconoce la proteína de interés 206, pero que es producido en una especie distinta (ej., cobaya) donde los anticuerpos de captura biotinilados 230 se añaden para unirse a epítopos abiertos, no ocupados sobre el analito 206. La cantidad de anticuerpo de detección 211 puede detectarse utilizando un anticuerpo secundario 212 que reconoce el segundo anticuerpo primario 211 (como un anticuerpo anti-cobaya para un anticuerpo primario de cobaya). En una realización, el anticuerpo secundario 212 se marca con una fracción detectable 210. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede ser marcado con una fracción fluorescente (ej., QDOTS®) o un enzima (ej., peroxidasa de rábano). Así puede originarse una gran amplificación a partir de una sola molécula de proteína.

25 La Figura 2B (Método 2) ilustra una forma alternativa del ensayo amplificado del Método 1, pero donde el soporte o soportes de detección 233 que comprende moléculas de agente de unión de detección 211 se añaden al pocillo de ensayo con el agente de unión de captura 230 antes de la adición del soporte de captura 240 que reconoce el agente de unión de captura 230. Una vez se ha formado el o los complejos de soporte de captura: agente de unión de captura: analito de interés: agente de unión de detección: soporte de detección, se pueden añadir las moléculas de un agente de unión soluble 212 marcadas con una fracción detectable 210.

30 La Figura 2C (Método 3) ilustra una forma alternativa del ensayo del Método 1, pero donde el soporte o soportes de detección 233 que comprende diversos agentes de unión de detección 211 comprenden también diversas moléculas de una fracción detectable 210 ligadas a (ej., por unión covalente o recubriendo la superficie) la superficie de los soportes de detección en lugar de ligarse a un agente de unión soluble aparte. En una realización, este método puede permitir el uso de menos agentes de unión de detección si el soporte de detección comprende diversas fracciones detectables. Por ejemplo, la relación de fracciones detectables: agentes de unión de detección en el soporte de detección puede ser 1:1, o 5:1, o 10:1, o 100:1, o 500:1, o 1000:1, o 10 000:1 o superior. La fracción detectable puede comprender una fracción fluorescente (ej., QDOTS®) o un enzima (ej., peroxidasa de rábano). Puede verse también que en esta realización no es necesario utilizar un agente de unión que pueda reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el
40 soporte de detección (ej., anticuerpo soluble 212).

45 La Figura 2D (Método 4) ilustra una forma alternativa del ensayo del Método 3, pero donde el soporte o los soportes de detección 233 recubiertos con agentes de unión de detección 211 y diversas fracciones detectables 210, se añaden antes de la adición del soporte de captura 240. En algunas realizaciones, el o los soportes de detección 233 recubiertos con agentes de unión de detección 211 y varias fracciones detectables 210 y el agente de unión de captura 230 se añaden simultáneamente. En una realización, esto puede facilitar la formación de un complejo entre el analito de interés 206 y el soporte de detección 233 y el agente de unión de captura 230.

50 La Figura 2E (Método 5) ilustra una forma alternativa del Método 2, pero en la que el soporte o soportes de detección 233 se añaden antes de la adición del agente de unión de captura 230 y el soporte de captura 240. En una realización, esto puede facilitar la formación de un complejo entre el analito de interés 206 y el soporte de detección 233.

55 Puede ser importante que el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección y/o el agente de unión de detección no se una al soporte de captura o el agente de unión del soporte de captura, ya que esa unión podría producir efecto de fondo. Así, en determinadas realizaciones, el paso de la detección comprende la adición de un anticuerpo secundario soluble que reconoce el agente anticuerpo primario de detección sobre la perla de detección, pero donde el anticuerpo secundario soluble no reconoce el agente de unión de captura (ej., primer anticuerpo primario) utilizado para ligar la proteína de interés al soporte de captura.

60 En determinadas realizaciones, los soportes sólidos de captura y/o detección pueden ser tratados con un agente pasivante. Por ejemplo, en determinadas realizaciones el analito de interés puede ser capturado sobre una superficie pasivada (es decir, una superficie que ha sido tratada para reducir la unión no específica). Un agente pasivante así es BSA. Adicional y/o alternativamente, donde el agente de unión

utilizado es un anticuerpo, los soportes sólidos de captura y/o detección pueden ir recubiertos con proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L, u otro agente que se una con alta afinidad al anticuerpo del agente de unión. Esas proteínas ligan el dominio Fc de los anticuerpos y así pueden orientar la unión de anticuerpos que reconocen la proteína o proteínas de interés.

5 Los soportes de detección y/o captura pueden ser perlas de poliestireno, o perlas hechas de un material similar o distinto, tales como perlas que pueden ir recubiertas con proteínas, pero que no reaccionan con otros componentes en el ensayo. En determinadas realizaciones, las perlas son lo suficientemente grandes para que varias de las moléculas del anticuerpo puedan ligarse a la perla. Por ejemplo, el tamaño de las perlas puede oscilar desde aproximadamente 0,1 a 50, o 0,2 a 40, o 0,3 a 30, o 1 a 20, o 1 a 15 o
10 aproximadamente de 1 a 3 μm de diámetro. El tamaño de las perlas puede depender del tamaño del ensayo a realizar. Para un ensayo realizado en un pocillo de microtitulación, pueden utilizarse perlas de aproximadamente 1 micrómetro (μm).

En realizaciones alternativas, el soporte de detección puede comprender diversos agentes de unión de
15 detección. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, el número de agentes de unión en el soporte de detección puede ser superior a 100, o superior a 500, o superior a 1000, o superior a 5000, o superior a 10 000, o superior a 20 000, o superior a 50 000, o superior a 100 000, o superior a 500 000, o superior a 1 000 000 moléculas del agente de unión de detección. Por ejemplo, en una realización, el soporte de detección puede comprender una perla recubierta con decenas o centenares de miles de moléculas de anticuerpo. En realizaciones alternativas, puede haber aproximadamente de 10 000 a 10 000 000, o
20 aproximadamente de 50 000 a 500 000, o aproximadamente de 100 000 a 1 000 000 de moléculas de agente de unión (ej., un anticuerpo primario) para una perla de soporte de detección que tiene un diámetro de aproximadamente 15 μm . Para perlas de soporte de detección de distintos tamaños, se puede utilizar una cobertura de superficie correspondiente. O lograr rangos dentro de esos rangos.

Como se describe más arriba, se puede añadir un agente de unión formando complejo con un enzima o
25 material fluorescente (QDOTS® u otra etiqueta fluorescente) para ligarse al gran número de anticuerpos utilizados como agentes de unión de detección sobre un soporte de detección. Se puede utilizar un ensayo inmunoquímico (por ejemplo, ELISA), o excitación y visualización de material fluorescente en un sistema de imagen de emisión apropiado para cuantificar la proteína. En una realización, la clave del factor de gran amplificación de señal es la gran área de superficie del soporte de detección, que puede
30 permitir la unión de agentes de unión de detección. Por ejemplo, para anticuerpos, pueden utilizarse aproximadamente $> 10\ 000$ y $> 100\ 000$ moléculas para recubrir perlas de 1 μm y 2,8 μm , respectivamente.

El área ocupada por las moléculas del analito de interés en el soporte de captura debe satisfacer la
35 accesibilidad en la superficie del soporte de detección. Por ejemplo, una matriz bidimensional confluyente de 1 000 000 perlas que funcionen como soportes de captura, y con un tamaño de 1 μm , puede ocupar aproximadamente 1 mm^2 . En una realización, diluciones en serie de una muestra conteniendo 10^6 moléculas del analito de interés pueden aplicarse a un soporte de captura fijo (ej., pocillo de microtitulación) para producir localizaciones separadas para cada aplicación de muestra. Para un soporte de captura móvil (ej., una perla) el número de soportes de detección de un tamaño determinado que pueden ligarse puede ser fraccionado por efectos estéricos. Para soportes fijos o móviles, moléculas
40 individuales del analito de interés que puedan unirse a una perla de 1 μm o 2,8 μm recubierta con $>10^4$ o $>10^5$ anticuerpos primarios, respectivamente, puede proporcionar amplificación en este rango por ELISA, RIA o ensayo de inmunofluorescencia con la unión de anticuerpos secundarios marcados.

Por ejemplo, en una realización, la invención puede comprender un método de amplificación de la señal
45 en ensayos indirectos inmunoquímicos o inmunofluorescentes por $\sim 10\ 000$ veces, comprendiendo: unión de perlas de detección de poliestireno (típicamente de un diámetro de un micrómetro) recubiertas con proteínas A/G y $> 10\ 000$ moléculas de anticuerpo específico para la proteína a identificar en las moléculas de proteína inmovilizadas (directamente o a través de anticuerpos de captura específicos) con un espaciado apropiado sobre una superficie pasivada o inmovilizada en una perla de captura; eliminación de complejos perla-anticuerpo no ligados mediante lavados; unión de anticuerpos secundarios formando
50 de complejos perla-anticuerpo no ligados mediante lavados; unión de anticuerpos secundarios formando complejo con, por ejemplo, un enzima o material fluorescente (QDOTS®) u otra etiqueta fluorescente); y cuantificar la proteína, mediante, por ejemplo, ELISA o por excitación y visualización del material fluorescente en un sistema de imagen de emisión apropiado.

Adicional y/o alternativamente, el analito de interés puede estar en solución, y el ensayo puede
55 comprender ligar el analito en diversos soportes de detección como un medio para detectar el analito. Por ejemplo, una proteína en solución se puede utilizar para ligar diversas perlas de detección (ej., diámetro de aproximadamente 15 a 20 μm), cada perla de detección con diversos anticuerpos, favoreciendo así que se agrupen las perlas, uniéndose a anticuerpos en dos perlas. Esto puede resultar especialmente efectivo cuando se utiliza antisuero policlonal, ya que dichos antisueños permitirán a los anticuerpos reconocer distintos epítomos en la proteína de interés. Las diluciones en serie de la proteína pueden ser
60 comprobadas respecto a la máxima aglutinación de perlas para determinar las concentraciones óptimas de anticuerpo-perlas y proteína, es decir, la zona de equivalencia. Es improbable un efecto prozona de exceso de anticuerpos, ya que los anticuerpos están inmovilizados sobre las perlas.

En otra realización, donde el analito de interés está dentro de un microorganismo o una muestra de tejido, las células de una muestra pueden concentrarse sobre la superficie de un filtro con un tamaño de poro apropiado (ej., típicamente filtro giratorio de 0,45 μm para bacterias). Una vez concentradas, pueden ser lisadas en un pequeño volumen de tampón como se describe aquí, para liberar moléculas del analito de interés. El lisado de células conteniendo el analito de interés puede ser transferido desde la superficie del filtro a un portaobjetos de vidrio o al pocillo de una placa de microtitulación. En ese momento, el analito de interés (ej., una proteína) puede ser identificado por la formación de un entramado tras la adición de perlas de poliestireno de tamaño ~ 300 a ~ 1000 (típicamente de 15 a 20 μm de diámetro) recubiertas de proteína G, proteína A o proteínas A/G y anticuerpos específicos. La aglomeración de las perlas puede ser visualizada directamente o con la ayuda de un aumento de 50 a 100 veces. De nuevo, la inmovilización de los anticuerpos en las perlas puede obviar efectos prozona; no obstante, pueden ser necesarias diluciones en serie de la proteína mezclada con un número constante de complejos perla-anticuerpo, para observar la aglomeración de las perlas debido al posible exceso de antígeno. Los complejos perla- proteína G-anticuerpo agregados (agrupados) con una cantidad conocida del analito de interés, pueden servir de control positivo, y complejos no agregados de perla-proteína G-anticuerpo en tampón sin ningún analito de interés (ej., un lisado de un control negativo conocido) pueden servir de control negativo.

Kits para la amplificación de señal

En realizaciones alternativas, la presente invención puede comprender kits para llevar a cabo los métodos de la invención. En una realización, la invención puede comprender un kit para ensayar un analito de interés, incluyendo un soporte de detección, comprendiendo el soporte de detección un soporte sólido que incluye diversas moléculas de agente de unión que pueden reconocer y unirse al analito de interés. En una realización, el kit puede comprender un soporte de captura, que incluye por lo menos un agente de unión de soporte de captura que reconoce y se une al analito de interés. En algunas realizaciones, el kit puede comprender además un agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección. En una realización, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección es un agente de unión soluble

Los soportes de detección y/o captura pueden comprender diversos formatos. En una realización, el soporte sólido de captura puede ser un pocillo de ensayo (es decir, como una placa de microtitulación). O el soporte de captura sólido puede ser un lugar en una matriz, o un soporte móvil, como una perla. En una realización, el soporte de detección es un soporte móvil, como una perla.

En los kits de la invención pueden utilizarse diversos agentes de unión. Por ejemplo, las diversas moléculas de agente de unión ligadas al soporte de detección pueden ser moléculas de un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión unido al soporte de captura puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce el analito de interés. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección no reconoce el agente de unión de captura utilizado para ligar el analito de interés al soporte de captura sólido. O el agente de unión en cualquiera de los soportes de captura o detección, o el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección puede comprender una proteína que se une a una diana no proteica (es decir, una proteína que se une específicamente a un analito de interés de molécula pequeña, o un receptor que se une a una proteína).

El soporte de detección puede comprender diversas moléculas de una fracción detectable. Adicional y/o alternativamente, el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección puede comprender una fracción detectable.

El uso de un soporte de detección que comprenda diversos agentes de unión que reconozcan el analito de interés proporciona la amplificación de la señal. En realizaciones alternativas, el soporte de detección puede comprender diversos agentes de unión de detección. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, el número de agentes de unión en el soporte de detección puede ser superior a 100, o superior a 500, o superior a 1000, o superior a 5000, o superior a 10 000, o superior a 20 000, o superior a 50 000, o superior a 100 000, o superior a 500 000, o superior a 1 000 000 de moléculas del agente de unión de detección. Por ejemplo, en una realización, el soporte de detección puede comprender una perla recubierta con decenas o centenares de miles de moléculas de anticuerpo. En realizaciones alternativas, puede haber aproximadamente de 10 000 a 10 000 000, o aproximadamente de 50 000 a 500 000, o de aproximadamente 100 000 a 1 000 000 de moléculas de agente de unión (ej., un anticuerpo primario) para una perla de soporte de detección que tiene un diámetro de aproximadamente 15 μm . Para perlas de soporte de detección de tamaños distintos, puede utilizarse una cobertura de superficie correspondiente. O se pueden obtener rangos dentro de esos rangos.

Así, en realizaciones alternativas, el método de la invención proporciona una amplificación de 1000, o más de 10 000, o más de 100 000, o más de 500 000, o más de 1 000 000 de veces la señal captada en un

inmunoensayo estándar no amplificado, que no comprenda un soporte de detección incluyendo diversos agentes de unión de detección. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, los kits de la invención proporcionan una amplificación que oscila de 1000 a 1 000 000 000, o de 1000 a 100 000 000, o de 5000 a 10 000 000, o de 10 000 a 1 000 000, o de 10 000 a 500 000, o de 50 000 a 500 000 veces la señal que se capta en un inmunoensayo estándar no amplificado que no comprenda un soporte de detección que incluya diversos agentes de unión de detección. O se pueden obtener rangos dentro de esos rangos.

Así, en determinadas realizaciones, el kit puede comprender reactivos para un inmunoensayo basado en perlas. Así, en una realización, el soporte de detección puede comprender una perla recubierta con moléculas de un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) que reconoce una proteína de interés. En determinadas realizaciones, la perla puede ser una perla de poliestireno recubierta de proteína G, proteína A, o proteínas A/G, que están disponibles comercialmente (ej., Life Technologies/Invitrogen, Carlsbad CA) en una amplia variedad de tamaños. Otras perlas que pueden ser útiles incluyen perlas de sílice magnética recubiertas de esas mismas proteínas (perlas MagSi de AmsBio, Lake Forest, CA). En realizaciones alternativas, puede haber aproximadamente de 10 000 a 10 000 000 o de aproximadamente 50 000 a 1 000 000, o de aproximadamente 100 000 a 500 000 moléculas de agente de unión (ej., un anticuerpo primario) para una perla de soporte de detección que tiene un diámetro de aproximadamente 15 μm . Para perlas de soporte de detección de distintos tamaños, puede utilizarse una cobertura de superficie correspondiente. En determinadas realizaciones, las perlas de soporte de detección son lo suficientemente grandes como para que diversas moléculas del agente de unión puedan ligarse a la perla. Por ejemplo, las perlas pueden tener un tamaño que oscile de aproximadamente 0,1 a 50, o 0,2 a 40, o 0,5 a 30, o 1 a 20, o 1 a 15 o de aproximadamente 1 a 3 μm . Cuando el agente de unión que debe ligarse a la perla es un anticuerpo, se pueden utilizar perlas disponibles comercialmente recubiertas previamente con proteína G, proteína A, o proteínas A/G, ya que esas proteínas se ligan al dominio Fc de los anticuerpos, orientando a los anticuerpos de forma que los dominios Fab están libres para ligarse a epítomos de antígenos.

Los kits para un inmunoensayo basado en perlas pueden comprender también anticuerpos para la proteína de interés, donde tales anticuerpos son de una segunda especie. Esos anticuerpos resultan especialmente útiles en ensayos indirectos como se describe aquí, ya que permitirán la unión específica de complejos de moléculas anti-anticuerpo secundario-reporter. Además, esos complejos anticuerpo secundario-reporter no se unirán a los anticuerpos primarios de la primera especie que fijan la proteína diana a la superficie sólida o a las perlas de las proteínas A/G, obviando falsas reacciones positivas. Adicionalmente, los complejos anticuerpo secundario-reporter no se ligarán a la superficie de las perlas de proteínas A/G, evitando así falsas reacciones positivas.

Los kits pueden comprender también anticuerpos secundarios solubles que pueden ser marcados con un marcador detectable, o un agente de unión que puede formar complejo con un marcador detectable. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un kit de la invención puede comprender un anticuerpo secundario que va ligado a un fluoróforo. En una realización, el fluoróforo puede comprender un QDOT®. Por ejemplo, en una realización, conjugados anti-anticuerpo-QDOT® reconocen los diversos anticuerpos primarios unidos a la perla.

Los sustratos a utilizar en los kits de la presente invención incluyen, entre otros, perlas de poliestireno, (Spherotech, Libertyville, 111.), perlas magnéticas (Invitrogen; AmsBio), recubrimientos de látex, un filtro de membrana, un filtro de fibra o un sustrato sólido poroso. Se pueden encontrar métodos para el uso de las perlas magnéticas, por ejemplo, en el prospecto de Dynabeads Protein G Prod. N° 10003D, en Kala et al., Analytical Biochemistry 254:263-266 (1997) y en Dutton, Genetic Engineering News, Volumen 22, Número 13, julio de 2002.

Hay un amplio espectro de partículas, en especial perlas magnéticas y de poliestireno, disponibles en el comercio, en una amplia gama de tamaños. Para determinadas realizaciones, un juego preferido de partículas tiene un tamaño medio de partículas (es decir, la dimensión mayor de las partículas) de aproximadamente un micrómetro (es decir, micrón). Para determinadas realizaciones, un juego preferido de partículas tiene un tamaño de partículas medio (es decir, la dimensión mayor de las partículas) no inferior a 10 micrómetros (es decir, micrones). Son ejemplos de perlas disponibles en el comercio, perlas de poliestireno recubiertas de proteína G, proteína A y proteínas A/G, y perlas de poliestireno recubiertas de estreptavidina, que pueden obtenerse de Invitrogen, Carlsbad, CA, o de Spherotech, Libertyville, 111. Otros proveedores de perlas de poliestireno y magnéticas son Thermo Scientific Pierce, Millipore, Polyscience y New England Biolabs. AmsBio, Lake Forest, IL es un proveedor de perlas magnéticas de sílice, que están disponibles con todos los recubrimientos de proteína señalados más arriba. Invitrogen suministra también perlas magnéticas con superficie epoxi, que ligan a los anticuerpos de forma covalente. Las perlas pueden ser de poliestireno, sílice, vidrio u otros materiales, planas o derivatizadas para su unión a grupos químicos específicos.

EJEMPLOS

Realizaciones de la presente invención pueden ilustrarse también con los siguientes ejemplos, entre otros. Todo ejemplo que quede fuera del ámbito de la reivindicación se da solo a efectos comparativos.

Ejemplo 1: Detección de proteínas con amplificación de señal basada en perlas

Una proteína o subunidad proteica de interés puede ser capturada por anticuerpos específicos de la proteína de interés (ej., anticuerpos primarios de conejo biotinilados) inmovilizados sobre una superficie pasivada, como Neutravidina, para minimizar falsos positivos (ej., ver Jain et al., Nature, 2011, 473:484-488). A continuación, en un ensayo sándwich, perlas de poliestireno de 1 μm o 2,8 μm recubiertas con proteína A/G y otro tipo de anticuerpos específicos para la proteína (típicamente $>10^4$ y $>10^5$ para perlas de 1 μm y 2,8 μm , respectivamente) producidos en una segunda especie (ej., cobayas) se añaden para que se ligan a las subunidades proteicas diana inmovilizadas. Después, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo secundarios (ej., anticuerpos anti-cobaya) conjugados (ej., unidos covalentemente) a un enzima, etiqueta radiactiva, o material fluorescente como QDOTS® se añaden para que se enlacen con los diversos anticuerpos primarios unidos a la perla específicos del analito de interés. Las moléculas de proteína o anticuerpos no ligados se eliminan mediante lavados (2 veces) entre adiciones sucesivas.

Pueden utilizarse ELISA, RIA o ensayos de inmunofluorescencia para detectar y cuantificar la proteína o subunidad proteica de interés. Para ensayos de fluorescencia, las manchas se excitan con luz UV, y se visualizan con un filtro de emisión apropiado en un sistema de imágenes hiperespectrales con una cámara.

Ejemplo 2: Captura de proteínas ribosomales utilizando varios formatos de amplificación de perlas

Se llevaron a cabo experimentos para comparar los diversos formatos de ensayo representados en la Figura 2, panel B (es decir, Método 2). Esencialmente, se prepararon lisados de *E. coli* (500 000 células) lisando células bacterianas, y disociando los ribosomas contenidos a constituyentes proteicos en 6 M (10 000 células/ μl) de guanidina tiocianato. La concentración de guanidina tiocianato se redujo entonces a 0,12 o 0,6 M por dilución en tampón fosfato (ej., dilución de 90 000 células en 450 μl). Las proteínas ribosomales fueron capturadas entonces utilizando uno de los métodos de detección de captura que se muestran en la Figura 2 (Tabla 1). Se muestran los resultados de las de entrada iniciales y de las proteínas ribosomales estimadas de las células; 100 células de *E. coli* tienen aproximadamente 2,7 pg de proteína ribosomal.

Método	Nº de células <i>E. coli</i>	Proteína ribosomal calculada	Señal sobre control celular 0
Método 2	2000	54 pg	6,17
	10 000	270 pg	3,16
Método 5 (1)*	4000	108 pg	9,3
Método 5 (2)	500	14 pg	1,8
	2000	54 pg	2,2

Experimentos 1 y 2.

Se realizaron experimentos adicionales utilizando el método presentado en el panel 2E. Este método utiliza la adición de perla-Ab2 (perlas carboxi y anticuerpos anti-ribosomales de conejo) en el lisado. Esto permite a las proteínas ribosomales unirse a la perla, de forma similar a un ELISA sándwich normal, donde los anticuerpos de "captura" son inmovilizados sobre una superficie. La Abl-biotina (cobaya) fue añadida entonces directamente a la mezcla, sin pasos de lavado. Los complejos perla-Ab2-proteína-Abl se capturan utilizando perlas de estreptavidina (SA) y se detectan utilizando anticuerpos secundarios de Ab2. Se observó que este enfoque funcionaba cuando se utilizaban perlas carboxi-Ab de conejo (Ab2-perla) y biotina, anticuerpos de cobaya (Abl).

Así, en este experimento, se incubaron lisados de 2500/5000/10 000/20 000 células con aproximadamente $1,3 \times 10^8$ perlas carboxi (0,1 μm) con anticuerpo anti-ribosomal de conejo (anti-riboAb). A continuación, se añadieron anticuerpos anti-ribosomales de cobaya biotinilados 10 ng (4×10^{10} moléculas IgG) y se siguieron incubando. Los complejos perla-Ab-ribo proteína-Ab fueron capturados con aproximadamente 4×10^7 CI SA Dynabeads. Se procedió a la detección con 10 ng de anti-anticuerpo de conejo marcado con peroxidasa de rábano (HRP). Una quinta parte de la muestra se colocó en una microplaca de detección con sustrato Sirius HRP en un luminómetro. Puede verse que la señal que se captó fue de tan solo 500 células, correspondiendo a aproximadamente 14 pg de proteína ribosomal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la amplificación de señal comprendiendo:
 adición al analito de interés de un soporte de detección comprendiendo un soporte sólido que incluye diversas moléculas de un agente de unión que reconoce y se une al analito de interés; y
 detectar por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión sobre el soporte de detección, añadiendo un agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente al menos a algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el soporte de detección es una perla; o donde el soporte de detección comprende varias moléculas de una fracción detectable.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, comprendiendo además añadir un soporte de captura, comprendiendo dicho soporte de captura por lo menos un agente de unión de soporte de captura que reconoce y se une al analito de interés para inmovilizar el analito de interés en el soporte de captura; de preferencia
 donde el analito de interés se liga al soporte de captura antes de interactuar con el soporte de detección; o
 donde el analito de interés se une al soporte de captura tras interactuar con el soporte de detección.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección comprende una fracción detectable,
 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las moléculas del agente de unión en el soporte de detección es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo,
 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección no reconoce el agente de unión de captura utilizado para ligar el analito de interés al soporte de captura sólido, o
 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección comprende un agente de unión soluble.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, donde el soporte de captura es una perla.
- 30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, donde el agente de unión ligado al soporte de captura es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que puede reconocer y unirse al analito de interés.
- 35 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las diversas moléculas del agente de unión ligado al soporte de detección son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que reconocen y se unen al analito de interés.
- 40 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el soporte de detección comprende más de 10 000 moléculas del agente de unión específico del analito de interés, o donde el soporte de detección comprende más de 100 000 moléculas del agente de unión específico del analito de interés.
- 45 9. Un kit para ensayar un analito de interés comprendiendo: un soporte de detección, cuyo soporte de detección comprende un soporte sólido, incluyendo diversas moléculas de un agente de unión que puede reconocer y unirse al analito de interés, y un agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente al menos a algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección.
- 50 10. El kit de la reivindicación 9, comprendiendo además un soporte de captura, comprendiendo dicho soporte de captura por lo menos un agente de unión de captura que reconoce y se une al analito de interés.
11. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, donde el soporte de detección es una perla; o donde el soporte de detección comprende diversas moléculas de una fracción detectable.
12. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde las diversas moléculas del agente de unión ligado al soporte de detección son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que pueden reconocer y unirse al analito de interés.

13. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10,

donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección comprende un agente de unión soluble,

5 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que puede reconocer y unirse al analito de interés, o

10 donde el agente de unión que puede reconocer y unirse específicamente a por lo menos algunas de las diversas moléculas del agente de unión en el soporte de detección comprende una fracción detectable.

14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde el soporte de captura es una perla, o donde el agente de unión de soporte de captura es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que puede reconocer y unirse al analito de interés.

15. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el soporte de detección comprende más de 1000 moléculas del agente de unión específico para el analito de interés;

donde el soporte de detección comprende más de 10 000 moléculas del agente de unión específico del analito de interés; o donde el soporte de detección comprende más de 100 000 moléculas del agente de unión específico del analito de interés.

20

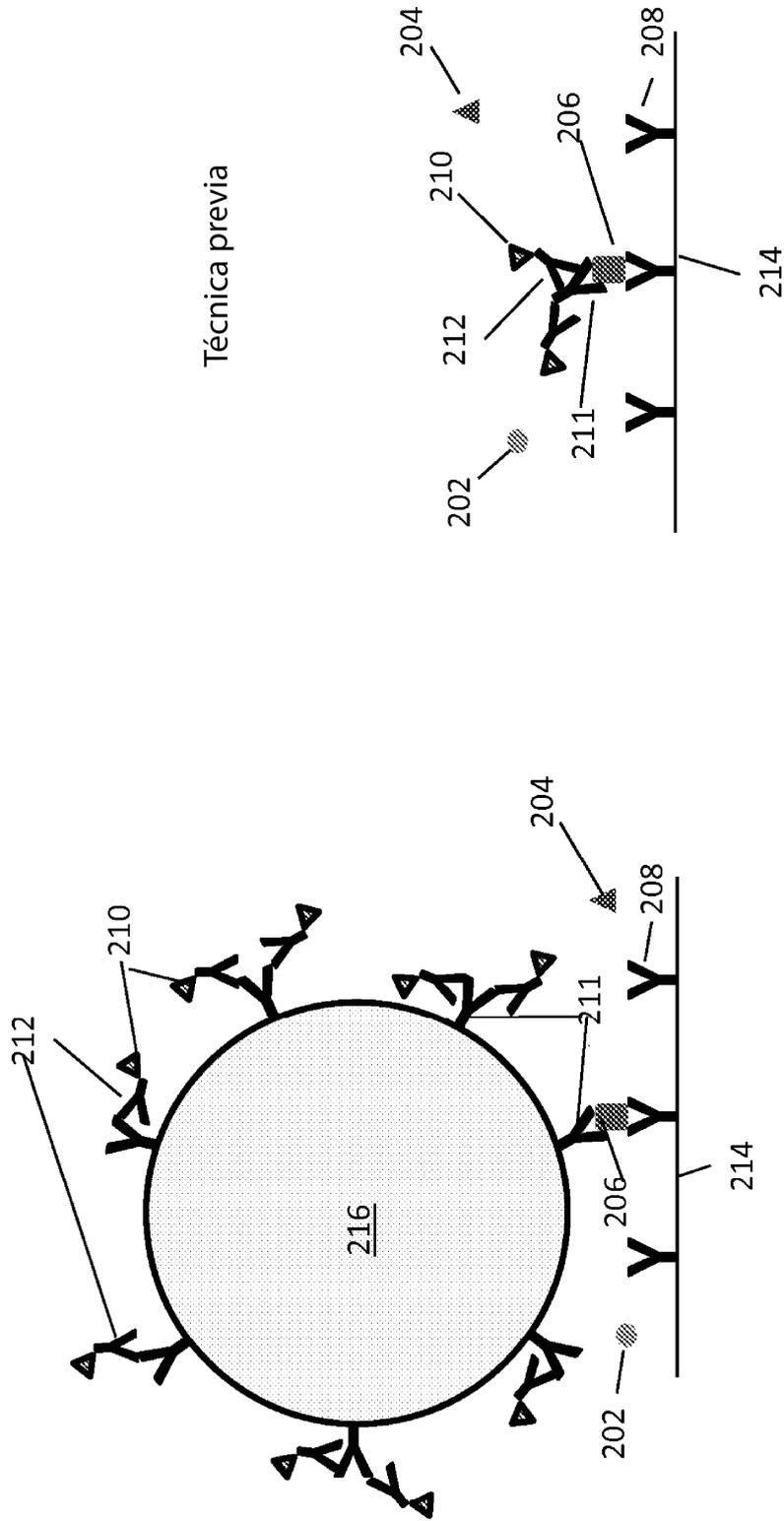


FIG. 1A

FIG. 1B

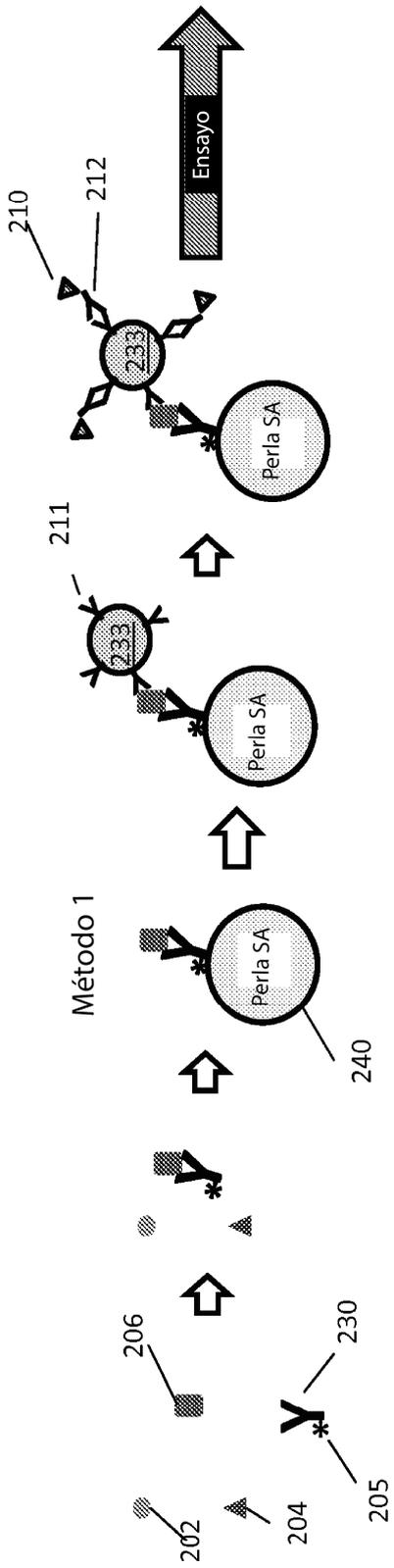


FIG. 2A

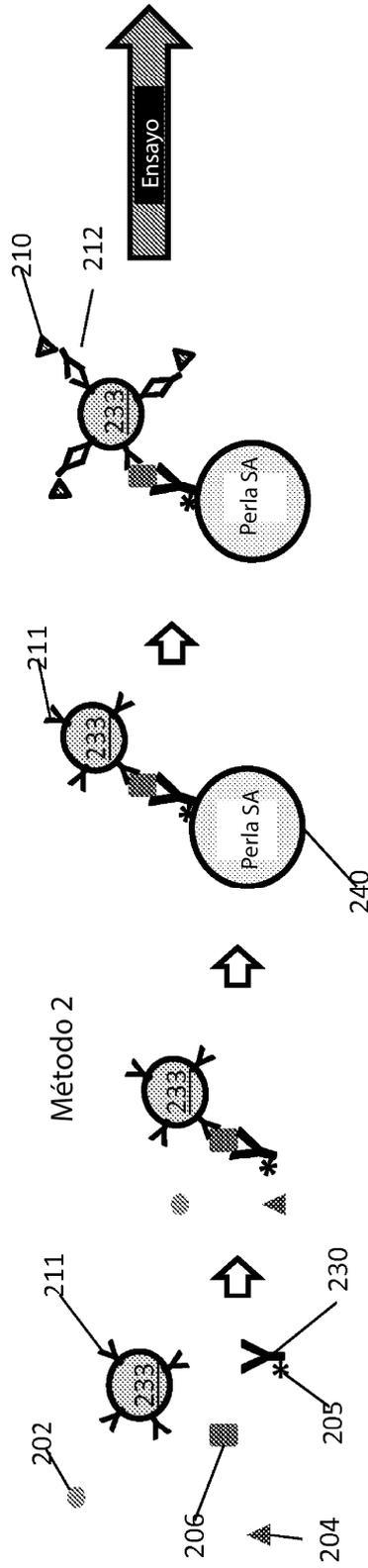


FIG. 2B

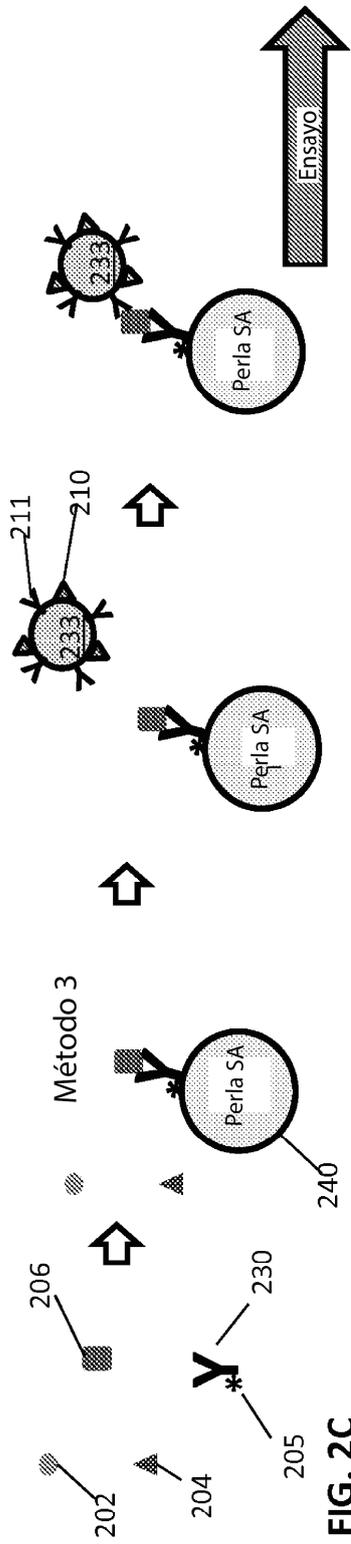


FIG. 2C

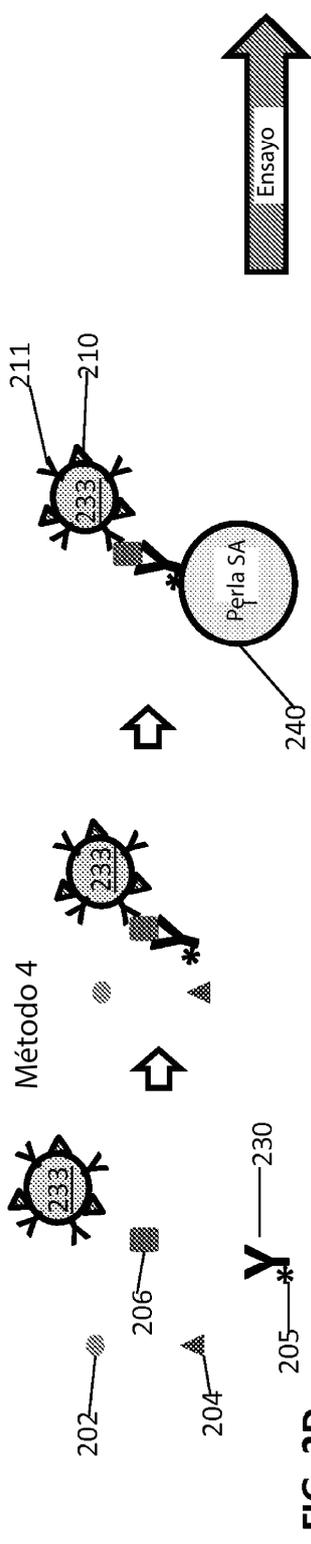


FIG. 2D

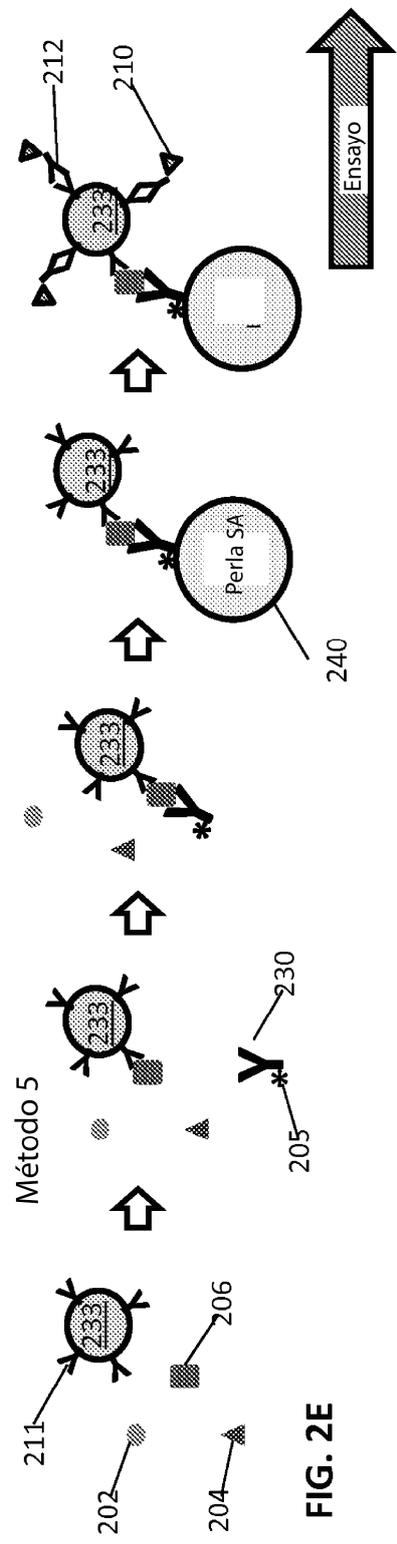


FIG. 2E