

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 129**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/AU2012/000330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12129611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2786150**

54 Título: **Detección de múltiples analitos**

30 Prioridad:

**31.03.2011 US 201161470359 P**

**31.03.2011 US 201161470395 P**

**15.08.2011 US 201161523687 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2018**

73 Titular/es:

**TGR BIOSCIENCES PTY LTD (100.0%)**

**31 Dalglish Street**

**Thebarton, SA 5031, AU**

72 Inventor/es:

**SHEEHAN, ANTONY JAMES;**

**OSMOND, RONALD IAN WILLIAM y**

**CROUCH, MICHAEL FRANCIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 693 129 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

Detección de múltiples analitos

**Campo**

La presente descripción se refiere a métodos para detectar múltiples analitos.

**5 Antecedentes**

En muchos casos, el análisis de una muestra requiere que se detecten múltiples analitos. Tradicionalmente, esto se ha llevado a cabo detectando los múltiples analitos mediante el análisis paralelo de la muestra. Sin embargo, existe una necesidad cada vez mayor de poder detectar múltiples analitos en una única muestra.

10 En ciertas circunstancias, es útil poder detectar múltiples analitos en la misma reacción. Esto se denomina en general "detección múltiple". Esto puede ocurrir por muchas razones, por ejemplo, en circunstancias en las que existe una cantidad limitante de muestra que se puede analizar, cuando no es ni práctico ni económico detectar analitos en reacciones diferentes, y/o cuando es ventajoso que la detección tenga lugar en el mismo medio de reacción.

15 A pesar de los avances en la detección de analitos en general, la detección de múltiples analitos sigue suponiendo un desafío en muchas situaciones, por ejemplo la detección de múltiples analitos en muestras biológicas y la detección de múltiples analitos en muestras complejas. La detección de analitos en tales muestras utiliza a menudo el reconocimiento del analito mediante la unión a otra molécula. Sin embargo, las técnicas que implican la unión del analito a otra molécula representan un desafío cuando es necesario detectar múltiples analitos en la misma reacción, lo que incluye, por ejemplo, uno o más de lo siguiente: la capacidad de distinguir entre diferentes analitos, el solapamiento y/o la interferencia entre las señales de detección, la sensibilidad insuficiente para permitir la detección de una cantidad baja de analito, y la interferencia de otros agentes en una muestra.

20 Además, la detección de múltiples analitos mediante el uso de ciertas tecnologías a menudo es cara y/o requiere la adquisición de un equipo nuevo, y por tanto invertir en tales tecnologías plantea una limitación financiera.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar métodos para la detección de múltiples analitos para abordar uno o más problemas de la técnica y/o proporcionar una o más ventajas.

El documento WO 2011/057347 A1 describe un método para detectar un analito en una muestra. El documento EP 2 550 147 A1 y Edwards et al., Lab on a Chip, vol. 11, nº 24, página 4267 (2011), describen cada uno un método, kit y dispositivo para detectar la presencia de como mínimo dos analitos proteicos diferentes en una muestra, en los que el dispositivo (es decir, sustrato) usado para este fin tiene unido a él como mínimo dos agentes de captura para detectar la presencia de como mínimo dos analitos diferentes. Wiese et al., Clinical Chemistry, 2001, página 1451, describe un ELISA multianalito para detectar la presencia de 3 analitos diferentes en una muestra (PSA, PSA-ACT e IL-6). Kartalov et al., Biotechniques, vol. 40, nº 1, páginas 85-90 (2006) describe un inmunoensayo microfluídico de alto rendimiento en el que se detectan 5 analitos diferentes según el principio del ELISA. Trune et al., Hearing Research, vol. 275, nº 1-2, páginas 1-7 (2010), describe la detección de citocinas en extractos de oído de ratón mediante el uso de 4 ELISAs múltiples diferentes para detectar simultáneamente de 16 a 60 citocinas diferentes. Liew et al., Biotechniques, vol. 42, nº 3, páginas 327-333 (2007) describe la detección de 9 antígenos mediante el uso de un ELISA múltiple. Cat # Qah-Mmp.: "Quantibody Human MMP Array 1 - quantitative measurement of 10 human matrix metalloproteinase related proteins" (XP55227057 (2010)) es un manual del usuario de RayBiotech que ejemplifica el principio de Quantibody descrito en Mao et al., Cytokine, vol. 52, nº 1-2, página 96 (2010) para detectar simultáneamente varios analitos mediante el uso del principio de ELISA. El documento WO 2005/017485 A2 describe un ELISA múltiple para detectar dos o más analitos en una muestra. Eason et al., Meso Scale Discovery, describe una placa de micropocillos en la que cada pocillo está revestido con 4 anticuerpos para capturar 4 proteínas diferentes (Akt; GSK-3 $\alpha$ ; Bad y p53). El documento WO 02/071067 A1 describe un método para determinar simultáneamente 2 o más proteínas modificadas mediante el uso de anticuerpos unidos a un sustrato. En los documentos anteriores, el sustrato se lava antes de la detección.

**Sumario**

La presente descripción se refiere a la detección de múltiples analitos. Ciertas realizaciones de la presente descripción se dirigen a métodos para detectar múltiples analitos.

50 En un aspecto, la presente invención se dirige a un método para detectar como mínimo dos analitos diferentes que no son ácidos nucleicos en una muestra, y el método comprende:

proporcionar a un recipiente de reacción:

- (i) como mínimo un sustrato sólido que comprende uno o más agentes de inmovilización, en el que el sustrato comprende una superficie de plástico o una superficie hidrófoba;

(ii) la muestra;

(iii) como mínimo dos agentes de captura diferentes que se unen a como mínimo dos analitos diferentes, y los como mínimo dos agentes de captura diferentes pueden estar inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido, en el que los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo;

5 (iv) como mínimo dos agentes detectables diferentes que se unen a los como mínimo dos analitos diferentes, en los que los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un anticuerpo; y

detectar los como mínimo dos analitos diferentes en la muestra detectando la presencia de los como mínimo dos analitos diferentes unidos al como mínimo un sustrato sólido, en el que la detección de los como mínimo dos analitos diferentes no comprende ningún lavado del como mínimo un sustrato sólido después de poner en  
10 contacto el como mínimo un sustrato sólido con la muestra, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes y uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes;

en el que el o los agentes de inmovilización se unen de manera pasiva al como mínimo un sustrato sólido;

15 en el que uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un ligando para el o los agentes de inmovilización, en el que el ligando se une a uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes;

en el que el ligando y uno del o de los agentes de inmovilización son un par de unión que comprende un marcador peptídico y un anticuerpo anti-peptídico; y

en el que los como mínimo dos analitos diferentes se detectan simultáneamente,

20 en el que uno o más de los como mínimo dos analitos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en una proteína, un componente de una ruta de señalización celular, una citocina, un inhibidor tumoral, o un anticuerpo.

En una realización, el método comprende proporcionar uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes a una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml.

25 En una realización adicional, el marcador peptídico comprende la secuencia peptídica DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) y el anticuerpo anti-peptídico comprende un anticuerpo anti-DYKDDDDK.

En una realización del método inventivo a) uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un fluoróforo, uno o más iones lantánidos, preferiblemente uno o más de  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , y  $\text{Dy}^{3+}$ ; y b) preferiblemente, uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Eu}^{3+}$ , y otro de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Sm}^{3+}$ .

30 En una realización adicional, el método comprende formar un complejo entre uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes, uno o más de los como mínimo dos analitos diferentes, y uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes antes o simultáneamente con la puesta en contacto del complejo con el como mínimo un sustrato sólido.

35 En una realización adicional del método inventivo, a) el como mínimo un sustrato sólido tiene una capacidad de unión total de 5  $\mu\text{g/ml}$  o menos para las proteínas, b) el recipiente de reacción comprende el como mínimo un sustrato sólido, c) el recipiente de reacción comprende una punta de pipeta, en el que la punta de pipeta comprende el como mínimo un sustrato sólido; y/o d) el como mínimo un sustrato sólido comprende una diversidad de microesferas, en el que preferiblemente la diversidad de microesferas están retenidas en la punta de pipeta.

40 En una realización adicional de la invención, la muestra es una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de células, un lisado celular o una combinación de cualquiera de las anteriormente mencionadas.

En una realización adicional de la invención, el método comprende la producción de como mínimo dos señales detectables diferentes, en las que:

45 a) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-610 nm,

b) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm,

50 c) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el

intervalo de 570-750 nm, o

d) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-750 nm.

5 En una realización adicional de la invención, la detección de los como mínimo dos analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o menos, y/o el método comprende proporcionar uno o más filtros y/o una o más fuentes de luz y/o uno o más detectores de luz a un dispositivo lector de placas para permitir la detección de los como mínimo dos analitos diferentes.

10 En una realización adicional de la invención, uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Eu}^{3+}$  y otro de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Sm}^{3+}$ .

### Breve descripción de las figuras

Ciertas realizaciones y ejemplos de referencia se ilustran mediante las siguientes figuras.

15 La Figura 1 muestra, con fines de comparación, tres protocolos de ELISA para la detección de ERK 1/2 fosforilado (pERK) que se examinaron mediante el uso de diversas concentraciones de un lisado celular que contenía pERK. (1) Un formato de ELISA simultáneo, en el que los componentes de ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-biotina), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de estreptavidina. (2) Un formato de ELISA de múltiples incubaciones estándar, en el que el anticuerpo de captura se incubó primero en una microplaca revestida de estreptavidina, seguido del analito, y finalmente el anticuerpo de detección. (3) Un formato de ELISA de múltiples incubaciones estándar, en el que el analito se incubó en una microplaca revestida de anticuerpo de captura, seguido de un anticuerpo de detección. Los ensayos se incubaron durante 30 min (Figura 1A) para cada etapa de incubación o 60 min (Figura 1B) para cada etapa de incubación, y los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar entre cada etapa de incubación para cada ensayo. Después de la incubación y el lavado final, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a  $550 \text{ nm}_{\text{ex}}/600 \text{ nm}_{\text{em}}$ . Las Figuras 1A y 1B muestran la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados a cada concentración de lisado de pERK analizada. En esta Figura, la comparación demuestra claramente un rendimiento de ensayo comparable a lo largo de un periodo de tiempo más corto cuando los componentes de ensayo se incuban simultáneamente, en comparación con los protocolos de ELISA estándar, en los que los componentes de ensayo se incuban de manera secuencial.

30 La Figura 2 muestra, con fines de comparación, tres protocolos de ELISA para la detección de ERK 1/2 fosforilado (pERK), mediante el uso de diversas concentraciones de un lisado celular que contenía pERK. (1) Un formato de ELISA simultáneo, en el que los componentes de ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-biotina), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de estreptavidina durante 30 min (Figura 2A) o 60 min (Figura 2B). (2) Un formato de ELISA de múltiples incubaciones estándar, en el que el anticuerpo de captura se incubó primero en una microplaca revestida de estreptavidina durante 10 min, seguido del analito durante 10 min, y finalmente el anticuerpo de detección durante 10 min, lo que proporcionó un tiempo de incubación de ensayo acumulativo total de 30 min (Figura 2A). (3) Un formato de ELISA de múltiples incubaciones estándar, en el que el analito se incubó en una microplaca revestida de anticuerpo de captura durante 30 min, seguido del anticuerpo de detección durante 30 min, lo que proporcionó un tiempo de ensayo acumulativo total de 60 min (Figura 1B). Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar entre cada etapa de incubación para cada ensayo. Después de la incubación y el lavado final, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a  $550 \text{ nm}_{\text{ex}}/600 \text{ nm}_{\text{em}}$ . Las Figuras 2A y 2B muestran la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados a cada concentración de lisado de pERK analizada. En esta Figura, la comparación demuestra claramente un mejor rendimiento de ensayo en el mismo periodo de tiempo de ensayo total cuando los componentes de ensayo se incuban simultáneamente, en comparación con los protocolos de ELISA estándar, en los que los componentes de ensayo se incuban de manera secuencial.

45 La Figura 3 muestra, con fines de comparación, la concentración del anticuerpo de captura (anti-fosfo-ERK) necesaria para un rendimiento de ensayo óptimo para tres protocolos de ELISA para la detección de ERK 1/2 fosforilado, mediante el uso de concentraciones variables del anticuerpo de captura en combinación con una concentración fija tanto de lisado celular como de anticuerpo de detección. (1) Un formato de ELISA simultáneo, en el que los componentes de ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-biotina), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de estreptavidina durante 120 min. (2) Un formato de ELISA simultáneo, en el que los componentes de ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-péptido), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de anticuerpo anti-péptido durante 120 min. (3) Un formato de ELISA de múltiples incubaciones estándar, en el que el analito se incubó en una microplaca revestida de anticuerpo de captura (no biotinilado) durante 120 min, seguido del anticuerpo de detección durante 120 min. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar entre cada etapa de incubación para cada ensayo.

Tras el ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP a los pocillos, y las placas se incubaron durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 3 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, la comparación demuestra claramente que se alcanza un rendimiento de ensayo óptimo con concentraciones inferiores de anticuerpo de captura cuando los componentes de ensayo se incuban de manera simultánea para los protocolos de captura con biotina y de captura con péptido, en comparación con los protocolos de ELISA estándar en los que los analitos se incuban de manera secuencial, y se lavan entre las incubaciones. Estos datos demuestran que el ensayo tiene la posibilidad de reducir los costes de fabricación de placas de ELISA.

La Figura 4 muestra, con fines de comparación, la necesidad de incubaciones secuenciales para un rendimiento de ensayo óptimo para dos protocolos de ELISA para la detección de ERK 1/2 fosforilado. (1) Un formato de ELISA simultáneo, en el que los componentes de ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-fosfo-ERK-péptido), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de anticuerpo anti-péptido durante 120 min. (2) Un formato de ELISA secuencial, en el que los componentes de ensayo en fase de disolución, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-péptido), el analito (lisado celular), y el anticuerpo de detección (anti-ERK-HRP), se incubaron simultáneamente en un recipiente de reacción diferente durante 60 min. Los componentes de ensayo se transfirieron posteriormente a una microplaca revestida de anticuerpo anti-péptido durante 60 min. Al final de la incubación en la microplaca de ensayo revestida de anticuerpo anti-péptido, ambos protocolos requirieron un ciclo de lavado estándar. Tras el ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP a los pocillos, y las placas se incubaron durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 4 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, la comparación demuestra claramente que no se consigue un beneficio en el rendimiento del ensayo con la inclusión de una etapa de preincubación antes de la introducción en un sustrato sólido que porta el agente de inmovilización.

La Figura 5 muestra un ELISA de una incubación y un lavado que se llevó a cabo mediante el uso de una configuración de 3 anticuerpos. Los componentes del ensayo, concretamente el anticuerpo de captura (anti-pERK-biotina), el analito (lisado celular), el anticuerpo de detección (anti-ERK de conejo), y un anticuerpo anti-conejo-HRP genérico, se incubaron simultáneamente en una microplaca revestida de estreptavidina durante 120 min (señal), y se comparó con un ensayo similar realizado con un control de tampón solamente por el analito (ruido). Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar tras la etapa de incubación, y se añadió el sustrato de HRP SigmaFAST™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal colorimétrica en los pocillos a 450 nm. La Figura 5 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados a cada concentración de lisado de pERK analizada. En esta Figura, el ensayo demuestra claramente la utilidad de que los componentes de ensayo se incuben simultáneamente.

La Figura 6 muestra la detección de diferentes quinasas mediante un ELISA de una incubación y un lavado. Se añadieron lisados celulares que contenían S6 p240/44, AKT pT308 o AKT pS473 fosforilados (señal), o controles con tampón solamente (ruido) a diferentes pocillos de una microplaca de ensayo (placa Nunc Maxisorp™ de 384 pocillos revestidos de estreptavidina). La reacción se inició mediante la adición de pares de anticuerpos específicos del objetivo (uno biotinilado y el otro conjugado a HRP) a los lisados. Los ensayos se incubaron durante 2 h, y después se sometieron a un ciclo de lavado. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y la placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 550 nm<sub>ex</sub>/600 nm<sub>em</sub>. La Figura 6 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, el ensayo demuestra claramente la eficacia para varios objetivos diferentes, en el que los componentes de ensayo se incuban simultáneamente.

La Figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un cartucho microfluídico adecuado para el uso de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente descripción.

La Figura 8 demuestra los resultados de la detección electroquímica de pERK en un sistema microfluídico. La Figura 8A muestra los resultados en bruto de la detección electroquímica (en mV) durante la fase de flujo de sustrato y la fase de incubación de sustrato. La Figura 8B muestra una curva patrón de pERK generada mediante el uso de los datos obtenidos de los 60 segundos tras la inyección de sustrato (durante la fase de flujo). La Figura 8C muestra una curva patrón de pERK generada mediante el uso de los datos obtenidos de 180 segundos tras la inyección de sustrato (al final de la fase de incubación de sustrato).

La Figura 9 muestra los resultados de la detección electroquímica de pAKT473 en un sistema microfluídico. La Figura 9A muestra los resultados en bruto de la detección electroquímica (en mV) durante la fase de flujo de sustrato y la fase de incubación de sustrato. La Figura 9B muestra una curva patrón de pAKT473 generada mediante el uso de los datos obtenidos de los 60 segundos tras la inyección de sustrato (durante la fase de flujo). La Figura 9C muestra una curva patrón de pAKT473 generada mediante el uso de los datos obtenidos de 180 segundos tras la inyección de sustrato (al final de la fase de incubación de sustrato).

La Figura 10 demuestra un rendimiento de ensayo equivalente con diversas permutaciones en el orden de administración de los componentes de ensayo al pocillo de ensayo, mediante el uso de (A) un conjugado anticuerpo de captura-péptido (anti-pERK-péptido), (B) o un conjugado anticuerpo de captura-biotina (anti-pERK-biotina), como

- reactivo de captura de ensayo. Los componentes del ensayo se añadieron en diversas permutaciones (véase el Ejemplo 7, Tablas 1 y 2). Se añadieron los componentes individuales del ensayo con una separación de 1 min a las placas y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, y después se sometieron a un ciclo de lavado. Tras el ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP a los pocillos, y las placas se incubaron durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 10 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, los ensayos demuestran claramente que cuando se añadieron en el periodo de tiempo corto descrito, el orden de la adición de los componentes de ensayo individuales no afecta al rendimiento del ensayo, en comparación con los componentes de ensayo que se añaden simultáneamente.
- 5 La Figura 11 muestra la detección de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  humanos recombinantes, en PBS/0,5% de BSA o suero humano. Se prepararon conjugados anticuerpo de captura-péptido, y conjugados anticuerpo de detección-HRP específicos para cada uno de EGF (A), IL-2 (B) y TNF $\alpha$  (C). Se prepararon EGF, IL-2 o TNF $\alpha$  recombinantes a concentraciones que oscilaron de 100 ng/mL a 10 fg/mL, en PBS/0,5% de BSA, o suero humano, y se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de cada analito a una placa de ensayo de ELISA revestida con un anticuerpo anti-péptido. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de mezclas que contenían ambos anticuerpos específicos hacia cada uno de EGF, IL-2 o TNF $\alpha$ , junto con una composición anti-HAMA general disponible comercialmente de Bioreclamation LLS (Westbury, NY, EE.UU. - reactivo inhibidor de inmunoglobulinas (IIR)), a los pocillos de una placa de ELISA adecuada. Los ensayos se incubaron durante 1 h, y después se sometieron a un ciclo de lavado. Tras el ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP a los pocillos, y las placas se incubaron durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 11 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, el ensayo demuestra claramente la eficacia para varios objetivos diferentes en suero, en el que los componentes de ensayo se incuban simultáneamente. La señal elevada para EGF en suero humano se debe a la presencia de proteína(s) EGF endógena(s) en este medio.
- 10 La Figura 12 muestra la detección de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  humanos recombinantes en un tiempo de ensayo total de 15 min. Se prepararon conjugados anticuerpo de captura-péptido, y conjugados anticuerpo de detección-HRP específicos para cada uno de EGF (A), IL-2 (B) y TNF $\alpha$  (C). Se prepararon EGF, IL-2 o TNF $\alpha$  recombinantes a concentraciones que oscilaron de 100 ng/mL a 10 fg/mL, en PBS/0,5% de BSA, y se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de cada analito a una placa de ensayo de ELISA revestida con un anticuerpo anti-péptido. Los ensayos se iniciaron mediante la adición de mezclas que contenían ambos anticuerpos específicos hacia cada uno de EGF, IL-2 o TNF $\alpha$  a los pocillos de una placa de ELISA adecuada. Los ensayos se incubaron durante 10 min, y después se sometieron a un ciclo de lavado. Tras el ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP a los pocillos, y las placas se incubaron durante 5 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 12 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, el ensayo demuestra claramente la detección eficaz en un tiempo de ensayo total de 15 min de varios objetivos diferentes, mediante el uso de ciertas realizaciones en las que los componentes de ensayo se incuban simultáneamente.
- 15 La Figura 13 muestra la variación intra-placa observada para 2 ELISAs diferentes de una incubación para fosfo-AKT (pSer473) o fosfo-STAT3.
- 20 La Figura 14 muestra la detección de TNF $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo tisular.
- 25 La Figura 15 muestra la detección de fosfo-AKT (pSer473) o fosfo-ERK en un tiempo total de ensayo de 25 min. Para cada objetivo, se diluyó (A) fosfo-AKT o (B) fosfo-ERK activos recombinantes tal como se indica, a diversas concentraciones, mediante el uso de tampón de lisis 1X que contenía un 0,1% de BSA, y se añadieron a 4 pocillos duplicados de una microplaca de 96 pocillos revestidos de estreptavidina. Para iniciar la reacción de ensayo, para cada objetivo, se añadió una mezcla del anticuerpo de captura conjugado a biotina y del anticuerpo de detección conjugado a HRP a los lisados, y se incubaron durante 1 hora. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar para cada ensayo. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 550 nm<sub>ex</sub>/600 nm<sub>em</sub>. Las Figuras 15A y 15B muestran los puntos de datos a cada concentración de analito analizada, para fosfo-AKT y fosfo-ERK, respectivamente. Ambos ensayos mostraron sensibilidad a menos de 1 ng/mL.
- 30 La Figura 16 muestra la detección de diversas concentraciones de IL-2 mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico/anticuerpo anti-marcador peptídico.
- 35 La Figura 17 muestra la detección de diversas concentraciones de IL-2 mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico/anticuerpo anti-marcador peptídico.
- 40 La Figura 18 muestra la detección de diversas concentraciones de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico/anticuerpo anti-marcador peptídico.
- 45 La Figura 19 muestra la señal obtenida para diversas concentraciones de analito mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico/anticuerpo anti-marcador peptídico.
- 50

La Figura 20 muestra una comparación de un sistema de captura biotina-estreptavidina con un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-peptido en un entorno biológico diverso.

5 La Figura 21A muestra que un sistema de captura estreptavidina/biotina que utiliza un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ve afectado por concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes. La Figura 21B muestra los datos de la Figura 21A que se han normalizado para expresar la proporción señal:ruido, en la que el ruido es la señal del inmunocomplejo obtenida para cada condición comparada con la señal obtenida en ausencia de analito.

10 La Figura 22A muestra que el sistema de captura anticuerpo anti-marcador peptídico - péptido que utiliza un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ve afectado por las concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes. La Figura 22B muestra los datos de la Figura 22A que se han normalizado para expresar la proporción señal:ruido, en la que el ruido es la señal del inmunocomplejo obtenida para cada condición comparada con la señal obtenida en ausencia de analito.

15 La Figura 23 muestra la detección de anticuerpos marcados con lantánidos. Se marcaron dos anticuerpos con lantánidos con kits de marcaje de PerkinElmer: Un anticuerpo anti-EGF se marcó con europio mediante el uso de un kit de marcaje con Eu, número de cat. de PerkinElmer 1244-302. Un anticuerpo IL-2 se marcó con samario mediante el uso de un kit de marcaje con Sm, número de cat. de PerkinElmer 1244-303. Los anticuerpos se incubaron con las respectivas disoluciones de lantánidos durante 16 horas a temperatura ambiente, y los conjugados se desalaron después mediante el uso de una columna PD10. Se construyeron las curvas patrón para cada conjugado mediante el uso de diluciones  $\log_{10}$  de los conjugados, y las concentraciones máximas para Eu y Sm fueron 10 nM y 100 nM, respectivamente. Las lecturas de fluorescencia resuelta en el tiempo para estas disoluciones se estudiaron en placas de microtitulación en un lector de placas Victor II (PerkinElmer). Las longitudes de onda de excitación y emisión para estos lantánidos fueron: Europio: Excitación 340 nm/Emisión 615 nm; Samario: Excitación 340 nm/Emisión 642 nm.

La Figura 24 muestra la detección doble de EGF e IL-2 mediante el uso de anticuerpos marcados con lantánidos en un lector de placas con el uso de detección de fluorescencia resuelta en el tiempo.

25 La Figura 25 muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu$ M.

La Figura 26 muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu$ M.

30 La Figura 27 muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu$ M.

La Figura 28 muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu$ M.

La Figura 29 muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu$ M.

35 La Figura 30 muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu$ M.

### Descripción detallada

La presente descripción se refiere a la detección de múltiples analitos. Ciertas realizaciones de la presente descripción se dirigen a métodos para detectar múltiples analitos en una muestra.

40 Ciertas realizaciones descritas proporcionan métodos para detectar múltiples analitos que tienen una o más combinaciones de ventajas. Por ejemplo, algunas de las ventajas de las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen una o más de las siguientes: la capacidad de distinguir múltiples analitos en una muestra; la capacidad de distinguir múltiples analitos en el mismo medio de reacción; una reducción del solapamiento en las señales de detección usadas para detectar los múltiples analitos; una reducción de la interferencia entre las señales de detección usadas para detectar los múltiples analitos; proporcionar una sensibilidad suficiente para permitir la detección de cantidades bajas de múltiples analitos; la interferencia reducida de otros agentes en una muestra; la sencillez y/o ahorro en la detección de múltiples analitos; la capacidad de usar los equipos existentes para detectar los múltiples analitos; y la capacidad de usar los equipos existentes para detectar los múltiples analitos en el mismo recipiente de reacción, tales como lectores de placas existentes.

50 También se describen otras ventajas de ciertas realizaciones de la presente descripción en la presente memoria. Por ejemplo, ciertas realizaciones pueden tener una o más combinaciones de las siguientes ventajas: proporcionar un sistema de ensayo que usa cantidades bajas de reactivos para capturar y detectar los múltiples analitos; proporcionar un sistema de ensayo que tiene una capacidad elevada de unión de reactivos; reducir el tiempo usado para detectar los múltiples analitos; reducir el número de etapas de incubación para detectar los múltiples analitos;

proporcionar una detección fiable de múltiples analitos; eliminar la necesidad de preincubación de ciertos componentes durante la detección de los múltiples analitos; reducir el número de etapas de dispensación durante la detección de los múltiples analitos; reducir el número de etapas de aspiración durante la detección de los múltiples analitos; reducir los costes de tiempo y/o manipulación necesarios para llevar a cabo el ensayo; usar una única plataforma de ensayo para detectar los múltiples analitos.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para detectar como mínimo dos analitos diferentes que no son ácidos nucleicos en una muestra, y el método comprende:

proporcionar a un recipiente de reacción:

- (i) como mínimo un sustrato sólido que comprende uno o más agentes de inmovilización, en el que el sustrato comprende una superficie de plástico o una superficie hidrófoba;
- (ii) la muestra;
- (iii) como mínimo dos agentes de captura diferentes que se unen a como mínimo dos analitos diferentes, y los como mínimo dos agentes de captura diferentes pueden estar inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido, en el que los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo;
- (iv) como mínimo dos agentes detectables diferentes que se unen a los como mínimo dos analitos diferentes, en los que los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un anticuerpo; y

detectar los como mínimo dos analitos diferentes en la muestra detectando la presencia de los como mínimo dos analitos diferentes unidos al como mínimo un sustrato sólido, en el que la detección de los como mínimo dos analitos diferentes no comprende ningún lavado del como mínimo un sustrato sólido después de poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con la muestra, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes y uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes;

en el que el o los agentes de inmovilización se unen de manera pasiva al como mínimo un sustrato sólido;

en el que uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un ligando para el o los agentes de inmovilización, en el que el ligando se une a uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes;

en el que el ligando y uno del o de los agentes de inmovilización son un par de unión que comprende un marcador peptídico y un anticuerpo anti-peptídico; y

en el que los como mínimo dos analitos diferentes se detectan simultáneamente,

en el que uno o más de los como mínimo dos analitos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en una proteína, un componente de una ruta de señalización celular, una citocina, un inhibidor tumoral, o un anticuerpo.

La presente descripción surge, al menos en parte, de la determinación de que se pueden usar múltiples agentes de captura para detectar múltiples analitos, mediante el uso de un sistema de ensayo por el cual se pueden inmovilizar los agentes de captura en un sustrato sólido.

En ciertas realizaciones, los métodos para la detección de analitos diferentes comprenden un único recipiente de reacción.

La presente descripción también proporciona el uso de un recipiente de reacción para detectar los analitos diferentes.

La detección de múltiples analitos en el mismo medio de reacción, tal como un recipiente de reacción, se denomina a veces "detección múltiple", y la detección de dos analitos diferentes se denomina a veces "detección doble", y la detección de tres analitos diferentes se denomina a veces "detección triple", etc.

Ciertas realizaciones proporcionan métodos para detectar como mínimo 2, como mínimo 3, como mínimo 4, como mínimo 5, como mínimo 6 analitos diferentes en la muestra. En ciertas realizaciones, el método comprende detectar como mínimo 2 o como mínimo 3 analitos diferentes en la muestra. Otros aspectos proporcionan métodos para detectar 2 a 4, 2 a 5, 2 a 6, 3 a 5, 3 a 6, o 4 a 6 analitos diferentes en la muestra.

La detección múltiple de analitos, por ejemplo, plantea varios desafíos respecto de la detección estándar en serie o en paralelo de analitos. Los ejemplos de tales desafíos incluyen uno o más de lo siguiente: incapacidad de distinguir entre analitos diferentes, solapamiento y/o interferencia entre las señales de detección, sensibilidad insuficiente para permitir la detección de una cantidad baja de analitos, interferencia de otros agentes en una muestra, resultados coherentes en múltiples ensayos, la incapacidad de usar los equipos existentes, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de los equipos incluyen los lectores (por ejemplo, lectores de placas) que utilizan fluorescencia,

luminiscencia, absorbancia, polarización de fluorescencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo, tecnologías que utilizan la formación de imágenes, tales como cámaras CCD para la formación de imágenes.

5 Como se describe en la presente memoria, ciertas realizaciones proporcionan métodos para detectar analitos diferentes que no son ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, los analitos diferentes comprenden dos o más analitos diferentes que no son ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, los analitos diferentes que no son ácidos nucleicos comprenden una diversidad de analitos diferentes que no son ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, los analitos diferentes que no son ácidos nucleicos comprenden como mínimo dos analitos diferentes que no son ácidos nucleicos.

10 Ciertas realizaciones se basan en la captura de un analito mediante un agente de captura por medio de un mecanismo que no se basa sustancialmente en interacciones ácido nucleico - ácido nucleico, tales como la unión basada en el emparejamiento de bases complementarias. Ciertas realizaciones se pueden basar en la captura de uno o más analitos mediante uno o más agentes de captura por medio de un mecanismo que no se basa sustancialmente en interacciones ácido nucleico - ácido nucleico, tales como la unión basada en el emparejamiento de bases complementarias. Dicho esto, se entenderá que, en ciertas realizaciones, el o los analitos pueden comprender un componente de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el mecanismo puede ser una combinación de diferentes tipos de mecanismos. En ciertas realizaciones, la unión de un analito a un agente de captura se basa sustancialmente en interacciones hidrófobas, hidrófilas, no iónicas, iónicas, por enlaces de hidrógeno, polianiónicas-policatiónicas, de van der Waals, o combinaciones de las mismas, que no incluyen sustancialmente las interacciones ácido nucleico - ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes de captura diferentes se unen a los como mínimo dos analitos diferentes. En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes de captura diferentes se unen principalmente a los como mínimo dos analitos diferentes. La expresión "se unen principalmente" se refiere a la unión de un agente (por ejemplo, un agente de captura o un agente detectable) a una molécula objetivo como su molécula de unión principal, aunque no se excluye la unión del agente a otra u otras moléculas.

Los ejemplos de analitos que se pueden detectar en los métodos incluyen microbios, virus, proteínas, macromoléculas, moléculas pequeñas, fármacos o combinaciones adecuadas de los mismos. También se contemplan otros tipos de analitos. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes comprenden una proteína. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes comprenden una fosfoproteína. Los ejemplos de fosfoproteínas son ERK, S6 RP p240/244, AKT pT308 o AKT pS473 fosforiladas. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes se pueden seleccionar, por ejemplo, de un componente de una ruta de señalización celular, una citocina, un inhibidor tumoral, un anticuerpo o un fragmento de los mismos, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes comprenden una forma o estado particular de una molécula, tal como una forma o estado particular de una proteína. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la proteína está fosforilada, metilada, glicosilada o una combinación de las mismas. En estas realizaciones, un agente de captura puede tener especificidad solamente hacia una forma de la proteína (por ejemplo, un agente de captura se puede unir solamente a una forma fosforilada de la proteína y no a una forma sin fosforilar de la proteína). En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes se pueden seleccionar, por ejemplo, de fosfo-ERK 1/2; ERK 1/2 total; fosfo-Akt 1/2/3; Akt 1/2/3 total; fosfo-NF-κβ p65; NF-κβ p65 total; fosfo-1-kBα; kBβ total; fosfo-STAT3; STAT3 total; fosfo-STAT5 A/B; fosfo-JNK 1/2/3; JNK 1/2/3 total; fosfo-p38 MAPKα; p38 MAPKα total; fosfo-p53; p53 total; fosfo-p70S6K; p70S6K total; y GAPDH.

En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes está presente en una muestra a una concentración de 100 ng/ml o menos, 10 ng/ml o menos, 1 ng/ml o menos, 100 pg/ml o menos, 10 pg/ml o menos, 1 pg/ml o menos, 100 fg/ml o menos, 10 fg/ml o menos, o 1 fg/ml o menos. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes está presente en la muestra a una concentración de 100 ng/ml o más, 10 ng/ml o más, 1 ng/ml o más, 100 pg/ml o más, 10 pg/ml o más, 1 pg/ml o más, 100 fg/ml o más, 10 fg/ml o más, 1 fg/ml o más. En ciertas realizaciones, uno o más de los analitos diferentes está presente en la muestra a una concentración de 1 fg/ml a 100 ng/ml, 1 fg/ml a 10 ng/ml, 1 fg/ml a 1 ng/ml, 10 fg/ml a 100 ng/ml, 10 fg/ml a 10 ng/ml, 10 fg/ml a 1 ng/ml, 100 fg/ml a 100 ng/ml, 100 fg/ml a 10 ng/ml, 100 fg/ml a 1 ng/ml, 1 pg/ml a 100 ng/ml, 1 pg/ml a 10 ng/ml, o 1 pg/ml a 1 ng/ml.

En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes en una muestra comprende una determinación cualitativa de si los dos o más analitos diferentes están presentes o ausentes en la muestra. En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende una determinación cuantitativa de los niveles de dos o más analitos diferentes en la muestra. Por ejemplo, ciertas realizaciones de los métodos permiten la cuantificación de la concentración de dos o más analitos diferentes en la muestra. Se conocen los métodos para el cálculo de la concentración de los analitos.

Ciertas realizaciones proporcionan la detección de analitos diferentes en una muestra. Por ejemplo, la muestra puede ser una mezcla, una composición, una disolución, una muestra enriquecida, una muestra que puede contener dos o más analitos diferentes o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la muestra comprende una muestra de laboratorio, una muestra de investigación, una muestra médica, una muestra biológica, una muestra de células, una muestra de agua, una muestra alimentaria, y una muestra agrícola, un derivado de estas muestras, un

extracto de estas muestras, o combinaciones de las mismas. Ciertas realizaciones proporcionan la detección de analitos diferentes a partir de una única muestra.

5 En ciertas realizaciones, la muestra comprende una muestra médica o una muestra de células, tal como una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de tejido, una muestra de orina, una muestra de leche, un lisado celular, un derivado o extracto de estas, o combinaciones adecuadas de las mismas. En ciertas realizaciones, la muestra se pretrata antes de detectar dos o más de los analitos diferentes. Por ejemplo, la muestra se puede preaclara, concentrar, diluir, inducir, pretratar, procesar para eliminar uno o más componentes o impurezas de la muestra, o combinaciones adecuadas de los mismos. En ciertas realizaciones, la muestra no comprende células fijadas.

10 Con respecto a las muestras biológicas, una deficiencia de muchos métodos previos para la detección de múltiples proteínas es que no son adecuados para el uso con muestras con niveles moderados a elevados de proteínas (por ejemplo, como ocurre a menudo en las muestras que comprenden suero o lisados celulares). En al menos ciertas realizaciones, los métodos descritos son capaces de manejar tales muestras. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el método se puede llevar a cabo en presencia de concentraciones de proteínas moderadas o elevadas. Las  
15 concentraciones de proteínas moderadas o elevadas se pueden introducir, por ejemplo, durante las etapas de bloqueo, y/o pueden estar incluidas en la propia muestra. Por ejemplo, la muestra puede comprender una muestra de suero que puede tener una concentración de proteínas de hasta aproximadamente 60-80 mg/ml, una muestra de lisado celular que puede tener una concentración de proteínas de aproximadamente 1-3 mg/ml, o una muestra de un ensayo basado en células que puede incluir una contaminación de proteínas de suero bovino fetal (FBS), o  
20 similares, que se puede usar en los medios de cultivo celular. También se contemplan otras combinaciones de muestras. La contaminación de proteínas de los medios también puede representar un porcentaje de la contaminación de proteínas, por ejemplo, 1-5% de la contaminación de proteínas final en un lisado celular, que se puede traducir a aproximadamente 0,6-4 mg/ml de proteína además de las proteínas celulares.

25 En ciertas realizaciones, la muestra comprende una concentración de proteína de 0,01 mg/ml o más, una concentración de proteína de 0,1 mg/ml o más, una concentración de proteína de 1 mg/ml o más, una concentración de proteína de 2 mg/ml o más, una concentración de proteína de 10 mg/ml o más, una concentración de proteína de 20 mg/ml o más, una concentración de proteína de 30 mg/ml o más, una concentración de proteína de 40 mg/ml, una concentración de proteína de 50 mg/ml o más, o una concentración de proteína de 60 mg/ml o más. En ciertas realizaciones, la muestra puede comprender una concentración de proteína de 0,01 mg/ml o menos, una  
30 concentración de proteína de 0,1 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 1 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 2 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 10 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 20 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 30 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 40 mg/ml o menos, una concentración de proteína de 50 mg/ml o menos, o una concentración de proteína de 60 mg/ml o menos. En ciertas realizaciones, la muestra comprende una concentración  
35 de proteína de 0,01 mg/ml a 60 mg/ml, 0,01 mg/ml a 50 mg/ml, 0,01 mg/ml a 40 mg/ml, 0,01 mg/ml a 30 mg/ml, 0,01 mg/ml a 20 mg/ml, 0,01 mg/ml a 10 mg/ml, 0,01 mg/ml a 2 mg/ml, 0,01 mg/ml a 1 mg/ml, 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml, 0,1 mg/ml a 60 mg/ml, 0,1 mg/ml a 50 mg/ml, 0,1 mg/ml a 40 mg/ml, 0,1 mg/ml a 30 mg/ml, 0,1 mg/ml a 20 mg/ml, 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, 0,1 mg/ml a 2 mg/ml, 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, 1 mg/ml a 60 mg/ml, 1 mg/ml a 50 mg/ml, 1 mg/ml a 40 mg/ml, 1 mg/ml a 30 mg/ml, 1 mg/ml a 20 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml, 1 mg/ml a 2 mg/ml, 2 mg/ml a 60 mg/ml, 2  
40 mg/ml a 50 mg/ml, 2 mg/ml a 40 mg/ml, 2 mg/ml a 30 mg/ml, 2 mg/ml a 20 mg/ml, 2 mg/ml a 10 mg/ml, 10 mg/ml a 60 mg/ml, 10 mg/ml a 50 mg/ml, 10 mg/ml a 40 mg/ml, 10 mg/ml a 30 mg/ml, o 10 mg/ml a 20 mg/ml.

Los métodos de la presente descripción son compatibles en ciertas realizaciones para la detección de analitos diferentes en una diversidad de entornos biológicos, tales como lisados celulares, y/o suero.

45 Ciertas realizaciones proporcionan la detección de analitos diferentes en uno o más medios de reacción. Por ejemplo, la detección de dos o más analitos se puede dar en el mismo medio de reacción, o en un primer medio de reacción seguido de uno o más medios de reacción adicionales. Por ejemplo, la detección de uno de los como mínimo dos analitos unidos al como mínimo un sustrato se puede dar en un primer recipiente de reacción, seguido de la transferencia del como mínimo un sustrato sólido a un segundo recipiente de reacción, y la detección de uno o más analitos adicionales. En ciertas realizaciones, la detección de los como mínimo dos analitos se da en un único  
50 recipiente de reacción.

El recipiente de reacción, en ciertas realizaciones, es un recipiente físico en el que se detectan los analitos diferentes. Este puede ser un único recipiente de reacción, sin embargo, también se pueden usar otras formas de recipientes de reacción. Los ejemplos de recipientes de reacción incluyen un tubo de ensayo, un tubo de microcentrífuga, un pocillo, un dispositivo de almacenamiento y dispensación de líquidos (tal como una punta de pipeta) o un matraz. En ciertas realizaciones, el recipiente de reacción comprende un pocillo de una placa  
55 multipocillo, tal como una placa de microtitulación, o un pocillo o superficie de un dispositivo microfluídico. Las placas multipocillo son un ejemplo de una plataforma de ensayo que comprende una diversidad de recipientes de reacción. En ciertas realizaciones, el recipiente de reacción comprende una punta de pipeta. En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se lleva a cabo en la punta de pipeta.

60 En cierta realización, el recipiente de reacción es parte de una plataforma de ensayo que comprende una diversidad

de recipientes de reacción. Los ejemplos de plataformas de ensayo incluyen una placa multipocillo o una placa de microtitulación.

5 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende sustratos sólidos diferentes. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende como mínimo dos sustratos sólidos. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende como mínimo tres sustratos sólidos. En ciertas realizaciones, hay como mínimo un sustrato sólido para cada especie de agente de captura proporcionado.

10 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido está asociado con la totalidad, una porción sustancial o parte de un recipiente de reacción. En ciertas realizaciones, el sustrato sólido es la totalidad, sustancialmente la totalidad o parte del recipiente de reacción. Por ejemplo, el como mínimo un sustrato sólido puede ser parte integrante de sustancialmente la totalidad, una porción sustancial o parte del recipiente de reacción, el como mínimo un sustrato sólido puede formar la totalidad, una porción sustancial o parte de la superficie del recipiente de reacción (tal como la superficie de un pocillo de una placa de microtitulación), o puede estar unido al recipiente de reacción. También se contemplan otras combinaciones.

15 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido es diferente del recipiente de reacción. De nuevo, puede ser un único recipiente de reacción, si se desea. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido es movilizable y se puede añadir al recipiente de reacción. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido es una o más microesferas, una o más partículas suspendibles, una matriz de afinidad, una resina, un gel, una suspensión espesa, una tira, o una tira reactiva. También se contemplan las combinaciones de tipos  
20 diferentes de sustratos, que incluyen los sustratos anteriormente mencionados. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido se retiene en el recipiente de reacción, tal como se retiene en un dispositivo de almacenamiento y dispensación de líquidos, tal como una punta usada para pipetear. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido puede ser una o más microesferas retenidas en una punta de pipeta. En este ejemplo, la muestra y los como mínimo dos agentes de captura se pueden introducir, por ejemplo, en  
25 la punta y uno o más de los agentes de captura se inmovilizan en el sustrato sólido retenido en la punta. En ciertas realizaciones, la punta de pipeta comprende el como mínimo un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende una o más microesferas, y la o las microesferas están retenidas en la punta de pipeta. En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura se pueden preinmovilizar en el como mínimo un sustrato sólido, por ejemplo una punta de pipeta puede comprender agentes de captura  
30 preinmovilizados

En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende una diversidad de microesferas. En ciertas realizaciones, las microesferas son microesferas magnéticas, microesferas que incluyen un colorante, microesferas mantenidas en una punta de pipeta o una combinación de una o más de las anteriormente mencionadas. Se conocen los métodos para el uso de microesferas, que incluyen microesferas magnéticas y microesferas que  
35 incluyen colorantes.

En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido puede ser transparente, semi-transparente, translúcido, o coloreado, dependiendo de si el método de detección implica una lectura colorimétrica, fluorimétrica y/u otros tipos de lectura.

40 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes en la muestra comprende la detección de la presencia de los como mínimo dos analitos diferentes unidos al como mínimo un sustrato sólido por medio de los como mínimo dos agentes de captura diferentes inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción.

45 En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden como mínimo tres, como mínimo cuatro, como mínimo cinco, como mínimo seis, como mínimo siete, como mínimo ocho, como mínimo nueve, como mínimo diez, como mínimo once, o como mínimo doce agentes de captura diferentes.

En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura no se pre-unen o pre-inmovilizan en el como mínimo un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura se pre-unen o pre-inmovilizan en el como mínimo un sustrato sólido.

50 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, uno o más agentes de captura pueden estar unidos o inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido antes de la exposición a la muestra y/o los como mínimo dos analitos y/u otro u otros reactivos. Por ejemplo, uno o más agentes de captura pueden estar pre-unidos o pre-inmovilizados en una o más microesferas retenidas en una punta de pipeta, y la muestra y otros reactivos se introducen en la punta.

En ciertas realizaciones, uno o más agentes de captura no se pre-unen o pre-inmovilizan en el como mínimo un sustrato sólido.

55 Como se describe en la presente memoria, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se pueden unir o inmovilizar de manera pasiva al como mínimo un sustrato sólido. Se conocen los métodos para unir o inmovilizar de manera pasiva un agente a un sustrato sólido. Los ejemplos de tal unión incluyen la unión por medio

de interacciones no covalentes tales como una interacción hidrófila, una interacción hidrófoba, una interacción entre cargas (iónica), una interacción de van de Waals, o combinaciones de tales interacciones. Los ejemplos de unión pasiva incluyen la absorción en un sustrato sólido.

5 Como también se describe en la presente memoria, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se pueden unir de manera activa al como mínimo un sustrato sólido. Por ejemplo, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se pueden unir al como mínimo un sustrato sólido por medio de unión covalente.

10 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende dos o más agentes de captura diferentes y dos o más analitos diferentes que forman un complejo. En ciertas realizaciones, como mínimo dos agentes de captura diferentes y como mínimo dos analitos diferentes forman un complejo.

En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende la unión de dos o más complejos al como mínimo un sustrato sólido para formar dos o más complejos inmovilizados.

15 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende poner en contacto la muestra, dos o más agentes de captura diferentes y el como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción, para formar una mezcla puesta en contacto.

20 En ciertas realizaciones, los componentes se ponen en contacto en el recipiente de reacción, para permitir la formación de complejos entre los dos o más agentes de captura diferentes y dos o más de los analitos diferentes, y los complejos son capaces de ser inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido simultáneamente o después de la formación. Como se describe en la presente memoria, en ciertas realizaciones esto puede proporcionar ventajas al rendimiento de la presente descripción.

En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se pueden unir al como mínimo un sustrato sólido por medio de una interacción específica con una molécula de unión del como mínimo un sustrato sólido.

25 En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes no se adsorben o pre-revisten de manera pasiva en el como mínimo un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, ninguno de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se adsorbe o pre-reviste en el como mínimo un sustrato sólido.

30 Se conocen los métodos para unir de manera covalente un agente a un sustrato sólido. Por ejemplo, el sustrato sólido puede comprender uno o más ligadores que facilitan la unión covalente de los agentes de captura al sustrato sólido. Por ejemplo, un ligador puede comprender glutatión, anhídrido maleico, un quelato metálico, o maleimida. También se pueden usar otros ligadores o combinaciones de ligadores. Los agentes de captura se pueden unir después al sustrato sólido por medio de un ligador. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido no comprende uno o más ligadores para la unión covalente de uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes al como mínimo un sustrato sólido.

35 En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se unen de manera pasiva al sustrato sólido y uno o más de los agentes de captura restantes se unen de manera activa al sustrato sólido.

40 Según la presente invención, el como mínimo un sustrato sólido comprende uno o más agentes de inmovilización mediante los cuales se pueden inmovilizar uno o más agentes de captura. Por ejemplo, se pueden usar uno o más agentes de inmovilización en el como mínimo un sustrato sólido para unir uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes, y de ese modo se inmovilizan uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes en el sustrato sólido. Se conocen los métodos para la unión de un agente de inmovilización a un sustrato sólido. Como se describe en la presente memoria, se pueden unir uno o más agentes de inmovilización al como mínimo un sustrato sólido mediante una unión covalente al sustrato sólido. Los métodos para unir de manera covalente un agente de inmovilización a un sustrato sólido se conocen en la técnica.

45 Como también se describe en la presente memoria, el como mínimo un sustrato sólido puede comprender un ligador que facilita la unión covalente del o de los agentes de inmovilización al como mínimo un sustrato sólido. Por ejemplo, el ligador puede comprender glutatión, anhídrido maleico, un quelato metálico, maleimida o combinaciones de los mismos. El agente de inmovilización se puede unir después al como mínimo un sustrato sólido por medio del ligador.

50 Según la presente invención, el agente de inmovilización se une al como mínimo un sustrato sólido por medio de una unión pasiva. Se conocen los métodos para unir de manera pasiva un agente de inmovilización a un sustrato sólido. Los ejemplos de tal unión no covalente o pasiva incluyen interacciones tales como una interacción hidrófila, una interacción hidrófoba, una interacción entre cargas (iónica), una interacción de van de Waals, o combinaciones de tales interacciones. Por ejemplo, se pueden unir de manera pasiva anticuerpos o estreptavidina (y/o derivados de los mismos) a un sustrato sólido hidrófobo.

55 En ciertas realizaciones, el recipiente de reacción comprende un agente de inmovilización unido. Por ejemplo, un

recipiente de reacción puede tener un agente de inmovilización unido al recipiente de reacción. En ciertas realizaciones, un recipiente de reacción comprende un agente de inmovilización unido. En ciertas realizaciones, una plataforma de ensayo comprende una diversidad de recipientes de reacción, y como mínimo un recipiente de reacción comprende un agente de inmovilización unido.

- 5 En ciertas realizaciones, la unión de un agente de captura a un agente de inmovilización se da por medio de un ligando específico (asociado con, o parte de, el agente de captura) que se une a un receptor específico (asociado con, o parte de, el agente de inmovilización).

10 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido que comprende uno o más agentes de inmovilización unidos se puede tratar con un/varios agente(s) bloqueante(s) que se une(n) de manera inespecífica a y sustancialmente saturan los sitios de unión para impedir o reducir la unión indeseable de ligando(s) u otros componentes a los sitios en exceso de un sustrato sólido. Los ejemplos de agentes bloqueantes incluyen gelatina, BSA, albúmina de huevo, caseína, leche descremada o combinaciones de las mismas.

15 En ciertas realizaciones, se incluye un agente bloqueante durante las reacciones de unión. Por ejemplo, el como mínimo un sustrato sólido se trata con un/varios agente(s) bloqueante(s) antes de la adición de uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes. El como mínimo un sustrato sólido también se puede tratar con un/varios agente(s) bloqueante(s) de manera simultánea con la adición de uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes.

20 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende una sustancia que favorece la unión de un agente de inmovilización, y/o se trata para favorecer la unión de un agente de inmovilización. El como mínimo un sustrato sólido puede comprender una superficie de plástico que incluye, por ejemplo, una superficie de poliestireno, una superficie de poli(cloruro de vinilo), una superficie de ciclo-olefina o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende una superficie hidrófoba.

25 En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido se trata para incrementar la afinidad de unión de un agente de inmovilización al sustrato sólido. Por ejemplo, el como mínimo un sustrato sólido se puede irradiar y/o funcionalizar para permitir la unión covalente entre el sustrato y un agente de inmovilización.

30 En ciertas realizaciones, la capacidad de unión del como mínimo un sustrato sólido para los como mínimo dos agentes de captura diferentes es 200 ng/ml o más, 500 ng/ml, 1 µg/ml o más, 2 µg/ml o más, 3 µg/ml o más, 4 µg/ml o más, o 5 µg/ml o más. En ciertas realizaciones, la capacidad de unión es de 5 µg/ml o menos, 4 µg/ml o menos, 3 µg/ml o menos, 2 µg/ml o menos, 1 µg/ml o menos, 500 ng/ml o menos o 200 ng/ml o menos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones en las que uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes es un agente de captura de anticuerpo, la capacidad de unión del como mínimo un sustrato sólido es en general de 2 µg/ml para una placa de microtitulación estándar. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido tiene una capacidad de unión de las cantidades anteriormente mencionadas para proteínas. En ciertas realizaciones, la capacidad de unión del como mínimo un sustrato sólido para los como mínimo dos agentes de captura diferentes es 200 ng/ml a 500 ng/ml, 200 ng/ml a 1 µg/ml, 200 ng/ml a 2 µg/ml, 200 ng/ml a 3 µg/ml, 200 ng/ml a 4 µg/ml, 200 ng/ml a 5 µg/ml, 500 ng/ml a 1 µg/ml, 500 ng/ml a 2 µg/ml, 500 ng/ml a 3 µg/ml, 500 ng/ml a 4 µg/ml, 500 ng/ml a 5 µg/ml, 1 µg/ml a 2 µg/ml, 1 µg/ml a 3 µg/ml, 1 µg/ml a 4 µg/ml, 1 µg/ml a 5 µg/ml, 2 µg/ml a 3 µg/ml, 2 µg/ml a 5 µg/ml, 3 µg/ml a 4 µg/ml, 3 µg/ml a 5 µg/ml, o 4 µg/ml a 5 µg/ml.

40 El uso de uno o más agentes de inmovilización unidos puede proporcionar una o más ventajas a ciertas realizaciones de los métodos para detectar analitos diferentes. Por ejemplo, el uso de uno o más agentes de inmovilización unidos en el como mínimo un sustrato sólido puede proporcionar ventajas a la flexibilidad en la selección del sustrato que se puede usar. Por ejemplo, el agente de inmovilización puede permitir que se una un agente de captura particular a un sustrato sólido (por medio del agente de inmovilización) al que de otra manera no se uniría. En ciertas realizaciones, el uso de un par de unión agente de inmovilización - ligando proporciona la ventaja de permitir que el método sea modular, ya que se puede producir una diversidad de agentes de captura que se unen a un sustrato sólido particular mediante la incorporación de un ligando para el agente de inmovilización en un agente de captura.

50 En ciertas realizaciones, el uso de un par agente de inmovilización - ligando para llevar a cabo la unión de un agente de captura al sustrato sólido puede facilitar un ensayo más sensible. Los agentes de captura que se unen directamente a un sustrato sólido se pueden unir de una manera que bloquea el sitio de unión al analito específico. La adición de un ligando a un agente de captura que es específico del agente de inmovilización pre-unido al sustrato sólido puede permitir que el agente de captura se una al sustrato sólido por medio de la inmovilización de tal manera que no disminuye su afinidad por el analito, lo que permite que haya disponible una mayor proporción del agente de captura para el ensayo.

55 En ciertas realizaciones, el uso de uno o más agentes de inmovilización unidos también puede disminuir la influencia potencial de las proteínas reactivas con el sustrato de la muestra. Por ejemplo, es menos probable que las proteínas hidrófobas de la muestra afecten a la detección incluso si se lleva a cabo en un sustrato sólido hidrófobo, ya que el agente de inmovilización ya está unido al sustrato sólido y un ligando que se halla en el agente de captura puede ser

específico del agente de inmovilización.

En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende un único tipo de agente de inmovilización. Por ejemplo, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se pueden unir al mismo tipo de agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido comprende dos o más tipos diferentes de agentes de inmovilización. Por ejemplo, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes pueden comprender un tipo de ligando que se une a un tipo de agente de inmovilización, y uno o más de los agentes de captura restantes pueden comprender otro tipo de ligando que se une a otro tipo de agente de inmovilización.

En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden uno o más ligandos para un agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, un agente de captura puede comprender uno o más ligandos, y se pueden inmovilizar en el sustrato sólido mediante la interacción del agente de inmovilización y uno o más ligandos.

En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprende uno o más ligandos para el agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden, en una diversidad de sitios, un ligando para el agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes de captura comprende una diversidad de ligandos para el agente de inmovilización.

En ciertas realizaciones, un agente de inmovilización y el ligando forman un par de unión. Se puede usar una diversidad de pares de unión diferentes agente de inmovilización - ligando. En ciertas realizaciones, el agente de inmovilización y el ligando pueden ser intercambiables (es decir, un primer compuesto se puede unir al sustrato sólido, o el agente de captura y un segundo compuesto, que es parte del mismo par de unión, se pueden unir al otro).

En ciertas realizaciones, un agente de inmovilización y un ligando son un par de unión que no es un par de unión polianiónico-policatiónico. En ciertas realizaciones, el uso de un par de unión agente de inmovilización-ligando que no se unen sustancialmente por medio de una interacción iónica entre una molécula sustancialmente polianiónica y una molécula sustancialmente policatiónica puede proporcionar una o más ventajas para la detección de un analito en una muestra. Los ejemplos de tales moléculas poliiónicas incluyen las sustancias iónicas poliméricas. En ciertas realizaciones, las ventajas de usar un par de unión agente de inmovilización - ligando que no es un par de unión polianiónico-policatiónico incluyen, por ejemplo, que la unión entre el par de moléculas puede ser menos dependiente del pH de la disolución en contacto con el par de unión, y/o que la capacidad de reducir las interacciones inespecíficas puede ser difícil con tales pares de unión poliiónicos. Además, se sabe que muchas proteínas presentes en el medio biológico se unen de manera específica a polianiones o policationes, lo que hace que estos componentes sean potencialmente difíciles de detectar con tal sistema de inmovilización.

Además, en ciertas realizaciones, el uso de un par de unión agente de inmovilización-ligando que no es un par de unión polianiónico-policatiónico puede proporcionar otras ventajas, que incluyen una o más de: (i) favorecer la formación de un complejo que incluye el agente de captura y el analito y/u otros agentes; (ii) mejorar el acceso de tal complejo al sustrato sólido; y/o (iii) favorecer la capacidad de otros agentes, tales como un agente detectable, de acceder al analito con fines de detección.

Según la presente invención, el ligando y el agente de inmovilización son un par de unión que comprende un marcador peptídico y un anticuerpo anti-peptido.

En las realizaciones en las que se usa un marcador peptídico como ligando y se usa un anticuerpo anti-peptido como agente de inmovilización (un sistema de captura péptido/anticuerpo), tal sistema puede proporcionar una o más ventajas adicionales.

Por ejemplo, se ha determinado que un sistema de captura péptido/anticuerpo puede tener ventajas respecto de un sistema de captura estreptavidina/biotina en ciertas realizaciones, ya que los sistemas de captura péptido/anticuerpo pueden proporcionar una o más de una señal incrementada, una variabilidad reducida y una interferencia reducida, dependiendo del tipo de muestra.

Además, en las realizaciones que utilizan un número reducido de etapas de lavado del sustrato sólido, un sistema de captura péptido/anticuerpo puede proporcionar una ventaja, especialmente en las realizaciones en las que el sustrato sólido se lava solamente después de haber inmovilizado un complejo. Además, en las realizaciones que utilizan un tiempo reducido de ensayo, un sistema de captura péptido/anticuerpo también puede proporcionar la ventaja de ayudar a reducir el tiempo de ensayo.

En la presente memoria se describen otras ventajas de un sistema de captura péptido/anticuerpo. Por ejemplo, se pueden diseñar y preparar péptidos específicos que no se dan de manera natural, como mínimo para el organismo en el que se debe detectar un analito. Se puede usar la bioinformática para seleccionar secuencias que sean únicas.

También se pueden seleccionar péptidos diferentes para aplicaciones o ensayos diferentes. Como tales, son

fácilmente ampliables si es necesario más de un sistema de afinidad. Por ejemplo, en las realizaciones relacionadas con la detección de un analito en los diferentes pocillos de una placa de ensayo, cada pocillo se puede revestir con un subgrupo específico de anticuerpos anti-péptido que permitiría la inmovilización específica de anticuerpos de captura particulares de una mezcla de tales anticuerpos con marcadores peptídicos diferentes.

- 5 Además, en ciertas realizaciones, el uso de un sistema de captura péptido/anticuerpo puede proporcionar una o más ventajas respecto de otros tipos de sistemas de captura. Por ejemplo, el uso de un sistema péptido/anticuerpo en ciertas realizaciones también puede proporcionar una ventaja respecto de los sistemas de captura que utilizan ligandos poli-cargados (por ejemplo, marcadores de His) e iones metálicos (por ejemplo, iones Ni<sup>2+</sup>), ya que el sistema péptido/anticuerpo puede tener una afinidad mayor y/o ser menos propenso a verse afectado por la presencia de otras moléculas cargadas. De forma similar, el uso de un sistema péptido/anticuerpo en ciertas realizaciones puede proporcionar una ventaja respecto de los sistemas glutatión/GST, ya que el sistema de captura péptido/anticuerpo también tiene una afinidad mayor.

- 10 Un sistema de captura péptido/anticuerpo también puede proporcionar en ciertas realizaciones una o más ventajas respecto del uso de anticuerpos anti-especie como agente de inmovilización, ya que entonces el sistema no se limita al uso de especies de anticuerpos inmovilizados en la superficie. Por ejemplo, un anticuerpo anti-conejo inmovilizado solamente se puede usar para unirse a anticuerpos de captura de conejo. Además, los anticuerpos anti-especie pueden adolecer de una especificidad reducida hacia la especie del anticuerpo para cuya unión están diseñados, lo que puede minimizar su utilidad en ensayos que usan muestras que contienen anticuerpos endógenos, tales como suero y plasma, ya que estos bloquearán la unión de los anticuerpos de ensayo.

- 15 Además, un sistema de captura péptido/anticuerpo también puede proporcionar en ciertas realizaciones una o más ventajas respecto de los sistemas de captura que utilizan sistemas de captura con proteína A y/o proteína G inmovilizadas. Por ejemplo, las proteínas A y G se unirán a muchos anticuerpos en una disolución. La proteína A y la proteína G también pueden mostrar una utilidad reducida en muestras que contienen anticuerpos endógenos, tales como suero o plasma, ya que estos pueden bloquear la unión de los anticuerpos. Además, tal sistema de captura puede tener desventajas en las realizaciones en las que tanto el agente de captura como el agente detectable son anticuerpos, ya que la proteína A o la proteína G no discriminarán los anticuerpos de captura y de detección, y se unirán a ambos, y por tanto eliminarán la discriminación del ensayo para el analito.

- 20 Como se describe en la presente memoria, los marcadores peptídicos son marcadores polipeptídicos que se pueden conjugar a otra molécula, tal como una proteína (p.ej. un anticuerpo) o añadirlos a una proteína mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. Un ejemplo de un marcador peptídico es el octapéptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1), denominado de otra manera marcador FLAG, que se puede usar en diferentes ensayos que utilizan el reconocimiento mediante un anticuerpo. Se describen otros ejemplos de marcadores peptídicos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el marcador peptídico no comprende una diversidad de aminoácidos consecutivos con la misma carga.

- 25 Una persona experta en la técnica puede obtener o producir una diversidad de anticuerpos anti-marcador peptídico. Por ejemplo, en la presente memoria se describen anticuerpos anti-DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) disponibles comercialmente. Los anticuerpos anti-DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) disponibles comercialmente incluyen los códigos de producto de Sigma-Aldrich F7425, F3040, F1804, F3165, F4042, F2555 y SAB4200071. Algunos anticuerpos disponibles comercialmente reconocen el marcador DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) solamente en ciertas posiciones de una proteína, por ejemplo en posición exclusivamente N-terminal. Sin embargo, otros anticuerpos disponibles son insensibles a la posición.

- 30 En ciertas realizaciones, el marcador peptídico comprende un péptido derivado de un miembro de una ruta de señalización y/o un péptido de una citocina. Los marcadores peptídicos son como se describen en la presente memoria, y la adición de un marcador peptídico al agente de captura para formar un conjugado se puede conseguir mediante un método conocido adecuado. Se contemplan otros marcadores peptídicos. Los marcadores peptídicos pueden ser naturales o no naturales. En ciertas realizaciones, el marcador peptídico tiene más del 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia respecto de una secuencia polipeptídica natural. En ciertas realizaciones, el marcador peptídico tiene más del 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de homología de secuencia respecto de una secuencia polipeptídica natural. Se conocen los métodos para determinar la identidad de secuencia y la homología de secuencia.

- 35 En ciertas realizaciones, el marcador peptídico comprende KRITVEEALAHPLYEQYYDPTDE (SEQ ID N° 2), que es una secuencia derivada del extremo carboxi terminal de las proteínas ERK humanas (péptido C-terminal de ERK). Los anticuerpos hacia este marcador peptídico se pueden producir mediante métodos conocidos.

- 40 La adición de un marcador peptídico a una proteína permite que la proteína se una y/o se inmovilice mediante un agente que se une al marcador peptídico, por ejemplo un anticuerpo generado contra la secuencia del marcador peptídico. En ciertas realizaciones, también se puede usar un marcador peptídico junto con otros marcadores de afinidad, por ejemplo un marcador de polihistidina (marcador His), marcador HA o marcador myc.

En ciertas realizaciones, el uso de un marcador peptídico conjugado a un agente de captura y un anticuerpo anti-

péptido (como agente de inmovilización) puede proporcionar una o más ventajas respecto de otros tipos de pares de unión agente de inmovilización - ligando. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los conjugados de marcador peptídico y anticuerpos anti-péptido pueden ser menos susceptibles a la variación en diferentes tipos de muestra y/o proporcionar una sensibilidad mejorada de detección.

- 5 También se describen en la presente memoria ligandos y agentes de inmovilización seleccionados de los pares de unión ligando-agente de inmovilización que comprenden: biotina (o derivados de la misma) y avidina o estreptavidina (o derivados de las mismas); quelato metálico (p.ej. cobre, níquel, cobalto) e Histidina (p.ej. proteínas marcadas con histidina); anhídrido maleico y amina (p.ej. proteínas que contienen amina); y maleimida y sulfhidrilos (p.ej. sulfhidril-péptidos).
- 10 Se conocen derivados de avidina o estreptavidina, y pueden incluir formas de avidina o estreptavidina que se han modificado para incrementar su afinidad de unión a ligandos o sustratos sólidos modificados y/o sin modificar. Por ejemplo, la estreptavidina se puede modificar para añadir uno o más grupos amina, residuos de histidina o grupos sulfhidrilo a la molécula. En otro ejemplo, el derivado de estreptavidina puede comprender mutantes de neutravidina, captavidina o estreptavidina (p.ej., H127C o S139C).
- 15 En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden uno o más ligandos seleccionados de un marcador peptídico como se describe en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden uno o más ligandos seleccionados de un par de unión que comprende un marcador peptídico y un anticuerpo anti-marcador peptídico.

- 20 En ciertas realizaciones, un ligando puede ser parte de un agente de captura. Por ejemplo, un agente de captura puede comprender residuos de histidina, grupos amina o grupos sulfhidrilo que son capaces de unirse a un agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, un ligando se une a un agente de captura. Por ejemplo, el ligando puede ser reactivo con amina, reactivo con carbohidrato, reactivo con carboxilo, o reactivo con sulfhidrilo, y así se puede unir al agente de captura por medio de aminas primarias (p.ej. lisina o el extremo N-terminal), modificaciones de
- 25 carbohidratos, grupos carboxilo (p.ej. en residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el extremo C-terminal), o grupos sulfhidrilo. Un ligando también puede comprender grupos que se pueden yodar y/o grupos fotoactivables. Un ligando también puede comprender grupos de tetrafluorofenil azida (TFPA) que, una vez activados mediante luz UV, son capaces de unirse de manera covalente a sitios que contienen enlaces C-H o N-H (p.ej. el ligando puede comprender TFPA-PEG3-Biotina). Se conocen los métodos para marcar proteínas y otras moléculas con los ligandos anteriores.
- 30

- En ciertas realizaciones, uno o más ligandos comprenden biotina o un derivado de la misma, por ejemplo iminobiotina, D-destiobiotina, DSB-X-biotina, dímeros de biotina o trímero de arilestanil-biotina. La biotina y los derivados de la misma se pueden unir al agente de captura mediante biotinilación. Se conocen los reactivos de biotinilación y los métodos para la biotinilación de una molécula objetivo. La biotinilación puede comprender, por
- 35 ejemplo, la biotinilación de aminas primarias, biotinilación de sulfhidrilos, biotinilación de carboxilos, o biotinilación de glicoproteínas.

- En ciertas realizaciones, uno o más ligandos comprenden un marcador peptídico, tal como un marcador DYKDDDDK (SEQ ID N° 1). Como se describe en la presente memoria, los marcadores peptídicos son marcadores proteicos polipeptídicos que se pueden conjugar a otra molécula, tal como una proteína. En ciertas realizaciones, un marcador
- 40 peptídico se puede conjugar a un anticuerpo o añadirlo a una proteína mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante. Un ejemplo de un marcador peptídico conjugado es un marcador DYKDDDDK (SEQ ID N° 1), que se puede usar en diferentes ensayos que utilizan un reconocimiento mediante un anticuerpo.

- Otros ejemplos de marcadores peptídicos comprenden una secuencia polipeptídica que comprende una o más de las siguientes secuencias: HHHHHH (SEQ ID N° 3); EQKLISEEDL (SEQ ID N° 4); YPYDVPDYA (SEQ ID N° 5);
- 45 YTDIEMNRLGK (SEQ ID N° 6); y QPELAPEDPED (SEQ ID N° 7).

La adición de un marcador peptídico conjugado a una molécula, tal como una proteína, permite que la molécula se una y/o se inmovilice con un anticuerpo hacia la secuencia del marcador peptídico. En ciertas realizaciones, también se puede usar un marcador peptídico junto con otros marcadores de afinidad.

- Como se describió en la presente memoria, en ciertas realizaciones el uso de un sistema de par de unión agente de inmovilización - ligando para la detección de analitos diferentes proporciona varias ventajas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el uso de tal sistema proporciona una o más de las siguientes ventajas: la capacidad de usar cantidades reducidas de agente de captura, la capacidad de incrementar la capacidad de unión del sustrato sólido para el agente de captura; y proporcionar un sistema que puede usar múltiples tipos de anticuerpos sin saturar el sustrato sólido.
- 50

- Como se discute en la presente memoria, en ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden una diversidad de ligandos para el agente de inmovilización. En ciertas realizaciones, el uso de uno o más agentes de captura que comprenden una diversidad de ligandos para el agente de
- 55

5 inmovilización puede ayudar en la formación y/o detección de los complejos entre un agente de captura, un analito y otras moléculas. Además, el uso de un agente de captura que comprende una diversidad de ligandos puede reducir la cantidad de un agente de captura que se une a un agente de inmovilización en una orientación que oculta el dominio de unión del analito. En ciertas realizaciones, como resultado del uso más eficaz de uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes, también se puede reducir la cantidad de un agente de captura que es necesaria para detectar un analito respecto de los métodos previos. Además, el uso más eficaz de un agente de captura también puede conducir a una reducción del área de sustrato sólido necesaria para producir una señal detectable a un nivel concreto respecto de los ensayos previos.

10 En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo, un aptámero, o cualquier componente de un par de receptor - ligando. También se contemplan otras combinaciones. En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un aptámero. Los aptámeros se pueden obtener comercialmente o se pueden generar mediante métodos conocidos. En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un receptor o su ligando. Por ejemplo, el receptor puede ser un receptor proteico y el ligando una molécula que se une al receptor, o viceversa.

15 En ciertas realizaciones, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, y el anticuerpo es capaz de unirse a un analito.

20 La referencia en la presente memoria a un "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina con la capacidad de unirse a una región antigénica de otra molécula, e incluye los anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos multiespecíficos, diacuerpos y fragmentos de una molécula de inmunoglobulina o combinaciones de los mismos que tienen la capacidad de unirse a la región antigénica de otra molécula con la afinidad deseada, que incluyen un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, un anticuerpo de cadena simple (scFv) o un polipéptido que contiene como mínimo una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir la unión a un antígeno específico, tal como una molécula que incluye una o más CDRs. Los anticuerpos hacia analitos específicos se pueden obtener comercialmente o se pueden generar mediante métodos conocidos.

25 En ciertas realizaciones en las que uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo, los métodos de la presente descripción representan un inmunoensayo para detectar múltiples analitos en una muestra. En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende un método de inmunoensayo, tal como un inmunoensayo no competitivo o un inmunoensayo competitivo. En ciertas realizaciones, el inmunoensayo comprende una combinación tanto de un inmunoensayo no competitivo como de un inmunoensayo competitivo. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo.

30 En ciertas realizaciones, la detección de los como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección de los como mínimo dos analitos diferentes en un recipiente de reacción, seguido de la detección de uno o más analitos diferentes restantes en otro recipiente de reacción.

35 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de dos o más de los analitos diferentes cuando los analitos se unen al como mínimo un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección de dos o más analitos diferentes que están separados espacialmente cuando se unen al sustrato sólido. En ciertas realizaciones, la separación espacial se consigue mediante la separación espacial de el/los agente(s) de captura inmovilizado(s). En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes no comprende un agente de captura inmovilizado en sitios separados.

40 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de dos o más de los analitos diferentes de manera simultánea o concurrente. En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de dos o más de los analitos diferentes de manera secuencial. En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los como mínimo dos analitos se da en un primer medio de reacción, seguido de la detección de analitos adicionales en otro u otros medios de reacción.

45 En ciertas realizaciones, la detección del o de los analitos diferentes comprende la lectura de las diversas señales detectables mediante un aparato o plataforma, que incluye, por ejemplo, lectores de placas, aparatos de FACS, aparatos de generación de imágenes de alto contenido, y monocromadores. En ciertas realizaciones, el aparato o plataforma es un lector de placas. Los ejemplos de los tipos de lecturas incluyen fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, luminiscencia, colorimetría, absorbancia, y polarización de fluorescencia. También se contemplan otras lecturas. En ciertas realizaciones, se usan diferentes longitudes de onda de fluorescencia para diferenciar las señales detectables.

50 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende una o más de detección inmunológica, detección luminiscente, detección con un fluoróforo, detección con un ión lantánido y/o un complejo del mismo, la detección con una enzima que convierte un sustrato en un producto detectable, y la detección con una microesfera que comprende un colorante detectable.

En ciertas realizaciones, el uso de un método que no implica la formación de imágenes, tal como la formación de imágenes mediante CCD, puede proporcionar una ventaja a la detección de múltiples analitos.

5 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección mediante el uso de un producto con una longitud de onda de emisión en uno o más de los siguientes intervalos de luz: 430-470 nm; 380 a 490 nm; 440 a 490 nm; 450 a 475 nm; 500 a 540 nm; 570 a 610 nm; 590 a 630 nm; 495 a 590 nm; 500 a 570 nm; 520 a 570 nm; 580 a 750 nm; 610 a 750 nm; 620 a 740 nm; 630 a 660 nm, y 595 a 750 nm; 495 a 590 nm; 520 a 570 nm; 595 a 750 nm; y 610 a 750 nm.

10 En ciertas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de emisión en el intervalo de la luz azul. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección mediante el uso de un producto con una longitud de onda de emisión en uno o más de los siguientes intervalos: 495 a 590 nm; 500-540 nm; 500 a 570 nm; 520 a 570 nm. En ciertas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de emisión en el intervalo de la luz verde. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección mediante el uso de un producto con una longitud de onda de emisión en uno o más de los siguientes intervalos: 570-610 nm; 590-630 nm; 580 a 750 nm; 610 a 750 nm; 620 a 740 nm. En ciertas realizaciones, la luz tiene una longitud de onda de emisión en el intervalo de la luz roja. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección mediante el uso de un producto con una longitud de onda de excitación que difiere de la longitud de onda de emisión en 100 nm o menos, 90 nm o menos, 80 nm o menos, 70 nm o menos, 60 nm o menos, o 50 nm o menos.

20 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección mediante el uso de un producto con una longitud de onda de emisión en uno o más de los siguientes intervalos: 430-470 nm; 500-540 nm; 570-610 nm; y 590-630 nm.

25 En ciertas realizaciones, la detección comprende un sustrato que produce un producto fluorescente azul. Por ejemplo, el sustrato fosfato de 4-metilumbeliferilo (longitud de onda de excitación 360 nm) produce el producto fluorescente azul 7-hidroxi-4-metilcumarina [4-metilumbeliferona] (longitud de onda de excitación 450 nm) con la enzima fosfatasa alcalina. En ciertas realizaciones, la detección comprende un sustrato que produce un producto fluorescente verde. Por ejemplo, el sustrato di-beta-D-galactopiranosido de fluoresceína (longitud de onda de excitación 460 nm) produce el producto fluorescente verde fluoresceína (longitud de onda de excitación 520 nm) con la enzima Beta-galactosidasa. En ciertas realizaciones, la detección comprende un sustrato que produce un producto fluorescente rojo. Por ejemplo, el sustrato 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina (longitud de onda de excitación 550 nm) produce el producto fluorescente rojo resorufina (longitud de onda de excitación 610 nm) con la enzima peroxidasa de rábano.

30 En ciertas realizaciones, la detección de como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección con un sustrato/producto azul con una longitud de onda de emisión de 430 a 470 nm y un sustrato/producto rojo con una longitud de onda de emisión de 570 a 610 nm.

35 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende el uso de uno o más fluoróforos. En ciertas realizaciones, el o los fluoróforos comprenden uno o más iones lantánidos, tales como uno o más de  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , y  $\text{Dy}^{3+}$ .

40 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende el uso de una o más enzimas que convierten un sustrato en un producto detectable. Por ejemplo, la o las enzimas pueden ser una peroxidasa (p.ej., peroxidasa de rábano), una fosfatasa alcalina, y beta-galactosidasa.

45 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende el uso de uno o más agentes que permiten la detección de uno o más analitos específicos unidos a dos o más agentes de captura específicos. En ciertas realizaciones, la detección comprende poner en contacto dos o más agentes con dos o más agentes de captura diferentes para producir una o más señales detectables distinguibles. Por ejemplo, dos analitos diferentes inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido se pueden poner en contacto con un primer agente que produce una primera señal detectable asociada a uno de los analitos, y se puede poner en contacto con un segundo agente que produce a partir del otro analito una segunda señal detectable distinguible de la primera señal detectable.

50 En ciertas realizaciones, los como mínimo dos analitos diferentes se pueden detectar poniendo en contacto de manera secuencial dos o más agentes con los como mínimo dos analitos diferentes para producir una o más señales detectables. A modo de ilustración, por ejemplo, dos analitos diferentes que se detectan mediante el uso de un fluoróforo de luz roja se pueden detectar poniendo en contacto de manera secuencial los como mínimo dos analitos con un primer agente que produce una señal detectable roja a partir de uno de los analitos. Tras la detección de esta señal detectable y la eliminación mediante lavado del primer agente, después se puede usar la puesta en contacto de los como mínimo dos analitos con un segundo agente que produce una señal detectable roja a partir del otro analito para detectar el segundo analito.

55 En ciertas realizaciones, el método comprende la producción de como mínimo dos señales detectables diferentes. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables comprenden una o más de una señal detectable

seleccionada de las señales detectables con una longitud de onda de emisión máxima en los siguientes intervalos: 590-629 nm; 570-662 nm; 380-490 nm; 500-560 nm; y 570 a 750 nm.

5 En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-750 nm.

En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm.

10 En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570 a 750 nm.

En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570 a 750 nm.

15 En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección de la presencia de uno o más analitos diferentes unidos al sustrato sólido por medio de un agente de captura inmovilizado en el sustrato sólido.

20 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de la presencia de dos o más de los analitos unidos al sustrato sólido mediante un agente de captura inmovilizado en el sustrato sólido por medio de la unión de uno o más ligandos en un agente de captura a un agente de inmovilización en el como mínimo un sustrato sólido.

25 En ciertas realizaciones, la detección de la presencia de los dos o más analitos diferentes unidos al como mínimo un sustrato sólido comprende la detección de los dos o más analitos diferentes mediante un método que utiliza la inmovilización de dos o más analitos en el como mínimo un sustrato sólido. Por ejemplo, los métodos de detección de un analito pueden comprender que el analito se coloque cerca del sustrato sólido y/o el agente de inmovilización. Los ejemplos de tales métodos que implican la detección de la proximidad incluyen los mecanismos de transferencia de energía, mecanismos conocidos de apagamiento, y transferencia de moléculas reactivas entre especies que se colocan en estrecha proximidad.

30 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden una cantidad reducida de uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes, respecto de los ensayos previos, como resultado de la unión más eficaz de una captura al sustrato sólido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de captura puede estar presente a una concentración de 1000 ng/ml o menos, 900 ng/ml o menos, 800 ng/ml o menos, 700 ng/ml o menos, 600 ng/ml o menos, 500 ng/ml o menos, 400 ng/ml o menos, 300 ng/ml o menos, 200 ng/ml o menos, 100 ng/ml o menos, 50 ng/ml o menos, 25 ng/ml o menos, o 10 ng/ml o menos. En ciertas realizaciones, el agente de captura de anticuerpo puede estar presente a una concentración de 10 ng/ml o más, 25 ng/ml o más, 50 ng/ml o más, 100 ng/ml o más, 200 ng/ml o más, 300 ng/ml o más, 400 ng/ml o más, 500 ng/ml o más, o 600 ng/ml mayor, 700 ng/ml o más, 800 ng/ml o más, 900 ng/ml o más, 1000 ng/ml o más. En ciertas realizaciones, el agente detectable de anticuerpo está presente a una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml, 10 ng/ml a 900 ng/ml, 10 ng/ml a 800 ng/ml, 10 ng/ml a 700 ng/ml 10 ng/ml a 600 ng/ml, 10 ng/ml a 500 ng/ml, 10 ng/a 400 ng/ml, 10 ng/ml a 200 ng/ml, 10 ng/ml a 100 ng/ml, 25 ng/ml a 1000 ng/ml, 25 ng/ml a 900 ng/ml, 25 ng/ml a 800 ng/ml, 25 ng/ml a 700 ng/ml, 25 ng/ml a 600 ng/ml, 25 ng/ml a 500 ng/ml, 25 ng/a 400 ng/ml, 25 ng/ml a 200 ng/ml, 25 ng/ml a 100 ng/ml, 50 ng/ml a 1000 ng/ml, 50 ng/ml a 900 ng/ml, 50 ng/ml a 800 ng/ml, 50 ng/ml a 700 ng/ml, 50 ng/ml a 600 ng/ml, 50 ng/ml a 500 ng/ml, 50 ng/a 400 ng/ml, 50 ng/ml a 200 ng/ml, o 50 ng/ml a 100 ng/ml. Por ejemplo, en un sistema anti-péptido conjugado, se puede usar un agente de captura de anticuerpo en general a una concentración de 50 ng/ml, y en un sistema estreptavidina - biotina se puede usar un agente de captura de anticuerpo en general a una concentración de 200 ng/ml. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar uno o más de los agentes de captura diferentes a una de las concentraciones anteriormente mencionadas. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes a una concentración de 10 ng/ml a 500 ng/ml.

50 En ciertas realizaciones, se usa un agente detectable para detectar un analito unido a un sustrato sólido por medio de un agente de captura. En tales realizaciones, la detección de la presencia del o de los analitos diferentes unidos al sustrato sólido comprende la detección de dos o más de los analitos diferentes con dos o más agentes detectables diferentes.

55 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende proporcionar dos o más agentes detectables diferentes que son capaces de detectar dos o más analitos diferentes. En ciertas realizaciones, la detección de como mínimo dos analitos diferentes comprende proporcionar como mínimo dos agentes detectables diferentes.

En ciertas realizaciones, como mínimo dos agentes detectables diferentes se unen a como mínimo dos analitos

diferentes. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes se unen a un analito diferente.

5 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de la presencia de dos o más agentes detectables unidos al como mínimo un sustrato sólido. La unión al como mínimo un sustrato sólido es por medio de dos o más analitos.

En ciertas realizaciones, la detección de como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección de la presencia de como mínimo dos agentes detectables unidos al sustrato sólido por medio de dos o más analitos.

10 En ciertas realizaciones, un agente detectable comprende una molécula que se une al analito. En ciertas realizaciones, un agente detectable diferente se une a un analito diferente. En ciertas realizaciones, agentes detectables diferentes se unen a múltiples analitos.

En ciertas realizaciones, un agente detectable comprende uno o más de un anticuerpo, un aptámero, o cualquier componente de un par receptor - ligando, fragmentos de unión adecuados de lo anteriormente mencionado, o combinaciones de los mismos.

15 En ciertas realizaciones, dos o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un anticuerpo o un fragmento del mismo. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un anticuerpo o un fragmento del mismo. Los anticuerpos son como se describen en la presente memoria. Los anticuerpos se pueden obtener comercialmente o se pueden generar mediante métodos conocidos.

20 En ciertas realizaciones, la detección de los como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección de la presencia de como mínimo dos agentes detectables unidos al como mínimo un sustrato sólido por medio de los como mínimo dos analitos diferentes, que se unen a su vez a los como mínimo dos agentes de captura diferentes inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, la detección de los como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección de la presencia de como mínimo dos agentes detectables unidos al sustrato sólido por medio de los como mínimo dos analitos diferentes en el recipiente de reacción. En ciertas  
25 realizaciones, la detección de los como mínimo dos analitos diferentes comprende la detección de la presencia de como mínimo dos agentes detectables unidos al sustrato sólido por medio de los como mínimo dos analitos diferentes en un único recipiente de reacción.

30 En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes de captura diferentes y los como mínimo dos agentes detectables diferentes forman como mínimo dos pares de agentes que se unen a los como mínimo dos analitos diferentes.

35 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más de los analitos diferentes comprende la detección de dos o más de los agentes detectables de manera simultánea o concurrente. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los analitos diferentes comprende la detección de uno o más de los agentes detectables diferentes de manera secuencial. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más de los como mínimo dos analitos se da en un primer medio de reacción, seguido de la detección de analitos adicionales en otro u otros medios de reacción.

40 En ciertas realizaciones, los métodos comprenden una cantidad reducida de dos o más agentes detectables diferentes, respecto de los ensayos previos, como resultado de la captura más eficaz de un analito en un sustrato sólido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los agentes detectables están presentes a una concentración de 1000 ng/ml o menos, 900 ng/ml o menos, 800 ng/ml o menos, 700 ng/ml o menos, 600 ng/ml o menos, 500 ng/ml o menos, 400 ng/ml o menos, 300 ng/ml o menos, 200 ng/ml o menos, 100 ng/ml o menos, 50 ng/ml o menos, 25 ng/ml o menos, o 10 ng/ml o menos. En ciertas realizaciones, los agentes detectables están presentes a una concentración de 10 ng/ml o más, 25 ng/ml o más, 50 ng/ml o más, 100 ng/ml o más, 200 ng/ml o más, 300 ng/ml o más, 400 ng/ml o más, 500 ng/ml o más, o 600 ng/ml mayor, 700 ng/ml o más, 800 ng/ml o más, 900 ng/ml o más, 1000 ng/ml o más. En ciertas realizaciones, los agentes detectables están presentes a una concentración de 10  
45 ng/ml a 1000 ng/ml, 10 ng/ml a 900 ng/ml, 10 ng/ml a 800 ng/ml, 10 ng/ml a 700 ng/ml 10 ng/ml a 600 ng/ml, 10 ng/ml a 500 ng/ml, 10 ng/a 400 ng/ml, 10 ng/ml a 200 ng/ml, 10 ng/ml a 100 ng/ml, 25 ng/ml a 1000 ng/ml, 25 ng/ml a 900 ng/ml 25 ng/ml a 800 ng/ml, 25 ng/ml a 700 ng/ml, 25 ng/ml a 600 ng/ml, 25 ng/ml a 500 ng/ml, 25 ng/a 400 ng/ml, 25 ng/ml a 200 ng/ml, 25 ng/ml a 100 ng/ml, 50 ng/ml a 1000 ng/ml, 50 ng/ml a 900 ng/ml, 50 ng/ml a 800 ng/ml, 50 ng/ml a 700 ng/ml, 50 ng/ml a 600 ng/ml, 50 ng/ml a 500 ng/ml, 50 ng/a 400 ng/ml, 50 ng/ml a 200 ng/ml, o  
50 50 ng/ml a 100 ng/ml. Por ejemplo, en un sistema de péptido conjugado o un sistema biotina-estreptavidina, se puede usar en general un agente detectable de anticuerpo a una concentración de 50 ng/ml. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar como mínimo dos agentes detectables diferentes a una o más de las concentraciones anteriormente mencionadas. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar los como mínimo dos agentes detectables diferentes a una concentración de 10 ng/ml a 100 ng/ml.

55 En ciertas realizaciones, un agente detectable produce una señal detectable. En ciertas realizaciones, como mínimo dos agentes detectables producen como mínimo dos señales detectables diferentes. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-629 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de

emisión máxima en el intervalo de 630-662 nm. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570 a 750 nm. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm y otra señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570 a 750 nm.

En ciertas realizaciones, un agente detectable produce una señal detectable. En ciertas realizaciones, como mínimo dos agentes detectables producen como mínimo dos señales detectables diferentes. En ciertas realizaciones, las como mínimo dos señales detectables diferentes comprenden como mínimo una señal detectable con una longitud de onda de emisión máxima en uno o más de los siguientes intervalos de luz: 430-470 nm; 380 a 490 nm; 440 a 490 nm; 450 a 475 nm; 500 a 540 nm; 570 a 610 nm; 590 a 630 nm; 495 a 590 nm; 500 a 570 nm; 520 a 570 nm; 580 a 750 nm; 610 a 750 nm; 620 a 740 nm; 630 a 660 nm, y 595 a 750 nm; 495 a 590 nm; 520 a 570 nm; 595 a 750 nm; y 610 a 750 nm.

En ciertas realizaciones, un marcador detectable está asociado con un agente detectable, por ejemplo unido al agente detectable, o es una parte del agente detectable, por ejemplo el agente detectable puede incluir el marcador detectable en forma de una molécula de fusión, un aminoácido marcado o un nucleótido marcado. Los ejemplos de marcadores detectables adecuados incluyen antígenos, enzimas, fluoróforos, apagadores, isótopos radiactivos y compuestos o marcadores luminiscentes. El marcador detectable se puede detectar directamente o indirectamente por medio de una molécula adicional que puede producir una señal detectable. En ciertas realizaciones, un marcador detectable produce una señal detectable. En ciertas realizaciones, los marcadores detectables diferentes producen señales detectables diferentes. En ciertas realizaciones, uno o más marcadores detectables producen una o más señales detectables diferentes. En ciertas realizaciones, como mínimo dos marcadores detectables producen como mínimo dos señales detectables diferentes.

En ciertas realizaciones, uno o más agentes detectables comprenden un antígeno. Los ejemplos de antígenos que se pueden usar como marcador detectable incluyen los componentes antigénicos adecuados del agente detectable que pueden ser seleccionados como objetivo por un agente detectable secundario. Por ejemplo, también se puede usar un anticuerpo secundario para detectar un antígeno en un agente detectable. El anticuerpo secundario puede estar, por ejemplo, marcado de manera fluorescente o enzimática. En las realizaciones en las que el agente detectable es un anticuerpo primario (es decir, un anticuerpo de unión al analito), el anticuerpo secundario puede tener afinidad de unión hacia un antígeno del anticuerpo primario. Por ejemplo, el antígeno puede derivar del hospedador en el que se generó el agente detectable.

En ciertas realizaciones, el o los marcadores detectables comprenden un fluoróforo. Los ejemplos de fluoróforos que se pueden usar como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, resorufina, fluoresceína (isotiocianato de fluoresceína, FITC), rodamina (isotiocianato de tetrametil rodamina, TRITC), proteína fluorescente verde (GFP), ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina y ficoeritrocianina, iones lantánidos tales como uno o más de  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , y  $\text{Dy}^{3+}$  o complejos de los mismos, derivados adecuados de lo anterior o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el o los marcadores detectables pueden ser parte del o de los agentes detectables diferentes (p.ej. en forma de una proteína de fusión o una proteína que comprende aminoácidos fluorescentes). Los fluoróforos se pueden someter a una estimulación aplicada (por ejemplo, luz de una longitud de onda de excitación adecuada) para favorecer la fluorescencia.

En ciertas realizaciones, el o los marcadores detectables comprenden un compuesto o marcador luminiscente. Los compuestos o marcadores luminiscentes que se pueden usar como marcadores detectables incluyen, por ejemplo, compuestos quimioluminiscentes y/o bioluminiscentes. Estos compuestos se pueden usar para marcar un agente detectable. La presencia de un marcador quimioluminiscente se puede determinar detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el desarrollo de una reacción química. Los ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato o combinaciones de los mismos. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia hallada en sistemas biológicos, en los cuales una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de un anticuerpo bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los ejemplos de compuestos bioluminiscentes incluyen luciferina, luciferasa y acedurina.

En ciertas realizaciones, el o los marcadores detectables comprenden uno o más iones lantánidos. En ciertas realizaciones, el ión lantánido puede ser  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , y  $\text{Dy}^{3+}$ . En ciertas realizaciones, uno de los marcadores detectables comprende  $\text{Eu}^{3+}$  y otro de los marcadores detectables comprende  $\text{Sm}^{3+}$ . En ciertas realizaciones, uno de los marcadores detectables comprende  $\text{Eu}^{3+}$ , otro de los marcadores detectables comprende  $\text{Sm}^{3+}$  y un marcador detectable adicional comprende  $\text{Tb}^{3+}$ .

En ciertas realizaciones, el o los marcadores detectables comprenden una o más enzimas que convierten un sustrato en un producto detectable. Las enzimas que se pueden usar como marcadores detectables incluyen, por

ejemplo, enzimas que dan como resultado la conversión de un sustrato en un producto detectable (lo que en general da como resultado un cambio de color o fluorescencia, o la generación de una señal electroquímica). Tales enzimas pueden incluir, por ejemplo, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP),  $\beta$ -galactosidasa, acetilcolinesterasa, luciferasa, catalasa o combinaciones de las mismas. Dependiendo de la enzima y el sustrato usados, la detección se puede llevar a cabo con un espectrofotómetro, fluorímetro, luminómetro, y/u otro medio de detección electroquímica. En ciertas realizaciones, la enzima puede ser peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, y beta-galactosidasa. También se pueden usar otras enzimas. En ciertas realizaciones, uno de los marcadores detectables comprende peroxidasa de rábano y otro de los marcadores detectables comprende fosfatasa alcalina. En ciertas realizaciones, uno de los marcadores detectables comprende peroxidasa de rábano, otro de los marcadores detectables comprende fosfatasa alcalina, y un marcador detectable adicional comprende beta-galactosidasa.

En ciertas realizaciones, uno de los marcadores detectables comprende un par de enzimas seleccionadas de peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano y beta-galactosidasa, y fosfatasa alcalina y beta-galactosidasa.

En ciertas realizaciones, uno o más de los marcadores detectables comprende un isótopo radiactivo. Los isótopos radiactivos que se pueden usar como marcadores detectables incluyen, por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , o  $^{131}\text{I}$ . El radioisótopo se puede conjugar a un agente detectable o incorporarlo en un agente detectable mediante la traducción del mRNA que codifica el agente detectable en presencia de aminoácidos radiomarcados. Se conocen los radioisótopos y los métodos para conjugar isótopos radiactivos a moléculas tales como proteínas. Los radioisótopos se pueden detectar mediante el uso de contadores de partículas gamma, beta o de centelleo.

En ciertas realizaciones, los como mínimo dos analitos diferentes se pueden detectar mediante los como mínimo dos agentes detectables diferentes que producen una o más señales detectables. En ciertas realizaciones, los como mínimo dos analitos diferentes se pueden detectar poniendo en contacto uno o más agentes con los como mínimo dos agentes detectables diferentes para producir una o más señales detectables. En ciertas realizaciones, las señales detectables pueden ser sustancialmente distinguibles. En ciertas realizaciones, las señales detectables pueden ser diferentes.

En ciertas realizaciones, las señales detectables pueden no ser sustancialmente distinguibles, y la detección de los como mínimo dos analitos comprende producir de manera secuencial las señales detectables. En ciertas realizaciones, los como mínimo dos analitos diferentes se pueden detectar poniendo en contacto de manera secuencial uno o más agentes con los como mínimo dos agentes detectables diferentes para producir una o más señales detectables. A modo de ilustración, por ejemplo, como mínimo tres analitos diferentes que se detectan mediante el uso de un fluoróforo de luz roja se pueden detectar poniendo en contacto de manera secuencial los como mínimo tres analitos con un primer agente que produce una señal detectable roja a partir de uno de los analitos. Tras la detección de esta señal detectable y la eliminación mediante lavado del primer agente, después se puede usar la puesta en contacto de los analitos restantes con un segundo agente que produce una señal detectable roja a partir de otro analito para detectar el segundo analito. Tras la detección de esta segunda señal detectable y la eliminación mediante lavado del segundo agente, después se puede usar la puesta en contacto del analito restante con un tercer agente que produce una señal detectable roja a partir de este analito restante para detectar el tercer analito.

En ciertas realizaciones, uno o más de los agentes de captura diferentes se proporcionan en disolución. En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes de captura diferentes se proporcionan en disolución. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes de captura diferentes se proporcionan en disolución. En ciertas realizaciones, el uso de uno o más agentes de captura y/o uno o más agentes detectables en disolución proporciona una ventaja para la detección de múltiples analitos, ya que permite el uso de cantidades inferiores de agente de captura y/o agente detectable. En ciertas realizaciones, esto también permite que se unan múltiples agentes de captura al sustrato sólido simultáneamente, lo que proporciona ventajas para la detección de múltiples analitos, tales como la eficacia de detección y/o tiempos de detección reducidos.

El uso de un agente de captura en disolución en ciertas realizaciones proporciona una o más ventajas. Por ejemplo, el uso de un agente de captura en disolución en ciertas realizaciones puede favorecer la unión de un agente de captura a un analito, y de ese modo favorecer la formación de un complejo del agente de captura y el analito. En ciertas realizaciones en las que se usa un agente detectable que se une al analito, el uso de un agente de captura en disolución en ciertas realizaciones favorece la unión de un agente de captura a un analito, y de ese modo favorece la formación de un complejo de un agente de captura, un analito y un agente detectable.

A este respecto, se entenderá que, en ciertas realizaciones, dos o más agentes de captura diferentes se pueden proporcionar en disolución antes de poner en contacto los dos o más agentes de captura diferentes con la muestra. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, dos o más agentes de captura diferentes se proporcionan en una forma en la que los dos o más agentes de captura diferentes no están inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido, y se proporcionan en un estado sustancialmente líquido.

En ciertas realizaciones, el uso de dos o más agentes de captura diferentes en disolución también reduce la cantidad

de un agente de captura que se necesita usar en comparación con los ensayos previos, ya que se necesita más agente de captura en los ensayos cuando el agente de captura está preadsorbido en un sustrato sólido. En ciertas realizaciones, no existe una preinmovilización o preadsorción de un agente de captura en el como mínimo un sustrato sólido.

5 Como se describe en la presente memoria, en ciertas realizaciones, el como mínimo un sustrato sólido no comprende uno o más agentes de captura preadsorbidos o preinmovilizados. Sin embargo, en ciertas realizaciones, si se desea, el como mínimo un sustrato sólido puede comprender uno o más agentes de captura preadsorbidos o preinmovilizados.

10 En ciertas realizaciones, dos o más de los agentes detectables diferentes se proporcionan en disolución. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, dos o más de los agentes detectables diferentes se proporcionan en una forma no inmovilizada en un sustrato sólido, y se proporcionan en un estado sustancialmente líquido. En ciertas realizaciones, los como mínimo dos agentes detectables diferentes se proporcionan en disolución. En ciertas realizaciones, cada uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes se proporcionan en disolución.

15 En ciertas realizaciones, el uso de dos o más agentes detectables en disolución puede proporcionar una o más ventajas, que incluyen favorecer la formación y detección de un complejo de un agente de captura, un analito y un agente detectable. En ciertas realizaciones, los métodos pueden favorecer la formación de un complejo entre un agente de captura, un analito y un agente detectable antes o de manera simultánea con la puesta en contacto del complejo con el sustrato sólido, lo que puede impedir o inhibir la unión de un agente de captura al sustrato sólido en una orientación que no sea susceptible a la unión del analito. Así, puede haber disponible una proporción mayor de un agente de captura usado para la unión al analito.

20 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende un agente de captura, un analito y un agente detectable que forman un complejo. En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende la unión de dos o más complejos (por medio del ligando) al como mínimo un sustrato sólido para formar un complejo inmovilizado. Así, en ciertas realizaciones, se inmoviliza un complejo en el sustrato sólido.

25 En ciertas realizaciones, la detección de dos o más analitos diferentes comprende poner en contacto la muestra, dos o más agentes de captura diferentes, dos o más agentes detectables diferentes y como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción, para formar una mezcla puesta en contacto.

30 En ciertas realizaciones, los componentes se ponen en contacto en el recipiente de reacción, para permitir la formación de complejos entre los dos o más agentes de captura diferentes, dos o más de los analitos diferentes y dos o más agentes detectables diferentes, y los complejos son capaces de ser inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido simultáneamente o tras la formación.

35 Como se describe en la presente memoria, en ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes comprende poner en contacto la muestra, los como mínimo dos agentes de captura, los como mínimo dos agentes detectables y el como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción, para formar una mezcla puesta en contacto. En ciertas realizaciones, la mezcla puesta en contacto se mezcla. En ciertas realizaciones, mezclar la mezcla puesta en contacto puede proporcionar un incremento de la eficacia de unión. En ciertas realizaciones, el método comprende mezclar la mezcla puesta en contacto. En ciertas realizaciones, la mezcla puesta en contacto no se mezcla. En ciertas realizaciones, el método comprende no mezclar la mezcla puesta en contacto.

40 En ciertas realizaciones, los componentes se ponen en contacto en el recipiente de reacción, para permitir la formación de un complejo entre un agente de captura, un analito y un agente detectable, y el complejo es capaz de ser inmovilizado en el sustrato sólido (simultáneamente o tras la formación).

45 Como se describe en la presente memoria, en ciertas realizaciones, la puesta en contacto de la muestra, dos o más agentes de captura diferentes, dos o más agentes detectables diferentes y el como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción permite la unión de los dos o más agentes de captura diferentes y los dos o más agentes detectables diferentes a dos o más analitos diferentes para formar uno o más complejos. Tras la formación, el o los complejos se pueden inmovilizar en el como mínimo un sustrato sólido.

50 En ciertas realizaciones, antes de poner en contacto los componentes en el recipiente de reacción, se pueden poner en contacto componentes individuales específicos entre sí. En ciertas realizaciones, la puesta en contacto de uno o más de los componentes individuales se puede dar en el recipiente de reacción, o se puede dar en un recipiente de reacción diferente.

En ciertas realizaciones, la muestra, cada uno de los agentes de captura diferentes, cada uno de los agentes detectables y el sustrato sólido no se ponen en contacto en un recipiente diferente antes de ponerlos en contacto en el recipiente de reacción. Así, la combinación de los componentes se pone en contacto por primera vez en el recipiente de reacción.

55 En ciertas realizaciones, la muestra y el como mínimo un sustrato sólido se ponen en contacto antes de ponerlos en contacto con los dos o más agentes de captura diferentes y/o los dos o más agentes detectables diferentes. Como

se discute en la presente memoria, en ciertas realizaciones, este método particular de puesta en contacto proporciona una o más ventajas al rendimiento de algunos de los métodos de la presente descripción, ya que dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes se exponen al analito en presencia del sustrato sólido.

- 5 En ciertas realizaciones, la muestra y el como mínimo un sustrato sólido se ponen en contacto antes de ponerlos en contacto con dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes.

En ciertas realizaciones, la muestra y el como mínimo un sustrato sólido se ponen en contacto simultáneamente con dos o más agentes de captura diferentes y/o dos o más agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, la muestra y el como mínimo un sustrato sólido se ponen en contacto primero en el recipiente de reacción.

- 10 En ciertas realizaciones en las que el como mínimo un sustrato sólido forma parte del recipiente de reacción, la muestra se puede añadir al recipiente de reacción y posteriormente se ponen en contacto dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes con la muestra y el sustrato sólido. En ciertas realizaciones, dos o más de los agentes de captura diferentes se preinmovilizan en el como mínimo un sustrato sólido y posteriormente se ponen en contacto con la muestra y/o dos o más agentes detectables diferentes.

- 15 En ciertas realizaciones, la muestra y el como mínimo un sustrato sólido no se incuban sustancialmente antes de ponerlos en contacto con dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, esto puede proporcionar una ventaja reduciendo el tiempo necesario para detectar uno o más de los analitos diferentes.

- 20 En ciertas realizaciones, dos o más de los agentes de captura diferentes y uno o más de los agentes detectables diferentes se ponen en contacto entre sí antes de ponerlos en contacto con uno o ambos de la muestra y el como mínimo un sustrato sólido. En general, esto se puede conseguir poniendo en contacto primero dos o más de los agentes de captura diferentes y dos o más de los agentes detectables diferentes en un recipiente diferente. En ciertas realizaciones, se ponen en contacto primero pares específicos de dos o más de los agentes de captura diferentes y dos o más de los agentes detectables diferentes en un recipiente diferente.

- 25 En ciertas realizaciones, dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más del agente detectable diferente se ponen en contacto de manera secuencial con la muestra previamente puesta en contacto y/o el como mínimo un sustrato sólido.

- 30 En ciertas realizaciones, los métodos pueden utilizar un protocolo de ELISA estándar. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el método comprende proporcionar los agentes de captura y la muestra en el recipiente de reacción, lavar el sustrato sólido y posteriormente proporcionar los agentes detectables en el recipiente de reacción.

En ciertas realizaciones, se forman complejos que comprenden un analito, una agente de captura y un agente detectable antes de la unión entre el agente de inmovilización y el ligando. Los complejos se pueden formar mediante la adición secuencial o simultánea de un agente de captura y un agente detectable a un analito antes de poner en contacto el complejo con un agente de inmovilización en el como mínimo un sustrato sólido.

- 35 En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes comprende una incubación de la muestra puesta en contacto, el sustrato sólido, dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, la incubación es durante un tiempo de 2 horas o menos, 90 minutos o menos, 80 minutos o menos, 70 minutos o menos, 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, o 15 minutos o menos. En ciertas realizaciones, la incubación es durante un tiempo de 2 horas o más, 90 minutos o más, 80 minutos o más, 70 minutos o más, 60 minutos o más, 50 minutos o más, 40 minutos o más, 30 minutos o más, o 15 minutos o más. En ciertas realizaciones, la incubación es de 10 minutos a 2 horas, 10 minutos a 1 hora, 15 minutos a 2 horas, 15 minutos a 1 hora, 30 minutos a 2 horas, 30 minutos a 1 hora, o 1 hora a 2 horas.

- 45 En general, la detección de los analitos diferentes puede comprender el lavado del como mínimo un sustrato sólido del recipiente de reacción para eliminar uno o más agentes de captura diferentes y/o uno o más agentes detectables diferentes no unidos al como mínimo un sustrato sólido. El lavado se puede llevar a cabo, por ejemplo, tras poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con cada agente de captura y/o cada agente detectable, tras poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con todos los agentes de captura y/o agentes detectables, en cualquier etapa intermedia, o una combinación de uno o más de lo anteriormente mencionado en el protocolo.

- 50 Sin embargo, según la presente invención, la detección de los analitos diferentes no comprende ningún lavado adicional del como mínimo un sustrato sólido tras poner en contacto el sustrato sólido con una o más de las muestras, dos o más de los agentes de captura diferentes y/o dos o más de los agentes detectables diferentes.

Por ejemplo, en las realizaciones que utilizan un sistema de captura de marcador peptídico/anticuerpo, tales sistemas pueden ayudar a reducir las etapas que implican el lavado del sustrato sólido.

- 55 También se describe en la presente memoria una incubación de la muestra puesta en contacto, el sustrato sólido,

5 uno o más de los agentes de captura diferentes y/o uno o más de los agentes detectables diferentes antes del lavado del sustrato sólido. La incubación puede ser durante un tiempo de 2 horas o menos, 90 minutos o menos, 80 minutos o menos, 70 minutos o menos, 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 15 minutos o menos, o 10 minutos o menos. En ciertas realizaciones, la incubación es durante un tiempo de 2 horas o más, 90 minutos o más, 80 minutos o más, 70 minutos o más, 60 minutos o más, 50 minutos o más, 40 minutos o más, 30 minutos o más, 15 minutos o más o 10 minutos o más. En ciertas realizaciones, la incubación es de 10 minutos a 2 horas, 10 minutos a 1 hora, 15 minutos a 2 horas, 15 minutos a 1 hora, 30 minutos a 2 horas, 30 minutos a 1 hora, o 1 hora a 2 horas.

10 En la presente invención, no hay un lavado adicional del como mínimo un sustrato sólido tras poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con dos o más de las muestras, dos o más agentes de captura diferentes y/o dos o más agentes detectables diferentes. Como se describe en la presente memoria, en las realizaciones que utilizan un sistema de captura péptido/anticuerpo, tales sistemas pueden ayudar a reducir las etapas que implican el lavado del sustrato sólido.

15 En estas realizaciones, se apreciará que no hay un lavado adicional del como mínimo un sustrato sólido después de poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con una o más de las muestras, dos o más agentes de captura diferentes y dos o más agentes detectables diferentes.

20 En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se puede llevar a cabo mediante el uso solamente de una única etapa de lavado llevada a cabo durante todo el método. El uso de un protocolo de un lavado puede proporcionar una o más ventajas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el uso de un protocolo de un lavado puede proporcionar una ventaja al número de etapas de manipulación implicadas y al tiempo necesario para llevar a cabo la detección, y también puede proporcionar una mejora en la eficacia y el rendimiento del método.

25 Sin embargo, en ciertas realizaciones, se puede variar el protocolo de un lavado, si se desea, para añadir lavados o aclarados rápidos adicionales en diversas etapas del protocolo, o para añadir lavados o aclarados adicionales en diversas etapas del protocolo. Por ejemplo, el sustrato sólido se puede lavar antes de ponerlo en contacto con la muestra, lavarlo antes de ponerlo en contacto con un agente de captura, lavarlo después de ponerlo en contacto con un agente de captura, lavarlo antes de ponerlo en contacto con un agente detectable, lavarlo después de ponerlo en contacto con un agente detectable, lavarlo antes de una etapa de incubación, lavarlo después de una etapa de incubación, lavarlo después de la detección, lavarlo antes de la adición de un sustrato a un agente detectable, lavarlo después de la adición de un sustrato a un agente detectable o una combinación de una o más de estas etapas de lavado, en el que no hay un lavado adicional del como mínimo un sustrato sólido después de poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con dos o más de la muestra, uno o más agentes de captura diferentes y dos o más agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, el recipiente de reacción comprende un dispositivo, tal como una punta de pipeta que comprende el como mínimo un sustrato sólido, y los lavados que se llevan a cabo durante el protocolo se dan en la punta, por ejemplo aspirando y expulsando el líquido una o más veces en la punta.

35 En ciertas realizaciones, la detección del o de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o menos, 90 minutos o menos, 80 minutos o menos, 70 minutos o menos, 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, o 15 minutos o menos desde la puesta en contacto de la muestra con uno o más agentes de captura diferentes y/o uno o más agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, la detección de uno o más analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o más, 90 minutos o más, 80 minutos o más, 70 minutos o más, 60 minutos o más, 50 minutos o más, 40 minutos o más, 30 minutos o más, 20 minutos o más, o 15 minutos o más desde la puesta en contacto de la muestra con uno o más agentes de captura diferentes y/o uno o más agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, la incubación es de 15 minutos a 2 horas, 15 minutos a 1 hora, 30 minutos a 2 horas, 30 minutos a 1 hora, o 1 hora a 2 horas.

45 Muchos ensayos para detectar múltiples analitos pueden necesitar más de 6 horas para completarse, y pueden utilizar múltiples etapas de incubación y lavado diferentes a lo largo del protocolo. En ciertas realizaciones de los métodos de la presente descripción, la detección de los analitos diferentes se puede llevar a cabo en un tiempo más corto y/o con menos lavados. En ciertas realizaciones, esto puede dar como resultado una reducción de las etapas de manipulación, lo que puede permitir una reducción de las fuentes habituales de variación que se introducen por las múltiples etapas de manipulación, lavado de placas, y etapas extra de pipeteo.

50 En ciertas realizaciones, un número reducido de lavados puede permitir que la detección se lleve a cabo de una manera más simple y rápida. Además, en ciertas realizaciones, el número reducido de lavados permite que los agentes de captura y/o los agentes detectables puedan tener una afinidad de unión inferior hacia el analito.

55 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el número reducido de lavados permite que la detección use anticuerpos (como agentes de captura y/o agentes detectables) que pueden tener una afinidad de unión al analito baja o inferior.

En ciertas realizaciones, el o los agentes de captura diferentes y/o el o los agentes detectables tienen una  $K_d$  para la unión al analito mayor de  $10^{-6}$  M. En realizaciones adicionales, una  $K_d$  para la unión es mayor de  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M o  $10^{-9}$  M. En ciertas realizaciones, la  $K_d$  está en el intervalo de  $10^{-8}$  M a  $10^{-12}$  M.

En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes comprende la detección de un analito mediante la detección de la presencia de un agente detectable unido al sustrato sólido en el recipiente de reacción.

5 En ciertas realizaciones, la detección de un analito se consigue mediante la detección de la presencia de un agente detectable presente en un complejo inmovilizado en el como mínimo un sustrato sólido en el recipiente de reacción. La detección de un analito mediante la detección de la presencia de un agente detectable unido al como mínimo un sustrato sólido se puede conseguir mediante un método adecuado. En la presente memoria se describen ejemplos de agentes detectables.

10 Como se describe en la presente memoria, el tiempo invertido en llevar a cabo un método para detectar los analitos diferentes puede ser una consideración importante. En ciertas realizaciones, la presente descripción minimiza el número de etapas de incubación, manipulación y/o lavado. En ciertas realizaciones, esto puede hacer que la detección de los analitos diferentes sea susceptible de automatización. Los ensayos previos son difíciles de automatizar, ya que son necesarias múltiples etapas de manipulación, lo que incluye varias etapas de aspiración, dispensación y lavado.

15 En ciertas realizaciones, la reducción del número de etapas de incubación y/o etapas de lavado que son necesarias puede permitir que se maximice la duración de la etapa de unión de un complejo al sustrato sólido, sin incrementar la duración total del método. Esto también puede incrementar la sensibilidad de los métodos. Ciertas realizaciones de la presente descripción contemplan, si se desea, diversas combinaciones con respecto al número de etapas de incubación, manipulación y/o lavado.

20 En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o menos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura diferentes y/o los agentes detectables diferentes. En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de 90 minutos o menos, 70 minutos o menos, 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 45 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, o 10 minutos o menos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura y/o los agentes detectables. En ciertas realizaciones, la detección del analito se  
25 consigue en un periodo de tiempo de 10 minutos a 120 minutos, 10 minutos a 90 minutos, 10 minutos a 60 minutos, 15 minutos a 120 minutos, 15 minutos a 90 minutos, 15 minutos a 60 minutos, 15 minutos a 30 minutos, 30 minutos a 120 minutos, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 45 minutos a 120 minutos, 45 a 90 minutos, o 45 minutos a 60 minutos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura y/o los agentes detectables. En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de menos de  
30 60 minutos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura y/o los agentes detectables. En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de menos de 30 minutos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura diferentes y/o los agentes detectables diferentes.

35 En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o menos, 90 minutos o menos, 80 minutos o menos, 70 minutos o menos, 1 hora o menos, 45 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, en un periodo de tiempo de 10 minutos a 120 minutos, 10 minutos a 90 minutos, 10 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 30 minutos, 15 minutos a 120 minutos, 15 minutos a 90 minutos, 15 minutos a 60 minutos, 30 minutos a 120 minutos, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 45 minutos a 120 minutos, 45 a 90 minutos, 45 minutos a 75 minutos, o 45 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 120 minutos, 10 minutos a 90 minutos, 10 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 30 minutos, 15 minutos a 120 minutos, 15 minutos a 90 minutos, 15 minutos a 60 minutos, 30 minutos a 120 minutos, 30 minutos a  
40 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 45 minutos a 120 minutos, 45 a 90 minutos, 45 minutos a 75 minutos, o 45 minutos a 60 minutos.

45 En ciertas realizaciones, las señales detectables se pueden producir con menos agente de captura y/o un área superficial reducida de sustrato sólido. Como tales, ciertas realizaciones pueden ser adecuadas para sistemas microfluídicos, en los que es deseable la miniaturización de estructuras y la minimización de los reactivos usados. En ciertas realizaciones, el método y/o kits se pueden llevar a cabo en un sistema microfluídico.

50 Los ejemplos de sistemas microfluídicos pueden incluir, por ejemplo, dispositivos microfluídicos de tipo "laboratorio en un chip"; placas de microtitulación de alta densidad, tales como placas de microtitulación de 384, 1536, 3456 o 9600 pocillos; micromatrices y similares.

55 En ciertas realizaciones, los métodos muestran una variabilidad baja para la detección de un analito entre reacciones. En ciertas realizaciones, los métodos muestran una variabilidad baja intra-placa. En ciertas realizaciones, la variabilidad intra-placa es del 30% o menos, 20% o menos, o 10% o menos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los métodos muestran una variabilidad baja intra-placa para la detección de un analito, tal como una variabilidad intra-placa del 30% o menos, 20% o menos, o 10% o menos.

En ciertas realizaciones, la detección de los analitos diferentes comprende proporcionar uno o más filtros y/o una o más fuentes de luz y/o uno o más detectores de luz a un dispositivo lector, tal como un lector de placas, para permitir la detección de los analitos diferentes.

En ciertas realizaciones, el método comprende proporcionar uno o más filtros y/o una o más fuentes de luz y/o uno o más detectores de luz a un dispositivo lector de placas para permitir la detección de los como mínimo dos analitos diferentes.

5 Ciertas realizaciones proporcionan un método para detectar analitos diferentes que tienen una o más de las ventajas descritas en la presente memoria, por ejemplo, un método para detectar analitos diferentes que tiene como mínimo una de las siguientes ventajas: la capacidad de distinguir como mínimo dos analitos diferentes en el recipiente de reacción; una reducción del solapamiento en las señales de detección usadas para detectar los como mínimo dos analitos; una reducción en la interferencia entre las señales de detección usadas para detectar los como mínimo dos analitos; proporcionar una sensibilidad suficiente para permitir la detección de cantidades bajas de los como mínimo dos analitos; la interferencia reducida de otros agentes en la muestra; la sencillez y/o ahorro en la detección de múltiples analitos; la capacidad de usar los equipos existentes para detectar los como mínimo dos analitos en el recipiente de reacción; la capacidad de usar lectores de placas existentes; el uso de cantidades bajas de reactivos para capturar y/o detectar los múltiples analitos; una capacidad elevada de unión de los reactivos; reducir el tiempo para detectar de manera adecuada los como mínimo dos analitos; reducir el número de etapas de incubación para detectar los como mínimo dos analitos; proporcionar una detección fiable de los como mínimo dos analitos; eliminar la necesidad de preincubación de ciertos componentes durante la detección de los múltiples analitos; reducir el número de etapas de dispensación durante la detección de los como mínimo dos analitos; reducir el número de etapas de aspiración durante la detección de los como mínimo dos analitos; reducir los costes de tiempo y manipulación necesarios para llevar a cabo el ensayo; usar una única plataforma de ensayo para detectar los como mínimo dos analitos; y proporcionar kits y/o plataformas de ensayo que son fáciles de fabricar y/o menos costosas para el fabricante.

También se describen en la presente memoria kits para la detección de analitos diferentes.

25 Un kit puede comprender uno o más de los reactivos discutidos en la presente memoria para llevar a cabo el método descrito en la presente memoria. Además, un kit puede comprender instrucciones para llevar a cabo una o más etapas del método como se describe en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria kits que pueden comprender uno o más de lo siguiente: una disolución para lavar el recipiente de reacción para eliminar agentes de captura y/o agentes detectables sin unir al recipiente de reacción; un tampón de lisis celular, un agente amplificador de la señal, e instrucciones para la detección de los analitos diferentes.

30 En ciertas realizaciones, los métodos de la presente descripción también se pueden llevar a cabo mediante la utilización de reactivos y/o instrucciones.

35 Como se describe en la presente memoria, un kit puede comprender instrucciones para la detección de los analitos diferentes en un tiempo de 2 horas o menos, 90 minutos o menos, 80 minutos o menos, 70 minutos o menos, 1 hora o menos, 45 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 15 minutos o menos, 10 minutos o menos, en un periodo de tiempo de 10 minutos a 120 minutos, 10 minutos a 90 minutos, 10 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 30 minutos, 15 minutos a 120 minutos, 15 minutos a 90 minutos, 15 minutos a 60 minutos, 30 minutos a 120 minutos, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 45 minutos a 120 minutos, 45 a 90 minutos, 45 minutos a 75 minutos, o 45 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 120 minutos, 10 minutos a 90 minutos, 10 minutos a 60 minutos, 10 minutos a 30 minutos, 15 minutos a 120 minutos, 15 minutos a 90 minutos, 15 minutos a 60 minutos, 30 minutos a 120 minutos, 30 minutos a 90 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 45 minutos a 120 minutos, 45 a 90 minutos, 45 minutos a 75 minutos, o 45 minutos a 60 minutos desde la puesta en contacto de la muestra con los agentes de captura y/o los agentes detectables.

45 Como se describe en la presente memoria, se puede usar una única placa de ensayo o plataforma de ensayo que es adecuada para muchos kits de ensayo diferentes. Esto puede proporcionar a los fabricantes varios beneficios, que incluyen requisitos reducidos con respecto al coste, la mano de obra y el control de calidad. Además, las inversiones se pueden reducir mediante la capacidad de usar menos cantidad de los agentes específicos del objetivo (tales como anticuerpos), lo que reduce los requisitos de costes y control de calidad, ya que se pueden usar lotes individuales de agentes específicos del objetivo para más kits de ensayo.

#### EJEMPLO 1

##### 50 *Materiales*

Los anticuerpos usados en los ejemplos siguientes incluyen: monoclonal de ratón anti-pERK (+/- biotilación); monoclonal de conejo anti-ERK total (+/- HRP); conjugado anti-conejo-HRP de asno; policlonal de conejo anti-S6 p240/44 (conjugado a HRP); monoclonal de ratón anti-S6 (biotilado); monoclonal de conejo anti-AKT pT308 (conjugado a HRP); monoclonal de ratón anti-AKT (biotilado); monoclonal de ratón anti-AKT pS473 (biotilado); y monoclonal de conejo anti-AKT (conjugado a HRP).

Otros reactivos y materiales usados en los ejemplos siguientes incluyen: sustrato de HRP quimiofluorescente amplificado QuantaRed™ (Thermo Scientific); comprimidos SIGMAFAST™ OPD (Sigma); placas Maxisorp™ de

inmunoensayo claras de 96 pocillos (Nunc); placas Maxisorp™ de inmunoensayo claras de 384 pocillos (Nunc); Estreptavidina (Sigma); disolución de bloqueo (1% de BSA en PBS que contiene un 0,05% de Tween 20); y lisado de células A431 que contiene pERK.

#### EJEMPLO 2 (Ejemplo de Referencia)

##### 5 Métodos

###### Protocolo de ELISA de 1 lavado

Se revistieron de manera pasiva placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp™ con estreptavidina y se bloquearon. Se añadieron lisados celulares de pERK (50 µL) a los pocillos, seguido de la adición de un tampón de reacción (50 µL) que contenía concentraciones pre-optimizadas de mAb de ratón anti-pERK biotinilado y mAb de conejo anti-ERK total-HRP (de manera alternativa se puede usar un tampón de reacción que contiene mAb de ratón anti-pERK biotinilado, mAb de conejo anti-ERK total y anti-IgG de conejo-HRP).

En ciertos casos, se llevó a cabo una preincubación del lisado celular de pERK con los anticuerpos en una placa de muestras antes de la transferencia a la placa revestida de estreptavidina. Las placas se incubaron durante un mínimo de 30 min antes del lavado 3x con PBS-T, la adición de sustrato de HRP (100 µL) y la medida del producto. Se siguió un protocolo de 1 lavado similar al usar placas de 384 pocillos Nunc Maxisorp™. Los anticuerpos específicos de quinasa se suplementaron en el protocolo, y el volumen final de reacción fue 20 µL.

###### Protocolo comparativo de ELISA de múltiples lavados - placa revestida de estreptavidina

Se revistieron de manera pasiva placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp™ con estreptavidina y se bloquearon. Se añadió mAb de ratón anti-pERK biotinilado a los pocillos y se incubaron durante un mínimo de 30 min (100 µL). Las placas se lavaron 3x con PBS-T. Se añadieron lisados celulares de pERK a los pocillos y se incubaron durante un mínimo de 30 min (100 µL). Las placas se lavaron 3x con PBS-T. Se añadió mAb de conejo anti-ERK total-HRP a los pocillos y se incubaron durante un mínimo de 30 min (100 µL). Las placas se lavaron 3x con PBS-T antes de la adición del sustrato de HRP (100 µL) y la medida del producto.

###### Protocolo comparativo de ELISA de múltiples lavados - placa revestida de IgG anti-pERK

Se revistieron de manera pasiva placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp™ con mAb de ratón anti-pERK y se bloquearon. Se añadieron lisados celulares de pERK a los pocillos y se incubaron durante un mínimo de 30 min (100 µL). Las placas se lavaron 3x con PBS-T. Se añadió mAb de conejo anti-ERK total-HRP a los pocillos y se incubaron durante un mínimo de 30 min (100 µL). Las placas se lavaron 3x con PBS-T antes de la adición del sustrato de HRP (100 µL) y la medida del producto.

##### 30 EJEMPLO 3 (Ejemplo de Referencia)

###### *Resultados - Características del Ensayo*

###### Velocidad/Simplicidad

En sus formatos optimizados, el ensayo de 1 lavado rindió de manera comparable al ensayo de múltiples lavados con respecto a la sensibilidad (Figura 1). Esto fue evidente en placas revestidas de estreptavidina (Protocolos 1 y 2) y de IgG anti-pERK (Protocolo 3) para los periodos de incubación de 30 min (Figura 1A) y 60 min (Figura 1B). En general, se obtuvo una señal aproximadamente un 10% mayor a cada concentración de pERK respectiva en el ELISA de 1 lavado en comparación con los ELISAs de múltiples lavados, pero esto no se tradujo en una mejora significativa del límite de detección del ensayo. De manera importante, esto demostró que el ensayo de 1 lavado se pudo llevar a cabo con menos etapas de manipulación, y en menos de la mitad del tiempo que los ELISAs de múltiples lavados sin afectar negativamente a la sensibilidad. Esto se tradujo en un formato de ensayo de ELISA mucho más simple mediante la consolidación de múltiples etapas en un sistema de una única etapa de lavado.

###### Sensibilidad

Cuando los ELISAs de 1 lavado y de múltiples lavados se llevaron a cabo durante el mismo periodo total de tiempo de 1 h o menos, el ELISA de 1 lavado tuvo una sensibilidad superior (Figura 2). La comparación de una etapa de incubación de 1 x 30 min con etapas de incubación de 3 x 10 min en una placa revestida con estreptavidina (2A) demostró que el sistema de 1 lavado fue aproximadamente 10 veces más sensible que el sistema de múltiples lavados. Aunque de una manera no tan significativa, esta tendencia también fue perceptible al comparar un sistema de ensayo de 1 lavado de 1 x 60 min en una placa de estreptavidina, respecto de un sistema de múltiples lavados a 2 x 30 min en una placa revestida de IgG anti-pERK (2B). El beneficio principal del protocolo de ELISA de 1 lavado fue que permitió que sucedieran simultáneamente múltiples eventos de unión anticuerpo-antígeno en el único periodo de incubación de 30 o 60 minutos, y de ese modo mejoró la capacidad de detección de pERK por unidad de tiempo.

###### Eficacia del Anticuerpo de Captura

La dependencia de la concentración de IgG anti-pERK (+/- biotilación) para la detección de pERK se estudió en cada uno de los protocolos de ELISA (Figura 3). Con o sin una etapa de preincubación, el protocolo de 1 lavado necesitó aproximadamente 4x y 10x menos IgG anti-pERK para detectar la misma cantidad de pERK en comparación con los protocolos de ELISA de múltiples lavados 3 y 4, respectivamente. La importancia de una etapa de preincubación (protocolo 1 frente al protocolo 2) en el ELISA de 1 lavado fue perceptible cuando las concentraciones de IgG anti-pERK fueron 100 ng/mL o menos. A estas concentraciones inferiores, se pudo detectar más pERK por unidad de anticuerpo (señal aprox. un 15% mayor) cuando se incorporó una etapa de preincubación en el protocolo de 1 lavado. En conjunto, estos resultados indicaron que el protocolo de 1 lavado fue más eficaz en su uso de IgG anti-pERK en comparación con el formato de múltiples lavados para la detección de la misma cantidad de pERK. Una explicación posible para este fenómeno fue que el formato de 1 lavado permitió la formación de complejos inmunitarios de pERK en fase de disolución, lo que permitió su unión a estreptavidina o la superficie revestida de IgG anti-pERK de una manera más orientada, y de ese modo se mejoró la funcionalidad del anticuerpo. A la inversa, en ausencia de pERK e IgG de detección, la IgG anti-pERK biotinilada o sin biotilar se pudo unir de manera aleatoria a la superficie, lo que puede haber conducido a que una porción de los sitios de unión de IgG hacia pERK se hagan inaccesibles a pERK y/o se dificulten estéricamente los sucesos de unión posteriores en la reacción tipo sándwich (es decir, IgG de detección).

El fenómeno de la eficacia mejorada de IgG anti-pERK destacado en la Figura 3 para el formato de ELISA de 1 lavado se investigó adicionalmente separando los múltiples sucesos de unión anticuerpo-antígeno del ensayo de pERK (Figura 4). Esto destacó que la formación independiente de pERK con IgG anti-ERK total-HRP o IgG anti-pERK (protocolos 2 y 3, respectivamente), antes de la unión a su molécula de unión inmovilizada en la placa, contribuyó al uso más eficaz de IgG anti-pERK en el formato de ELISA de 1 lavado. Individualmente, los protocolos 2 y 3 fueron aproximadamente 2 veces más eficaces con su uso de IgG anti-pERK para la detección de pERK en comparación con el ELISA de múltiples lavados (protocolo 4). Además, cuando se dejó que los sucesos de unión individuales de los protocolos 2 y 3 se dieran simultáneamente como parte del ELISA de 1 lavado (protocolo 1), el uso de IgG anti-pERK en comparación con el procedimiento de múltiples lavados fue 4-5 veces menor al medir la misma concentración de pERK. Finalmente, esto destacó que la unión de ambos anticuerpos a pERK en disolución fue importante para mejorar la funcionalidad de la IgG anti-pERK usada en el ELISA de 1 lavado. Esto daría como resultado un menor uso de reactivo (es decir, anticuerpo), y por lo tanto un coste de ensayo reducido, en comparación con el formato de ELISA de múltiples lavados.

#### Versatilidad

El protocolo de ELISA de 1 lavado también se puso a prueba mediante el uso de un anticuerpo de detección secundario que estaba conjugado a HRP (Figura 5). Esto se consiguió sustituyendo el anti-ERK total-HRP con el anticuerpo original sin conjugar (es decir, sin HRP), e introduciendo anti-IgG de conejo-HRP como anticuerpo de detección secundario. Es decir, este experimento usó un protocolo de 3 anticuerpos en el formato de ELISA de 1 lavado y produjo una señal de  $A_{450}$  para pERK de aproximadamente 1,0 UA y un valor señal:ruido de 10. Aunque sin optimizar, en principio esta aproximación de detección secundaria se validó en un protocolo de 1 lavado y destacó la versatilidad del ELISA de 1 lavado con el uso de como mínimo 3 anticuerpos.

#### Robustez

También se consiguió la detección de otras fosfoproteínas, que incluyen S6 p240/44, AKT pT308 y AKT pS473, en el sistema de ELISA de 1 lavado (Figura 6). En placas de 384 pocillos revestidos de estreptavidina, se consiguieron proporciones señal:ruido de más de 60 al ensayar lisados celulares que contenían las fosfoproteínas específicas de interés. Como el protocolo de pERK, el ensayo de AKT pS473 también usó una IgG anti-fosfo como anticuerpo de captura con una IgG anti-total usada como anticuerpo de detección (es decir, conjugado a HRP). De manera alternativa, los ensayos de S6 p240/44 y AKT pS473 usaron una IgG anti-total como anticuerpo de captura, con una IgG anti-fosfo-HRP específica que completaba la reacción tipo sándwich. Estos resultados demostraron la robustez del ELISA de 1 lavado con su capacidad de detectar objetivos diferentes en orientaciones variables del complejo inmunitario.

#### EJEMPLO 4 (Ejemplo de Referencia)

##### *Microfluídica*

Se llevaron a cabo reacciones microfluídicas en un cartucho microfluídico como se muestra en la Figura 7. Con respecto a la Figura 7, el cartucho microfluídico 700 comprende un sustrato de plástico 710 en el que hay formados una diversidad de canales de flujo 730. Se introduce una muestra en el canal de flujo 730 a través de la entrada de muestra 720. La muestra se mueve después a lo largo del canal de flujo 730 mediante una bomba (no mostrada). La región de detección 740 comprende un electrodo para la detección electroquímica, en la que hay unido un agente de inmovilización. En las realizaciones descritas en los siguientes ejemplos, el agente de inmovilización es estreptavidina. Además, aunque la presente invención contempla cualquier electrodo adecuado y método para la detección electroquímica, el método descrito en los siguientes ejemplos utiliza los electrodos y métodos de detección descritos en la patente de EE.UU. 6.770.190. Después de pasar a lo largo del área de detección 740, la muestra se transporta al área de recogida de residuos 750.

A continuación se describe un ejemplo del método de la presente invención llevado a cabo en el cartucho microfluídico:

Las muestras se mezclaron con un tampón de reacción (solución salina tamponada con fosfato, BSA al 0,3%, Tween al 0,1%) que contenía dos anticuerpos hacia el analito de interés. Para cada analito, los dos anticuerpos se generaron hacia epítomos diferentes del analito de interés, de forma que ambos anticuerpos se pudieran unir simultáneamente a la proteína de interés. Uno de los anticuerpos llevó a cabo la función de un agente de captura y estaba unido a biotina, mientras el otro anticuerpo llevó a cabo la función de un agente detectable y estaba unido a peroxidasa de rábano (HRP).

Las muestras a medir contenían cantidades variables de un analito de interés, en los presentes ejemplos fosfo-ERK o fosfo-AKT. Se colocó un cartucho microfluídico (véase la Figura 7) en un instrumento de bombeo y detección, y las muestras se colocaron en el cartucho microfluídico en diferentes carriles del cartucho. El cartucho unió el anticuerpo biotinilado a la región de detección. Como se expuso anteriormente, la región de detección comprendía un electrodo para la detección electroquímica, a la que estaba unida estreptavidina como agente de inmovilización. Como tal, un complejo que comprendiese el anticuerpo de captura biotinilado, el analito unido y el anticuerpo detectable unido a HRP se inmovilizaría en el electrodo por medio de la interacción de la biotina del anticuerpo de captura y la estreptavidina del electrodo.

Tras la captura, el cartucho se lavó automáticamente con tampón sin anticuerpos. Tras esta etapa de lavado, se introdujo una disolución que contenía sustrato de HRP (SigmaFAST OPD) en el cartucho, lo que permitió que la HRP unida convirtiese el sustrato de HRP en productos que se pudieran detectar electroquímicamente mediante el electrodo y el equipo de detección presente en el dispositivo de bombeo. Las señales eléctricas generadas fueron proporcionales al nivel de conversión de producto inducido por HRP, que fue proporcional a la cantidad de analito unida a los anticuerpos de captura.

EJEMPLO 5 (Ejemplo de Referencia)

*Detección de pERK mediante el uso de un sistema microfluídico*

Se diluyó pERK recombinante en tampón de lisis 1X, con cuatro diluciones en serie desde una concentración superior de 400 ng/ml (10 nM). Las muestras se preincubaron con un volumen igual de tampón de reacción (véase anteriormente).

La mezcla muestra/tampón de reacción se analizó después en un cartucho microfluídico como se describió en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Figuras 8A-8C. Cada punto de datos mostrado es la media de 3 celdas de flujo de un único cartucho. Los datos se transformaron tomando como cero el punto en el que comienza la inyección de sustrato. Los datos se recogieron desde el punto en el que el flujo de sustrato comienza hasta el final de la fase de incubación del sustrato (180 s tras la inyección del sustrato).

Como se puede observar comparando las Figuras 8b y 8c, la recogida de datos al final de la fase de incubación del sustrato (180 s tras la inyección del sustrato) pareció proporcionar una sensibilidad mayor. Mediante el uso de los datos tomados de los 180 segundos tras la inyección del sustrato, el límite de detección del chip fue de alrededor de 2 ng/ml de pERK.

EJEMPLO 6 (Ejemplo de Referencia)

*Detección de pAKT mediante el uso de un sistema microfluídico*

Se diluyó pAKT473 recombinante en tampón de lisis 1X, con cinco diluciones en serie desde una concentración superior de 100 ng/ml. Las muestras se preincubaron durante dos horas con un volumen igual de tampón de reacción (véase anteriormente) para equilibrar la interacción y así minimizar los efectos de la incubación durante el análisis.

La mezcla muestra/tampón de reacción se analizó después en un cartucho microfluídico como se describió en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en las Figuras 9A-9C. Cada punto de datos mostrado es la media de 3 celdas de flujo de un único cartucho. Los datos se transformaron tomando como cero el punto en el que comienza la inyección de sustrato. Los datos se recogieron desde el punto en el que el flujo de sustrato comienza hasta el final de la fase de incubación del sustrato (180 s tras la inyección del sustrato).

Mediante el uso de los datos tomados de los 180 segundos tras la inyección del sustrato, el límite de detección del chip fue de alrededor de 1 ng/ml de pAKT.

EJEMPLO 7 (Ejemplo de Referencia)

*Orden de reactivos de las permutaciones de adición*

Se añadió el anticuerpo de captura (conjugado anti-pERK-péptido o conjugado anti-pERK-biotina), el anticuerpo de detección (conjugado anti-ERK total-HRP), mezcla de anticuerpo de captura/detección, y concentraciones variables

de un lisado celular que contenía pERK a (A) placas revestidas de anticuerpo anti-conjugado peptídico o (B) microplacas revestidas de estreptavidina, en 8 permutaciones diferentes (véanse las Tablas 1 y 2). Los componentes individuales del ensayo se añadieron con una separación de 1 min a las placas, y se incubaron durante 2 h. Las placas se lavaron, se incubaron con sustrato de HRP, antes de la detección del producto fluorescente.

5 Tabla 1: Volúmenes de reactivo para el estudio del orden de adición

Componente de Ensayo	Volumen/Pocillo
Mezcla de Anticuerpo de Captura/Detección	50 µl
Lisado	50µl
Anticuerpo de Captura	25 µl
Anticuerpo de Detección	25 µl

Tabla 2: Orden de reactivos de las permutaciones de adición

Ensayo nº	1ª Adición	2ª Adición	3ª Adición
1	Mezcla de Ab de Captura/Detección	Lisado	n/a
2	Lisado	Mezcla de Ab de Captura/Detección	n/a
3	Lisado	Ab de Captura	Ab de Detección
4	Lisado	Ab de Detección	Ab de Captura
5	Ab de Detección	Ab de Captura	Lisado
6	Ab de Detección	Lisado	Ab de Captura
7	Ab de Captura	Lisado	Ab de Detección
8	Ab de Captura	Ab de Detección	Lisado

10 El efecto del orden de adición de los reactivos sobre la detección de pERK en el ELISA de una incubación mediante el uso de diferentes sistemas de captura se muestra en la Figura 10. En las 8 permutaciones diferentes, y a varias concentraciones de analitos, se observaron pocas diferencias en las señales. Este resultado demuestra que se pueden obtener resultados equivalentes en un ensayo de ELISA de una incubación, independientemente del orden de adición de los componentes individuales.

EJEMPLO 8 (Ejemplo de Referencia)

15 *Curvas patrón con proteínas recombinantes en un entorno biológico diferente mediante el uso del sistema de captura de conjugado peptídico*

20 Se proporciona una demostración del uso del formato de ensayo de ELISA de una incubación para la detección de tres proteínas humanas recombinantes diluidas en suero humano en la Figura 11. Se midió EGF, IL-2 y TNFα en PBS/0,5% de BSA y suero humano. Los límites de detección de ≤ 10 pg/mL se determinaron para cada ensayo en PBS/0,5% de BSA, y se observó una sensibilidad similar para IL-2 y TNFα para el analito diluido en suero humano. El límite de detección para EGF en suero humano no se pudo detectar debido a la presencia de un nivel elevado de EGF endógeno, que se confirmó mediante el uso de un kit de ELISA de EGF comercial habitual (R&D Systems, datos no mostrados). La Figura 11 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado.

25 Estos datos ilustran que el formato de ensayo de ELISA de una incubación fue robusto para medir los analitos en un entorno biológico diferente. El ensayo demuestra claramente la eficacia para varios objetivos diferentes en suero, en el que los componentes de ensayo se incuban simultáneamente. La señal elevada para EGF en suero humano se debe a la presencia de proteína(s) EGF endógena(s) en este medio.

EJEMPLO 9 (Ejemplo de Referencia)

30 *Curvas patrón de proteínas recombinantes mediante el uso del sistema de captura de conjugado peptídico en un ELISA de una incubación de 10 min*

Se revistieron de manera pasiva placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp™ con un anticuerpo anti-marcador peptídico durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3x con PBS-T y se bloquearon con 200 µL/pocillo de una disolución

de BSA del 1% en PBS-T (0,05%). La disolución de bloqueo se aspiró antes del ensayo. Se añadió el analito (p.ej., 50 µL de proteína recombinante) a los pocillos, seguido de la adición de una mezcla anticuerpo-anticuerpo (50 µL) que contenía concentraciones preoptimizadas de anticuerpo de captura anti-analito conjugado con marcador peptídico y anticuerpo de detección anti-analito conjugado con HRP. Las placas se incubaron durante 10 min antes de lavar 3x con PBS-T. Se añadió un sustrato de HRP fluorescente (100 µL) a los pocillos y se incubaron durante 5 mins antes de medir el producto fluorescente.

Las proteínas humanas recombinantes EGF, IL-2 y TNFα se prepararon en PBS/0,5% de BSA a concentraciones que oscilaron de 100 ng/mL a 1 pg/mL, y se añadieron 50 µL/pocillo a una placa de ELISA con anticuerpo anti-marcador peptídico. Se añadió una mezcla de anticuerpo de captura/detección para EGF (A), IL-2 (B) y TNFα (C) a los pocillos adecuados de la placa de ELISA, y se incubó durante 10 min. Las placas se lavaron antes de la incubación con sustrato de HRP durante 5 min y la detección del producto fluorescente.

La Figura 12 muestra la detección de tres proteínas humanas recombinantes mediante el uso de un formato de ensayo de ELISA de una incubación de 10 min con una placa de ELISA revestida de anticuerpo anti-marcador peptídico. Se midieron con éxito las curvas patrón de EGF, IL-2 y TNFα en PBS/0,5% de BSA con límites de detección de ≤ 32 pg/mL determinados para cada ensayo. Estos datos ilustraron que el formato simplificado de ensayo de ELISA de captura con conjugado peptídico/una incubación fue adecuado para medir múltiples analitos en la misma placa en solamente 10 minutos. Como se puede observar, en el ELISA de una incubación de 10 minutos, el ensayo todavía fue capaz de detectar de manera eficaz los tres analitos, incluso a una concentración de analitos menor de 100 pg/ml.

#### EJEMPLO 10 (Ejemplo de Referencia)

##### *Variación intra-placa*

La Figura 13 muestra la variación intra-placa observada para 2 ELISAs diferentes de una incubación para fosfo-AKT (pSer473) o fosfo-STAT3. Para cada objetivo, el lisado celular se diluyó a 3 concentraciones diferentes mediante el uso de tampón de lisis 1X tal como se indica, y se añadió a 24 pocillos duplicados de una microplaca de 96 pocillos revestidos de estreptavidina. Para iniciar la reacción de ensayo, para cada objetivo, se añadió una mezcla del anticuerpo de captura conjugado a biotina y del anticuerpo de detección conjugado a HRP a los lisados, y se incubaron durante 1 hora. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar para cada ensayo. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 550 nm<sub>ex</sub>/600 nm<sub>em</sub>. Las Figuras 13A y 13B muestran los puntos de datos a cada concentración de lisado analizada, para fosfo-AKT y fosfo-STAT3, respectivamente. El coeficiente de variación (CV%) para cada concentración de analito se calculó dividiendo la desviación estándar observada en los 24 pocillos a cada concentración, por la media de los 24 pocillos a la misma concentración, y transformando esta fracción en un valor en porcentaje. En general, se desea un valor menor del 10% para muchos ensayos, por ejemplo, en ciertos ensayos de alta calidad, y los datos presentados aquí demuestran características adecuadas de baja variabilidad intra-placa.

#### EJEMPLO 11 (Ejemplo de Referencia)

##### *Detección de TNFα*

La Figura 14 muestra la detección de TNFα en sobrenadantes de cultivo tisular. Se sembraron células THP-1 en microplacas de 96 pocillos de cultivo tisular en medio de cultivo celular RPMI que contenía un 10% (v/v) de suero bovino fetal y otros diversos aditivos para el cultivo celular habitual. Las células se trataron después con diversas concentraciones de PMA diluido en el mismo medio, y se incubaron durante la noche en un incubador humidificado a 37 °C. Al día siguiente se aspiraron 50 µL de medio de los pocillos de cultivo celular, y se añadieron a los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos revestidos de péptido. La reacción de ensayo se inició mediante la adición de 50 µL de una mezcla de anticuerpos que contenía el conjugado anticuerpo de captura-péptido, y el conjugado anticuerpo de detección-HRP, y se incubó durante 1 hora. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar para cada ensayo. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP fluorescente a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. La señal fluorescente de los pocillos se midió a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>, y se cuantificó mediante el uso de una curva patrón generada contra el mismo objetivo. La Figura 14 muestra la media y las desviaciones estándar para los puntos de datos duplicados para cada objetivo analizado. En esta Figura, el ensayo demuestra una detección eficaz del analito objetivo específico en sobrenadantes de cultivo tisular mediante el uso de ciertas realizaciones en las que los componentes del ensayo se incuban simultáneamente.

#### EJEMPLO 12 (Ejemplo de Referencia)

##### *Detección de fosfo-AKT (pSer473) o fosfo-ERK en un tiempo total de ensayo de 25 min*

La Figura 15 muestra la detección de fosfo-AKT (pSer473) o fosfo-ERK en un tiempo total de ensayo de 25 min. Para cada objetivo, se diluyó (A) fosfo-AKT o (B) fosfo-ERK activos recombinantes tal como se indica, a diversas concentraciones, mediante el uso de tampón de lisis 1X que contenía un 0,1% de BSA, y se añadieron a 4 pocillos duplicados de una microplaca de 96 pocillos revestidos de estreptavidina. Para iniciar la reacción de ensayo, para

5 cada objetivo, se añadió una mezcla del anticuerpo de captura conjugado a biotina y del anticuerpo de detección conjugado a HRP a los lisados, y se incubaron durante 1 hora. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar para cada ensayo. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP QuantaRed™ a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 550 nm<sub>ex</sub>/600 nm<sub>em</sub>. Las Figuras 15A y 15B muestran los puntos de datos a cada concentración de analito analizada, para fosfo-AKT y fosfo-ERK, respectivamente. Ambos ensayos mostraron sensibilidad a menos de 1 ng/mL.

#### EJEMPLO 13 (Ejemplo de Referencia)

##### *Detección de IL-2 mediante el uso de un par péptido de ERK-anticuerpo de captura anti-péptido*

10 La Figura 16 muestra la detección de IL-2 mediante el uso de un par péptido de ERK-anticuerpo de captura anti-péptido. Se diluyó interleucina 2 (IL-2) recombinante tal como se indica, a diversas concentraciones mediante el uso de PBS 1X que contenía un 0,1% de BSA, y se añadió a pocillos duplicados de una microplaca de 96 pocillos revestidos de anticuerpo anti-péptido de ERK. Para iniciar la reacción de ensayo, para cada objetivo, se añadió una  
15 mezcla del anticuerpo de captura de péptido de ERK y del anticuerpo de detección conjugado a HRP a los lisados, y se incubaron durante 1 hora. Los pocillos se sometieron a un ciclo de lavado estándar para cada ensayo. Después del ciclo de lavado, se añadió el sustrato de HRP fluorescente a los pocillos, y cada placa se incubó durante 10 min en la oscuridad. Se midió la señal fluorescente de los pocillos a 540 nm<sub>ex</sub>/590 nm<sub>em</sub>. La Figura 16 muestra los puntos de datos a cada concentración de analito analizada, que demuestra sensibilidad a 100 pg/mL o menos.

#### EJEMPLO 14 (Ejemplo de Referencia)

##### *Discusión General*

20 El ELISA de una incubación usa un formato de tipo inmuno-sándwich, pero con al menos una diferencia. Para el ensayo de ELISA de una incubación, tanto el analito como los reactivos de ensayo se añaden a la microplaca de ensayo al mismo tiempo, en disolución. Después de un periodo corto de incubación, los reactivos de ensayo y analitos sin unir se eliminan mediante lavado, y se detectan los inmunocomplejos que contienen ambos anticuerpos.  
25 El ELISA de una incubación facilita al usuario un mayor grado de flexibilidad para el ensayo. En contraste con otros formatos de ELISA, en grupos de ejemplos particulares no hay presentes anticuerpos específicos del objetivo en la microplaca de ensayo propiamente dicha, y así se pueden llevar a cabo ensayos para objetivos diferentes en pocillos diferentes de la misma microplaca. Por ejemplo, se puede analizar un lisado celular en la misma microplaca de ensayo en paralelo con respecto a la fosforilación de p38-MAPK, fosforilación de ERK, fosforilación de AKT y fosforilación de JNK, lo que proporciona una información rápida, exacta y cuantificable sobre eventos clave de  
30 señalización celular. Sin embargo, si se desea, se pueden inmovilizar anticuerpos hacia el objetivo en la placa.

El ELISA de una incubación proporciona los resultados deseados de alta calidad de un inmunoensayo de tipo sándwich, y el ensayo permite el uso de kits independientes para llevar a cabo el ensayo.

Por ejemplo, un kit puede contener uno o más de los siguientes componentes:

- Reactivo de Anticuerpo de Captura
- 35 Reactivo de Anticuerpo de Detección
- Tampón de Lisis (por ejemplo, suministrado a una concentración 5X) que contiene una mezcla de detergentes para la lisis celular, e inhibidores de fosfatasa.
- Disolución Potenciadora - que contiene factores para potenciar el rendimiento del ensayo, tales como componentes anti-HAMA, y aditivos específicos del objetivo para incrementar el rendimiento del ensayo.
- 40 Tampón de Dilución de ADHP - que contiene cofactores necesarios para la conversión mediada por HRP de ADHP hasta resorufina.
- ADHP (por ejemplo, suministrado a una concentración 100X)
- Tampón de Lavado (por ejemplo, suministrado a una concentración 10X)
- Disolución de Parada - para detener la actividad de HRP cuando sea necesario
- 45 Lisado de Control de Ensayo
- Microplaca de ensayo
- Diluyente de ensayo - para la dilución de muestras concentradas

#### EJEMPLO 15

##### *Protocolos Generales de Ensayo*

(i) Protocolo para el uso con muestras tales como lisados celulares y sobrenadantes de cultivos tisulares

Protocolo de ensayo

1. Añadir 50 µl/pocillo de muestra a la microplaca de ensayo. Se pueden añadir 50 µl/pocillo de controles de ensayo a pocillos diferentes, si se desea.
- 5 2. Añadir 50 µl/pocillo de mezcla de anticuerpos a los pocillos. En general, es adecuada una concentración de anticuerpos en la mezcla de 50-500 ng/mL. Cubrir la microplaca e incubar a temp. ambiente en un agitador de microplacas (~300 rpm).
3. Lavar los pocillos con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (repetir 3 veces). Después del lavado final, eliminar cualquier disolución de lavado restante de los pocillos. Un tampón de lavado adecuado es PBS que contiene Tween 20.
- 10 4. Inmediatamente antes del uso, preparar la mezcla de sustratos. Una mezcla adecuada de sustratos es TMB, ADHP, OPD, u otros sustratos de HRP adecuados, diluidos con cofactores adecuados para actuar como mediadores en su conversión a subproductos medibles. Añadir 100 µl/pocillo de mezcla de sustratos. Cubrir la microplaca con papel de aluminio, e incubar durante 10 minutos a temp. ambiente en un agitador de microplacas (~300 rpm).
- 15 5. Añadir 10 µl/pocillo de disolución de parada, y mezclar brevemente (5-10 seg) en un agitador de microplacas. Una disolución de parada adecuada es un ácido diluido tal como HCl, o un detergente fuerte tal como SDS.
6. Leer la señal de fluorescencia con un grupo de filtros compatibles.

(ii) Protocolo para muestras de suero, u otras muestras que pueden portar interferencias específicas de la muestra

Protocolo de ensayo

- 20 1. Añadir 25 µl/pocillo de mezcla potenciadora. La mezcla potenciadora contiene componentes generales para la neutralización de HAMAs, así como otros componentes para la neutralización de proteínas de unión específica al objetivo portadas en el suero.
2. Añadir 50 µl/pocillo de muestra a la microplaca de ensayo. Se pueden añadir 50 µl/pocillo de controles de ensayo a pocillos diferentes, si se desea.
- 25 3. Añadir 25 µl/pocillo de mezcla de anticuerpos a los pocillos. Cubrir la microplaca e incubar durante 1 hora a temp. ambiente en un agitador de microplacas (~300 rpm).
3. Lavar los pocillos con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (repetir 3 veces). Después del lavado final, eliminar cualquier disolución de lavado restante de los pocillos.
- 30 4. Preparar el sustrato antes el uso y añadir 100 µl/pocillo. Cubrir la microplaca con papel de aluminio, e incubar durante 10 minutos a temp. ambiente en un agitador de microplacas (~300 rpm).
5. Añadir 10 µl/pocillo de disolución de parada, y mezclar brevemente (5-10 seg) en un agitador de microplacas.
6. Leer la señal de fluorescencia con un grupo de filtros compatibles.

EJEMPLO 16 (Ejemplo de Referencia)

35 *Detección de diversas concentraciones de IL-2 mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico*

La Figura 17 muestra la detección de diversas concentraciones de IL-2 mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico.

Se generaron anticuerpos en ratones en forma de anticuerpos monoclonales hacia un péptido de 23 aminoácidos, KRITVEEALAHYPYLEQYYDPTDE (SEQ ID N° 2), una secuencia derivada del extremo carboxiterminal de las proteínas ERK humanas (péptido C-terminal de ERK). Se revistieron de manera pasiva anticuerpos purificados (TGR, 12D4) hacia este péptido en una placa de inmunoensayo Nunc Maxisorp, y la placa se bloqueó después contra la unión inespecífica adicional de proteínas. El péptido C-terminal de ERK también se usó para conjugarlo a anticuerpos hacia la proteína IL-2 humana (R&D Systems), de forma que el péptido actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa. Se conjugó un segundo anticuerpo hacia IL-2 (R&D Systems) a peroxidasa de rábano (HRP) para usarlo como anticuerpo indicador. Se mezcló IL-2 humana recombinante con PBS/BSA (0,1%) a las diversas concentraciones mostradas, y a estas disoluciones se les añadieron los anticuerpos hacia IL-2. Después de una incubación de una hora, los pocillos se lavaron con un tampón de lavado, y se añadió un sustrato de HRP fluorescente durante 10 min, seguido de la lectura de la placa a longitudes de onda de ex/em de 540/590 nm en un lector de placas.

Se puede observar que el sistema de ensayo midió las concentraciones de IL-2 presentes en cada muestra, y que la variación entre muestras fue baja, tal como se indica mediante las pequeñas barras de error.

#### EJEMPLO 17 (Ejemplo de Referencia)

##### 5 *Detección de diversas concentraciones de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$ mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico*

La Figura 18 muestra la detección de diversas concentraciones de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico.

Se revistieron de manera pasiva anticuerpos específicos hacia el péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1; Sigma, número de catálogo F1804) en una placa de inmunoensayo Nunc Maxisorp a 5  $\mu$ g/mL durante la noche en PBS, y la placa se bloqueó después contra la unión inespecífica adicional de proteínas. El péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) también se usó para conjugarlo a anticuerpos IgG hacia la proteína IL-2 humana (R&D Systems), EGF humano o TNF $\alpha$  humano, de forma que el péptido actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa. También se conjugó un segundo anticuerpo detectable a cada analito (R&D Systems) a peroxidasa de rábano (HRP) para usarlo como anticuerpo indicador. Las IgGs de captura de péptidos (C-terminales) de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  y sus IgGs respectivas de detección con HRP se prepararon en tampón de reacción. Se diluyeron analitos puros como patrones en PBS/BSA (0,5%) a las diversas concentraciones mostradas. Se añadió el analito (50  $\mu$ L/pocillo) a la placa revestida y después se añadieron 50  $\mu$ L/pocillo de la mezcla de anticuerpos correspondiente (captura 200 ng/mL; detección 50 ng/mL). Después de una incubación de una hora con agitación, los pocillos se lavaron tres veces con un tampón de lavado, y se añadió el sustrato de HRP fluorescente (ADHP) durante 10 min, seguido de lectura de la placa a longitudes de onda ex/em de 540/590 nm en un lector de placas. Los datos muestran la detección sensible de cada uno de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$  en pocillos diferentes de una placa de microtitulación mediante el uso de un sistema de captura de anticuerpo anti-marcador peptídico con un único lavado.

#### EJEMPLO 18 (Ejemplo de Referencia)

##### 25 *Detección de diversas concentraciones de analito mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico*

La Figura 19 muestra la señal obtenida para diversas concentraciones de analito mediante el uso de un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-marcador peptídico.

Se generaron anticuerpos en ratones en forma de anticuerpos monoclonales hacia el péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1). Los anticuerpos purificados hacia este péptido se revistieron en una placa de inmunoensayo Nunc Maxisorp a 10  $\mu$ g/ml, y la placa se bloqueó después contra la unión inespecífica adicional de proteínas. El péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) también se usó para conjugarlo a anticuerpos hacia la proteína TNF $\alpha$  humana (R&D Systems), de forma que el péptido actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa. Se conjugó un segundo anticuerpo hacia TNF $\alpha$  (R&D Systems) a peroxidasa de rábano (HRP) para usarlo como anticuerpo indicador. Se mezcló TNF $\alpha$  con PBS/BSA (0,5%) a las diversas concentraciones mostradas, y a estas disoluciones se les añadieron los anticuerpos hacia IL-2 (captura 200 ng/mL; detección 50 ng/mL). Después de una incubación de una hora con agitación, los pocillos se lavaron con un tampón de lavado, y se añadió un sustrato de HRP fluorescente durante 10 min, seguido de la lectura de la placa a longitudes de onda de ex/em de 540/590 nm en un lector de placas. Los datos muestran que el uso de un sistema de captura marcador peptídico-anticuerpo, en el que en este caso el marcador peptídico fue DYKDDDDK (SEQ ID N° 1), y el sistema tuvo un formato de ELISA de un lavado, permitió la medida sensible de TNF $\alpha$  con un tiempo de ensayo total de aproximadamente 1 hora.

#### EJEMPLO 19

##### 45 *Comparación de un sistema de captura biotina-estreptavidina con un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-péptido en un entorno biológico diverso*

La Figura 20 muestra una comparación de un sistema de captura biotina-estreptavidina con un sistema de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-péptido en un entorno biológico diverso.

Se generaron anticuerpos en ratones en forma de anticuerpos monoclonales hacia el péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1). Los anticuerpos purificados hacia este péptido se revistieron en una placa de inmunoensayo Nunc Maxisorp a 10  $\mu$ g/ml durante la noche en tampón carbonato, y la placa se lavó y después se bloqueó contra la unión inespecífica adicional de proteínas. Por separado, se usó una placa revestida de estreptavidina comercial (Nunc Immobiliser) para los ensayos con anticuerpos conjugados con biotina. Se usó el péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) para conjugarlo a anticuerpos hacia la proteína TNF $\alpha$  humana (R&D Systems), de forma que el péptido actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa en la que se habían revestido anticuerpos hacia este péptido. Por separado, también se unieron anticuerpos hacia la proteína TNF $\alpha$  humana (R&D Systems) con biotina, de forma que esto actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa que se había revestido con estreptavidina. Se conjugó una segunda especie del anticuerpo hacia TNF $\alpha$  (R&D Systems) a peroxidasa de rábano (HRP) para usarlo como anticuerpo indicador. Se mezcló TNF $\alpha$  con diversos medios (tampón de bloqueo, leche, suero humano, FBS,

5 orina o RPMI) a 100 pg/mL o no se añadió, y a estas disoluciones se les añadieron los anticuerpos hacia TNF $\alpha$  unidos a biotina (Captura 750 ng/mL; detección 50 ng/mL) o péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) (Captura 300 ng/mL; detección 50 ng/mL), y los anticuerpos hacia TNF $\alpha$  unidos a HRP. Después de una incubación de una hora, los pocillos se lavaron con un tampón de lavado, y se añadió el sustrato de HRP fluorescente ADHP durante 10 min, seguido de la lectura de la placa a longitudes de onda de ex/em de 540/590 nm en un lector de placas. A partir de los datos se puede observar que los sistemas de captura marcador peptídico - anticuerpo anti-péptido fueron superiores al sistema biotina - estreptavidina en la detección de los analitos, en particular cuando los analitos estuvieron presentes en medios particulares. Cabe destacar los efectos inhibitorios en el ensayo de TNF $\alpha$  presente en leche, suero, FBS y RPMI al usar el sistema de biotina - estreptavidina, lo que refleja la presencia de biotina en estas muestras que interfiere con este sistema de captura.

#### EJEMPLO 20 (Ejemplo de Referencia)

*Los sistemas de captura estreptavidina-biotina que utilizan un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ven afectados por concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes*

15 La Figura 21A muestra que un sistema de captura estreptavidina-biotina que utiliza un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ve afectado por concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes.

20 Se usaron placas Nunc Immobiliser, revestidas de estreptavidina, en un ensayo para determinar la capacidad de unión del anticuerpo hacia p-ERK y la medida del analito p-ERK. Los anticuerpos hacia el sitio de fosforilación de la proteína ERK (TGR, Thr202/Tyr204) se unieron a biotina, de forma que esta actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa que se había revestido de estreptavidina. Por separado, se unió un segundo anticuerpo hacia ERK (Santa Cruz) a peroxidasa de rábano (HRP) para actuar como anticuerpo indicador. Las muestras que contenían lisados celulares en los que la proteína p-ERK estaba presente a diversas concentraciones se mezclaron después con los anticuerpos hacia ERK en ausencia (simple) o presencia (de cuádruple a duodécuple) de un número creciente de pares de anticuerpos irrelevantes a la misma concentración que los anticuerpos hacia ERK, de forma que un anticuerpo del par de anticuerpos irrelevantes también estuvo biotinilado de la misma manera y en el mismo grado que el anticuerpo hacia ERK. Después de 1 hora, los pocillos se lavaron con un tampón de lavado, y se añadió el sustrato de HRP fluorescente ADHP durante 10 min, seguido de la lectura de la placa a longitudes de onda de ex/em de 540/590 nm en un lector de placas. Los resultados se presentan como la señal de fluorescencia absoluta.

30 La Figura 21B muestra los datos de la Figura 21A que se han normalizado para expresar la proporción señal:ruido, en la que el ruido es la señal del inmunocomplejo obtenida para cada condición comparada con la señal obtenida en ausencia de analito.

35 A partir de estos gráficos se puede observar que el sistema de ensayo de un lavado con ambos anticuerpos presentes con el analito, en este caso mediante el uso del par biotina - estreptavidina, puede usar concentraciones bajas de anticuerpos de captura, lo que permite que haya presentes hasta 12 pares de anticuerpos marcados no relacionados sin que haya ninguna interferencia en el ensayo.

#### EJEMPLO 21

40 *Los sistemas de captura anticuerpo anti-marcador peptídico - péptido que utilizan un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ven afectados por las concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes*

La Figura 22A muestra que el sistema de captura anticuerpo anti-marcador peptídico - péptido que utiliza un agente de captura de anticuerpo y un agente detectable de anticuerpo no se ve afectado por las concentraciones crecientes de anticuerpos irrelevantes.

45 Se generaron anticuerpos en ratones en forma de anticuerpos monoclonales hacia el péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1). Los anticuerpos purificados hacia este péptido se revistieron en una placa de inmunoensayo Nunc Maxisorp, y la placa se bloqueó después contra la unión inespecífica adicional de proteínas. Se unieron anticuerpos hacia la proteína EGF humana (R&D Systems) al péptido DYKDDDDK (SEQ ID N° 1), de forma que este actuase para anclar este anticuerpo a la superficie de la placa que se había revestido de estreptavidina. Por separado, se unió un segundo anticuerpo hacia EGF (R&D Systems) a peroxidasa de rábano (HRP) para actuar como anticuerpo indicador. Después se mezclaron muestras que contenían EGF a diversas concentraciones con los anticuerpos EGF en ausencia (simple) o presencia (de cuádruple a duodécuple) de un número creciente de pares de anticuerpos irrelevantes a la misma concentración que los anticuerpos hacia EGF, de forma que uno del par de los anticuerpos irrelevantes también se unió al péptido DYKDDDDK de la misma manera y en el mismo grado que el anticuerpo hacia EGF. Después de 1 hora, los pocillos se lavaron con un tampón de lavado, y se añadió el sustrato de HRP fluorescente ADHP durante 10 min, seguido de la lectura de la placa a longitudes de onda de ex/em de 540/590 nm en un lector de placas. Los resultados se presentan como la señal de fluorescencia absoluta.

La Figura 22B muestra los datos de la Figura 22A que se han normalizado para expresar la proporción señal:ruido,

en la que el ruido es la señal del inmunocomplejo obtenida para cada condición comparada con la señal obtenida en ausencia de analito.

5 A partir de estos gráficos se puede observar que el sistema de ensayo de un lavado con ambos anticuerpos presentes con el analito, en este caso mediante el uso del par péptido - anticuerpo anti-péptido, puede usar concentraciones bajas de anticuerpos de captura, lo que permite que haya presentes hasta 12 pares de anticuerpos marcados no relacionados sin que haya ninguna interferencia en el ensayo.

#### EJEMPLO 22

##### *Detección múltiple de analitos*

10 Para demostrar la capacidad de llevar a cabo la detección múltiple de dos analitos, se llevaron a cabo experimentos para detectar la presencia de IL2 y EGF a diversas concentraciones mediante ELISA, y para demostrar que se obtuvieron datos similares al medir estos analitos por separado en cada pocillo de ensayo o a la vez con dos marcadores de detección diferentes.

15 Se eligieron EGF e IL2 como dos analitos representativos para la detección. Cada uno se ensayó mediante el uso de anticuerpos dobles para cada objetivo, y un anticuerpo de cada par se marcó con un lantánido diferente (europio o samario). El otro anticuerpo de cada par se marcó con un conjugado peptídico (péptido FLAG) para facilitar la captura y la inmovilización en la placa revestida de un anticuerpo anti-péptido (anticuerpo anti-péptido FLAG).

Los anticuerpos se marcaron con un lantánido con los siguientes kits de marcaje de PerkinElmer como estipulan los protocolos:

20 Kit de marcaje con Eu, número de cat. 1244-302 - usado para marcar el anticuerpo hacia EGF.

Kit de marcaje con Sm, número de cat. 1244-303 - usado para marcar el anticuerpo hacia IL2.

Los anticuerpos se incubaron con las respectivas disoluciones de lantánidos durante 16 horas a temperatura ambiente, y los conjugados se desalaron después mediante el uso de una columna PD10.

25 Se construyeron las curvas patrón para cada conjugado mediante el uso de diluciones  $\log_{10}$  de los conjugados, y las concentraciones máximas para Eu y Sm fueron 10 nM y 100 nM, respectivamente. Las lecturas de fluorescencia resuelta en el tiempo para estas disoluciones se estudiaron en placas de microtitulación en un lector de placas Victor II (PerkinElmer). Las longitudes de onda de excitación y emisión para estos lantánidos fueron: Europio: Excitación 340 nm/Emisión 615 nm; Samario: Excitación 340 nm/Emisión 642 nm.

Los datos se muestran en la Figura 23.

30 Se puede observar que la señal de samario es 1-2  $\log_{10}$  menor a cada concentración que la de europio, lo cual es coherente con las propiedades de fluorescencia conocidas de estos dos marcadores moleculares.

Para llevar a cabo el experimento simple y doble para EGF e IL2, cada par de anticuerpos se incubó solo con un único analito a detectar (EGF o IL2), o ambos pares de anticuerpos juntos en el mismo pocillo con ambos analitos.

35 Como se describió, los anticuerpos de captura para cada analito estaban conjugados con el marcador peptídico FLAG. La base de cada pocillo de ensayo se revistió con un anticuerpo hacia FLAG, lo que permitió que los anticuerpos de captura se inmovilizasen de manera específica desde la disolución en la base de la placa. El anticuerpo de detección no tenía el marcador, y su unión e inmovilización a la base de la placa dependió, por lo tanto, de la unión al analito de interés.

40 La capacidad de unión de los anticuerpos marcados a la base de la placa, por lo tanto, dependió de la capacidad de unión del anticuerpo hacia FLAG inmovilizado en la base del pocillo de ensayo. Esta capacidad de unión se había predeterminado para que fuera mayor que la cantidad de anticuerpos marcados presentados en el pocillo en los ensayos.

Los anticuerpos estuvieron presentes a concentraciones de 50 ng/mL y 25 ng/mL, para la captura y detección de los anticuerpos, respectivamente.

45 Además de medir EGF e IL2 mediante el uso de anticuerpos marcados con los lantánidos, como comparación se midieron los mismos analitos en pocillos diferentes de la placa de ensayo con anticuerpos de detección que estaban conjugados con HRP. En este caso, la lectura del ensayo fue la conversión enzimática de ADHP (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en resorufina. Esta última se detectó mediante el uso de los ajustes de fluorescencia habituales para esta molécula.

El protocolo del experimento fue el siguiente:

50 1. Preparar el/los analito(s) para la medida en una disolución de PBS/BSA

2. Añadir el analito a la placa de ensayo (pre-revestida con anticuerpo FLAG) a diversas concentraciones en pocillos diferentes
3. Añadir ambos anticuerpos a el/los analito(s) de interés a la muestra de los pocillos. Para la detección simple de un analito, se añadieron pares de anticuerpos hacia EGF o IL2. Para la detección doble tanto de EGF como de IL2 en el mismo pocillo, se añadieron ambos pares de anticuerpos.
4. Incubar la placa durante 1 hora
5. Lavar la placa 3 veces con PBS
6. Para las muestras en las que el anticuerpo de detección estuvo marcado con HRP, se añadió ADHP y se incubó durante 10 min.
7. Leer en la placa la fluorescencia resuelta en el tiempo a las longitudes de onda de Eu y Sm, o la fluorescencia (muestras con ADHP), dependiendo del conjugado de anticuerpo de detección presente.

Los datos se muestran en la Figura 24.

Con respecto a la Figura 24, la línea azul clara muestra la detección de EGF mediante el uso de anticuerpos conjugados con HRP. La línea naranja muestra la detección de IL2 mediante el uso de anticuerpos conjugados con HRP. La línea azul oscura muestra la detección de IL2 con anticuerpos marcados con europio en una situación de detección simple mediante el uso de los ajustes de longitudes de onda para europio en el lector de placas. La línea roja muestra la detección de IL2 con anticuerpos marcados con europio mediante el uso de los ajustes para europio en el lector de placas en presencia de los anticuerpos marcados con samario específicos de EGF. La línea verde muestra la detección simple de EGF con anticuerpos marcados con samario, mediante el uso de los ajustes de longitudes de onda del lector de placas específicos de la detección de samario. La línea púrpura muestra la detección de EGF con anticuerpos hacia EGF marcados con samario mediante el uso de los ajustes de longitudes de onda del lector de placas específicos para la detección de samario, en presencia de anticuerpos marcados con europio que son específicos de IL2. Para las muestras que midieron EGF e IL2 en el formato doble, las lecturas para EGF e IL2 se hicieron de manera secuencial a partir de los mismos pocillos que contenían ambos pares de anticuerpos para cada analito.

Los resultados demuestran la detección de dos analitos en una situación de detección múltiple, sin interferencia aparente entre los anticuerpos y/o la señalización con los lantánidos.

#### EJEMPLO 23

##### *Detección doble mediante la utilización de anticuerpos de detección marcados con enzimas*

Para la detección de dos analitos en un único pocillo, mediante la utilización de un sistema de detección alternativo al de los lantánidos, se pueden utilizar anticuerpos secundarios acoplados a enzimas. De forma similar al método descrito en el Ejemplo 22, se pueden marcar anticuerpos primarios con el péptido FLAG para permitir la localización en la base del pocillo de ensayo, en el que se ha pre-adsorbido el anticuerpo anti-FLAG. Mediante el uso del ejemplo de la detección de EGF e IL-2, se pueden marcar anticuerpos para cada uno de estos analitos con el péptido FLAG, como se describió anteriormente. Los anticuerpos secundarios para cada analito se pueden marcar con peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (AP), respectivamente.

A cada pocillo de ensayo de una placa de 96 pocillos se le puede añadir una muestra para ensayar la presencia de EGF o IL-2. A cada pocillo se le añaden también ambos pares de anticuerpos de captura y detección. Tras la incubación durante un periodo de 1 hora, los pocillos se lavan 3 veces con PBS, y después se añaden los sustratos para HRP y AP a los pocillos. Se pueden utilizar estos sustratos, ya que por las características de emisión de sus productos tienen señales de fluorescencia que no solapan significativamente entre sí. Se eligen grupos de filtros en el lector de placas usado para medir la fluorescencia para proporcionar umbrales de longitud de onda que permiten una medida clara de cada máximo de fluorescencia. Después de un periodo de 15 minutos, se paran las reacciones en cada pocillo mediante la adición de una disolución de parada, y se determina la fluorescencia en cada pocillo.

#### EJEMPLO 24

##### *Detección triple mediante la utilización de anticuerpos de detección marcados con enzimas*

Para la detección de tres analitos en un único pocillo, mediante la utilización de un sistema de detección alternativo al de los lantánidos, se utilizan anticuerpos secundarios acoplados a enzimas. De forma similar al método descrito en el Ejemplo 23, se marcan anticuerpos primarios con el péptido FLAG para permitir la localización en la base del pocillo de ensayo, en el que se ha pre-adsorbido el anticuerpo anti-FLAG. Mediante el uso del ejemplo de la detección de EGF, IL-2 y TNF $\alpha$ , se pueden marcar anticuerpos para cada uno de estos analitos con el péptido FLAG, como se describió anteriormente. Los anticuerpos secundarios hacia cada analito se marcan con peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), y beta-galactosidasa (bGAL), respectivamente.

A cada pocillo de ensayo de una placa de 96 pocillos se le puede añadir una muestra para ensayar la presencia de EGF, IL-2 o TNF $\alpha$ . A cada pocillo se le añaden también pares de anticuerpos de captura y de detección para cada analito. Tras la incubación durante un periodo de 1 hora, los pocillos se lavan 3 veces con PBS, y después se añaden los sustratos para HRP, AP y bGAL a los pocillos. Estos sustratos se seleccionan por las características de emisión de sus productos, que tienen señales de fluorescencia que no solapan significativamente entre sí. Se eligen grupos de filtros en el lector de placas usado para medir la fluorescencia para proporcionar umbrales de longitud de onda que permiten una medida clara de cada máximo de fluorescencia. Después de un periodo de 15 minutos, se paran las reacciones en cada pocillo mediante la adición de una disolución de parada, y se determina la fluorescencia en cada pocillo.

## 10 EJEMPLO 25

### *Grupos de filtros para la discriminación de las longitudes de onda de fluorescencia*

Para facilitar la detección de dos o más analitos en un único pocillo de un lector de placas multipocillo estándar, fue necesario instalar grupos de filtros en el lector de placas que permitiesen la discriminación de las longitudes de onda de fluorescencia con respecto a la emisión máxima, y la anchura de banda de los filtros fue tal que limitase el solapamiento de longitudes de onda entre las señales de salida máximas de los fluoróforos.

Las medidas de fluorescencia, de fluoróforos unidos directamente a los anticuerpos de detección, o de sustratos fluorescentes de enzimas unidas a los anticuerpos de detección, se hicieron en cada pocillo, con una excitación secuencial o simultánea, y la lectura de la emisión se llevó a cabo dependiendo de la capacidad del lector de placas.

## EJEMPLO 26 (Ejemplo de Referencia)

### 20 *Kits múltiples*

Kit doble: Los siguientes componentes están contenidos en un kit doble para la medida de dos analitos, en los que los anticuerpos secundarios están marcados directamente con fluoróforos diferentes: Anticuerpo primario hacia el Objetivo 1, anticuerpo primario hacia el Objetivo 2, anticuerpo secundario hacia el Objetivo 1, anticuerpo secundario hacia el Objetivo 2, tampón de lavado, tampón de lisis celular (si es necesario), disolución potenciadora de la fluorescencia (si es necesaria), placa de ensayo (pre-revestida con agente de inmovilización para inmovilizar los anticuerpos primarios).

Kit triple: Los siguientes componentes están contenidos en un kit triple para la medida de tres analitos, en los que los anticuerpos secundarios están marcados directamente con fluoróforos diferentes: Anticuerpo primario hacia el Objetivo 1, anticuerpo primario hacia el Objetivo 2, anticuerpo primario hacia el Objetivo 3, anticuerpo secundario hacia el Objetivo 1, anticuerpo secundario hacia el Objetivo 2, anticuerpo secundario hacia el Objetivo 3, tampón de lavado, tampón de lisis celular (si es necesario), disolución potenciadora de la fluorescencia (si es necesaria), placa de ensayo (pre-revestida con agente de inmovilización para inmovilizar los anticuerpos primarios).

## EJEMPLO 27

### *Análisis múltiple secuencial*

Las células se lisan con un tampón que contiene Triton X-100, tampón, y otros componentes que incluyen inhibidores de fosfatasas, que incluyen vanadato sódico y pirofosfato sódico. Tras la adición del tampón de lisis, las placas se mezclan suavemente, y después se toma una muestra (20  $\mu$ L) de cada pocillo y se coloca en una placa de ensayo de 96 pocillos.

La placa de ensayo tiene los pocillos pre-revestidos con un agente de inmovilización, en este caso estreptavidina. Después se añaden a la placa de ensayo tres pares de anticuerpos, que son anticuerpos de captura y de detección para la detección de tres analitos celulares diferentes. El anticuerpo primario (de captura) de cada par se marca, en este ejemplo, con biotina para facilitar la captura mediante el agente de inmovilización de los pocillos de ensayo. Las concentraciones adecuadas de los anticuerpos primarios (de captura) y secundarios (de detección) son cada una 50 ng/mL, para cada par de anticuerpos. La capacidad de unión total de la estreptavidina en cada pocillo es aproximadamente 2  $\mu$ g.

Los anticuerpos secundarios (de detección) de cada uno de los tres pares de anticuerpos se marcan con 3 enzimas diferentes, para permitir la reacción con los sustratos de las enzimas añadidos posteriormente que producirían productos con características específicas de fluorescencia. Tres enzimas adecuadas son peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, y beta-galactosidasa.

Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos seleccionados de manera específica para medir tres objetivos intracelulares, tales como p-ERK, p-AKT y p-CREB. El anticuerpo secundario (de detección) de ensayo de p-ERK se marcó con beta-galactosidasa, el anticuerpo secundario (de detección) de p-AKT con fosfatasa alcalina (AP), y el anticuerpo secundario (de detección) de p-CREB con peroxidasa de rábano (HRP).

Tras una incubación de 1 hora con mezcla suave a una velocidad óptima de 300 rpm, los pocillos se lavan con

tampón de lavado, y se añade una disolución que contiene dos sustratos enzimáticos combinados a cada pocillo para medir los niveles de HRP y AP, lo que proporciona una medida de p-CREB y p-AKT, respectivamente. Estos sustratos son: (a) Fosfato de 4-metilumbeliferilo, que es el sustrato para la fosfatasa alcalina; y (b) 10-Acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (ADHP), que es el sustrato para la peroxidasa de rábano. Las concentraciones de estos sustratos se pueden optimizar y predeterminar para el kit de ensayo. El tampón utilizado para estas reacciones también se optimiza y predetermina para el kit de ensayo.

Tras la incubación durante 15 minutos con la disolución de sustrato, las placas se leen en un lector de placas para medir la conversión de los sustratos en productos de fluorescencia específica, y las longitudes de onda de excitación y emisión se muestran más adelante. Esto se llevó a cabo en un lector de placas con la capacidad de medir las longitudes de onda específicas necesarias tras la excitación a longitudes de onda específicas.

Después de leer los pocillos para estos dos analitos, los pocillos se lavan con tampón para eliminar los sustratos enzimáticos. Después de esta etapa de lavado, se añade una disolución que contiene un único sustrato enzimático a cada pocillo para medir los niveles de beta-galactosidasa, que es un reflejo de los niveles de p-ERK en cada pocillo. Este sustrato es di-beta-D-galactopiranosido de fluoresceína (FDG), que es un sustrato específico para la beta-galactosidasa. Tras la incubación durante 15 minutos con esta disolución de sustrato, las placas se leen una segunda vez en un lector de placas con respecto a la conversión de este sustrato en un producto de fluorescencia específica, y las longitudes de onda de excitación y emisión son las mostradas más adelante. Esto se lleva a cabo en un lector de placas con la capacidad de medir las longitudes de onda específicas necesarias tras la excitación a longitudes de onda específicas.

Longitudes de onda (excitación / emisión):

Longitudes de onda: 360/450, Enzima: Fosfatasa Alcalina

Longitudes de onda: 460/520, Enzima: Beta-galactosidasa

Longitudes de onda: 550/610, Enzima: Peroxidasa de Rábano

#### EJEMPLO 28

##### *Determinación de la interferencia entre señales*

Se estudió el nivel de interferencia de la señal de fluorescencia entre tres fluoróforos en disolución en un experimento con un diseño de 3 factores. Las emisiones de fluorescencia de las moléculas metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina se estudiaron en PBS solas o en combinación a diferentes combinaciones de concentraciones entre 1-10  $\mu\text{M}$  en una placa de ensayo negra Maxisorp (Nunc). La fluorescencia se midió a 360/450, 460/520 y 550/610 nm para cada mezcla de fluoróforos, que son las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión determinadas para cada fluoróforo, respectivamente.

Los datos se muestran en las Figuras 25 a 30.

La Figura 25 muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu\text{M}$ .

Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.

En esta figura, se muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de metilumbeliferona, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de metilumbeliferona por parte de la fluoresceína, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de metilumbeliferona, no se detectó interferencia por parte de la fluoresceína.

La Figura 26 muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu\text{M}$ .

Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los

patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.

En esta figura, se muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de resorufina de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de fluoresceína, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de fluoresceína por parte de la metilumbeliferona, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de fluoresceína, no se detectó interferencia por parte de la metilumbeliferona.

La Figura 27 muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu\text{M}$ .

Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.

En esta figura, se muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de metilumbeliferona, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de resorufina, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de resorufina por parte de la metilumbeliferona, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de resorufina, no se detectó interferencia por parte de la metilumbeliferona.

La Figura 28 muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu\text{M}$ .

Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.

En esta figura, se muestra la emisión de metilumbeliferona a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de fluoresceína de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de metilumbeliferona, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de metilumbeliferona por parte de la resorufina, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de metilumbeliferona, no se detectó interferencia por parte de la resorufina.

La Figura 29 muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu\text{M}$ .

Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo

en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.

- 5 En esta figura, se muestra la emisión de fluoresceína a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de resorufina, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de fluoresceína, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de fluoresceína por parte de la resorufina, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de fluoresceína, no se detectó
- 10 interferencia por parte de la resorufina.

La Figura 30 muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu\text{M}$ .

- Se diluyeron patrones fluorescentes, específicamente metilumbeliferona, fluoresceína y resorufina, en PBS, y se colocaron muestras en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las concentraciones de los patrones oscilaron de 1 a 10  $\mu\text{M}$ , con concentraciones específicas de 1, 4, 5,5, 7 y 10  $\mu\text{M}$  usadas en un volumen de ensayo total de 100  $\mu\text{L}$ . Se analizaron veintiuna combinaciones de los 3 fluoróforos en este intervalo de concentraciones que se pre-determinaron mediante el uso de la metodología ECHIP Experimentation By Design™ (diseño cúbico parcial de 3 factores). Los fluoróforos se mezclaron, y se determinó la fluorescencia de cada pocillo
- 15 en un lector de placas multipocillo Flexstation II, a las longitudes de onda de excitación y emisión de 360/450 nm, 460/520 nm y 550/610 nm. Mediante el uso del programa informático de ECHIP, se analizaron los datos de fluorescencia mediante el uso de un modelo cuadrático continuo para estudiar la interferencia de emisión entre cada uno de los colorantes fluorescentes.
- 20

- En esta figura, se muestra la emisión de resorufina a diversas concentraciones en presencia de concentraciones variables de fluoresceína, con una concentración interpolada de metilumbeliferona de 5,5  $\mu\text{M}$ . Los datos muestran que a cada concentración de resorufina, no hubo interferencia o contribución a la emisión de fluorescencia de resorufina por parte de la fluoresceína, tal como se indica mediante las líneas de emisión verticales. Por lo tanto, a las longitudes de onda de excitación y emisión usadas para medir la emisión de resorufina, no se detectó
- 25 interferencia por parte de la fluoresceína.

- La descripción proporcionada en la presente memoria es con respecto a varias realizaciones que pueden compartir características comunes. Se debe entender que una o más características de una realización pueden ser combinables con una o más características de las otras realizaciones. Además, una única característica o combinación de características de las realizaciones pueden constituir realizaciones adicionales.
- 30

Además, se debe indicar que, tal como se usan en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los aspectos plurales, a menos que el contexto ya lo dicte de otra manera.

- 35 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprender", o las variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar como mínimo dos analitos diferentes que no son ácidos nucleicos en una muestra, y el método comprende:
- proporcionar a un recipiente de reacción:
- 5 (i) como mínimo un sustrato sólido que comprende uno o más agentes de inmovilización, en el que el sustrato comprende una superficie de plástico o una superficie hidrófoba;
- (ii) la muestra;
- (iii) como mínimo dos agentes de captura diferentes que se unen a como mínimo dos analitos diferentes, y los como mínimo dos agentes de captura diferentes pueden estar inmovilizados en el como mínimo un sustrato sólido, en el que los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un anticuerpo;
- 10 (iv) como mínimo dos agentes detectables diferentes que se unen a los como mínimo dos analitos diferentes, en los que los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprenden un anticuerpo; y
- detectar los como mínimo dos analitos diferentes en la muestra detectando la presencia de los como mínimo dos analitos diferentes unidos al como mínimo un sustrato sólido, en el que la detección de los como mínimo dos analitos diferentes no comprende ningún lavado del como mínimo un sustrato sólido después de poner en contacto el como mínimo un sustrato sólido con la muestra, uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes y uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes;
- 15 en el que el o los agentes de inmovilización se unen de manera pasiva al como mínimo un sustrato sólido;
- en el que uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes comprenden un ligando para el o los agentes de inmovilización, en el que el ligando se une a uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes;
- 20 en el que el ligando y uno del o de los agentes de inmovilización son un par de unión que comprende un marcador peptídico y un anticuerpo anti-peptídico; y
- en el que los como mínimo dos analitos diferentes se detectan simultáneamente,
- 25 en el que uno o más de los como mínimo dos analitos diferentes se seleccionan del grupo que consiste en una proteína, un componente de una ruta de señalización celular, una citocina, un inhibidor tumoral, o un anticuerpo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende proporcionar uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes a una concentración de 10 ng/ml a 1000 ng/ml.
- 30 3. El método según la reivindicación 1, en el que el marcador peptídico comprende la secuencia peptídica DYKDDDDK (SEQ ID N° 1) y el anticuerpo anti-peptídico comprende un anticuerpo anti-DYKDDDDK.
4. El método según la reivindicación 1, en el que
- a) uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende un fluoróforo, uno o más iones lantánidos, preferiblemente uno o más de  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ , y  $\text{Dy}^{3+}$ ; y
- 35 b) preferiblemente, uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Eu}^{3+}$ , y otro de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Sm}^{3+}$ .
5. El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende formar un complejo entre uno o más de los como mínimo dos agentes de captura diferentes, uno o más de los como mínimo dos analitos diferentes, y uno o más de los como mínimo dos agentes detectables diferentes antes o de manera simultánea con la puesta en contacto del complejo con el como mínimo un sustrato sólido.
- 40 6. El método según la reivindicación 1, en el que
- a) el como mínimo un sustrato sólido tiene una capacidad de unión total de 5  $\mu\text{g/ml}$  o menos para las proteínas,
- b) el recipiente de reacción comprende el como mínimo un sustrato sólido,
- 45 c) el recipiente de reacción comprende una punta de pipeta, en el que la punta de pipeta comprende el como mínimo un sustrato sólido; y/o
- d) el como mínimo un sustrato sólido comprende una diversidad de microesferas, en el que preferiblemente

la diversidad de microesferas están retenidas en la punta de pipeta.

7. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de células, un lisado celular o una combinación de cualquiera de las anteriormente mencionadas.
- 5 8. El método según la reivindicación 1, en el que el método comprende la producción de como mínimo dos señales detectables diferentes, en el que:
- a) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-610 nm,
  - 10 b) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm,
  - c) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 380-490 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-750 nm, o
  - 15 d) como mínimo una de las como mínimo dos señales detectables tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 500-560 nm, y otra señal detectable tiene una longitud de onda de emisión máxima en el intervalo de 570-750 nm.
- 20 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la detección de los como mínimo dos analitos diferentes se consigue en un tiempo de 2 horas o menos, y/o el método comprende proporcionar uno o más filtros y/o una o más fuentes de luz y/o uno o más detectores de luz a un dispositivo lector de placas para permitir la detección de los como mínimo dos analitos diferentes.
10. El método de la reivindicación 1, en el que uno de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Eu}^{3+}$  y otro de los como mínimo dos agentes detectables diferentes comprende  $\text{Sm}^{3+}$ .

25

FIGURA 1

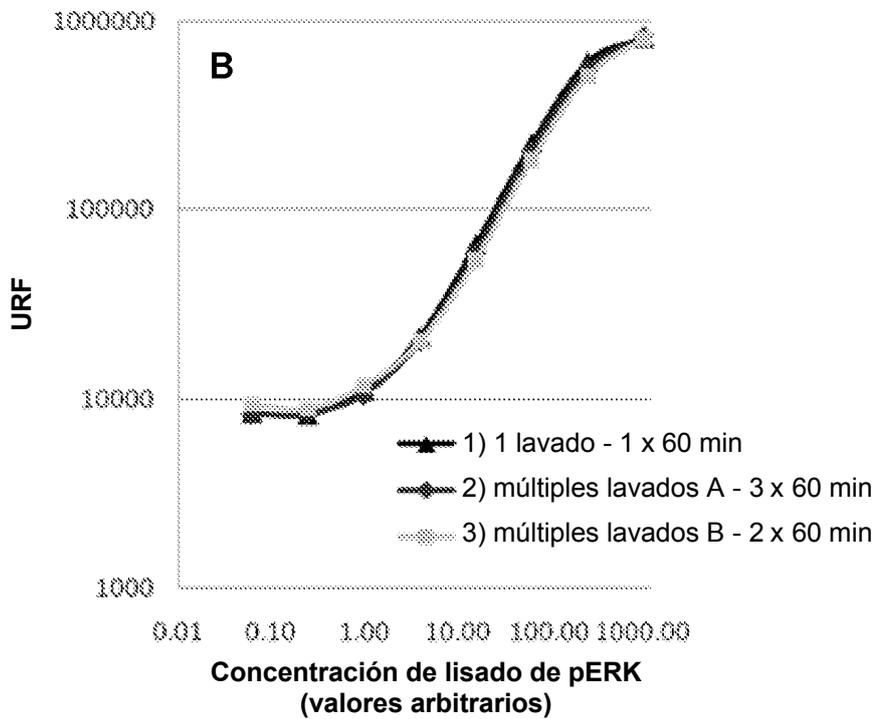
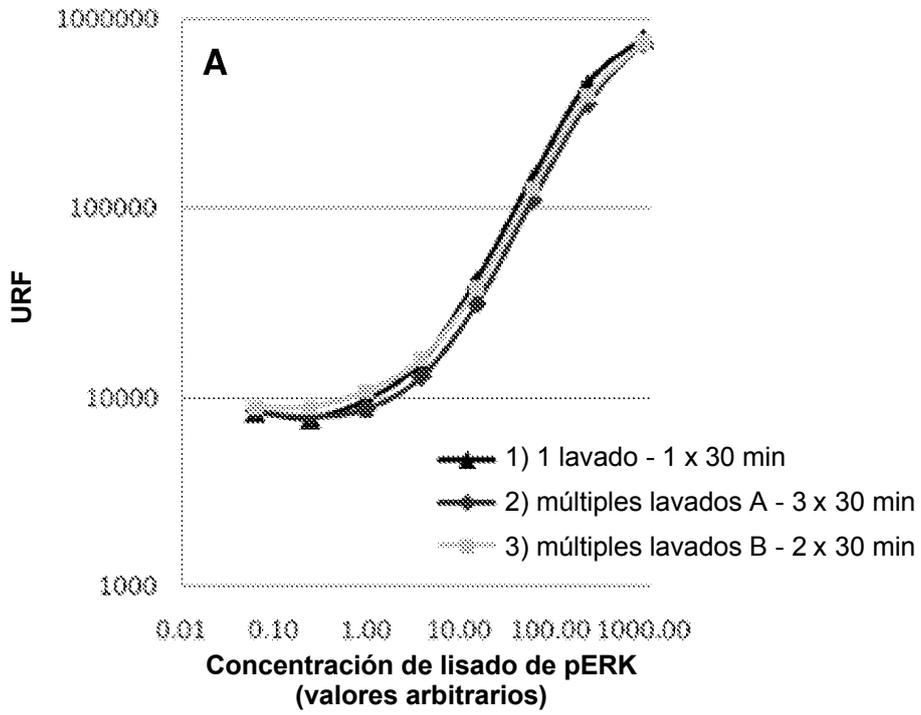


FIGURA 2

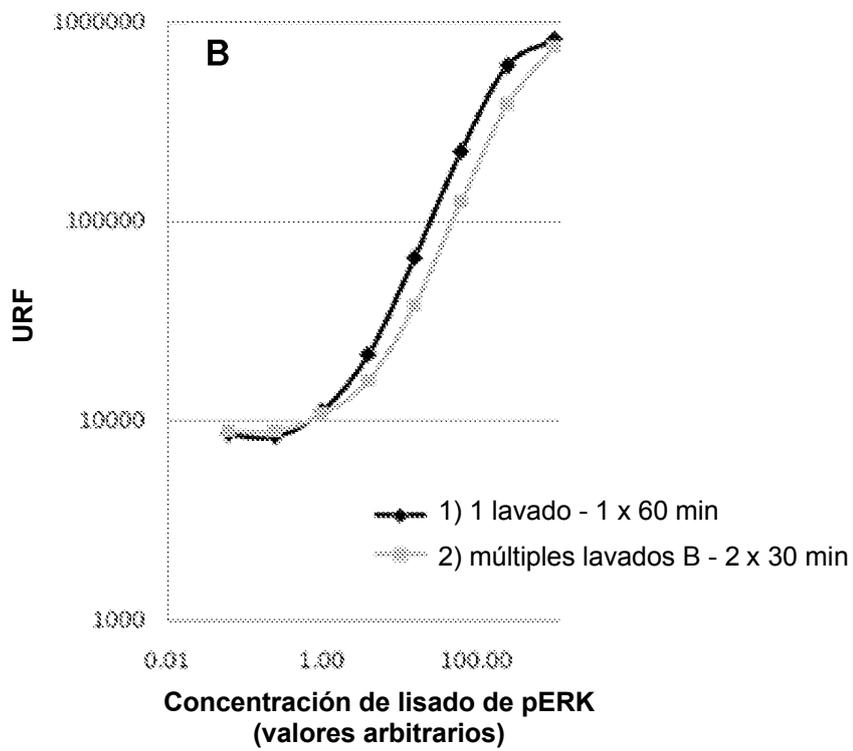
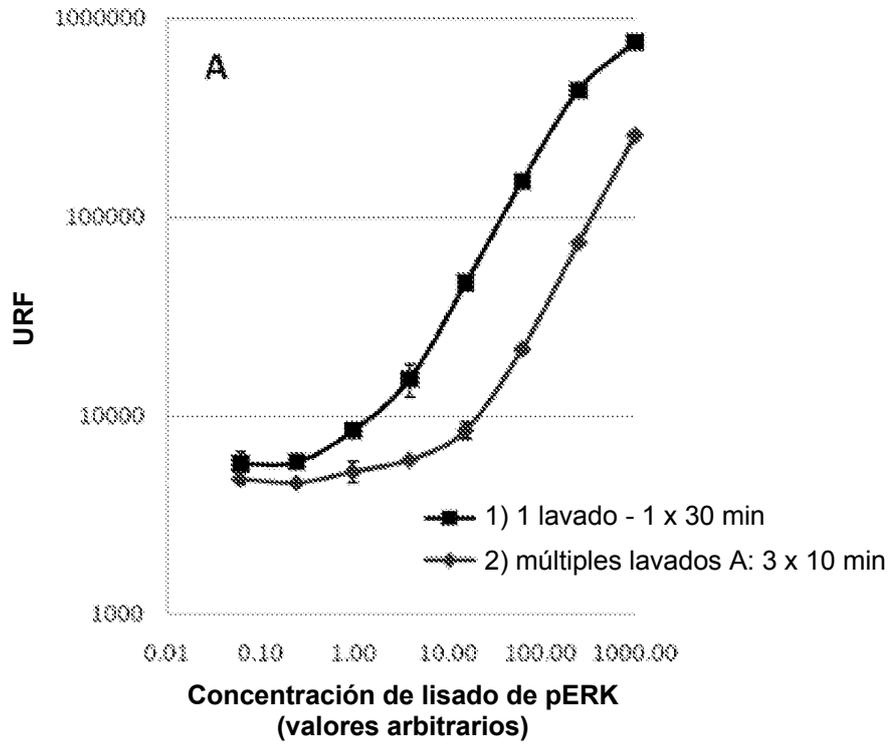


FIGURA 3

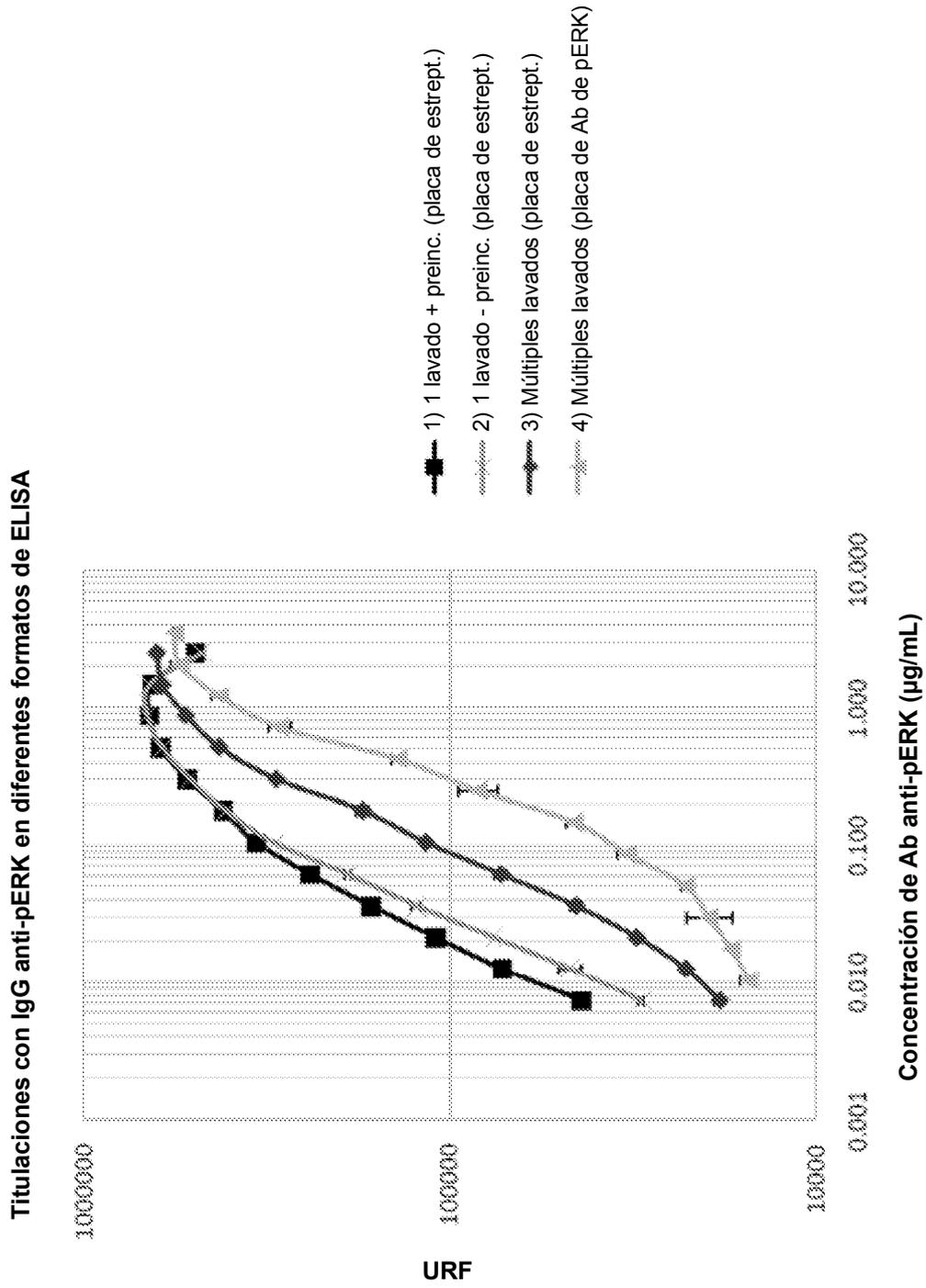


FIGURA 4

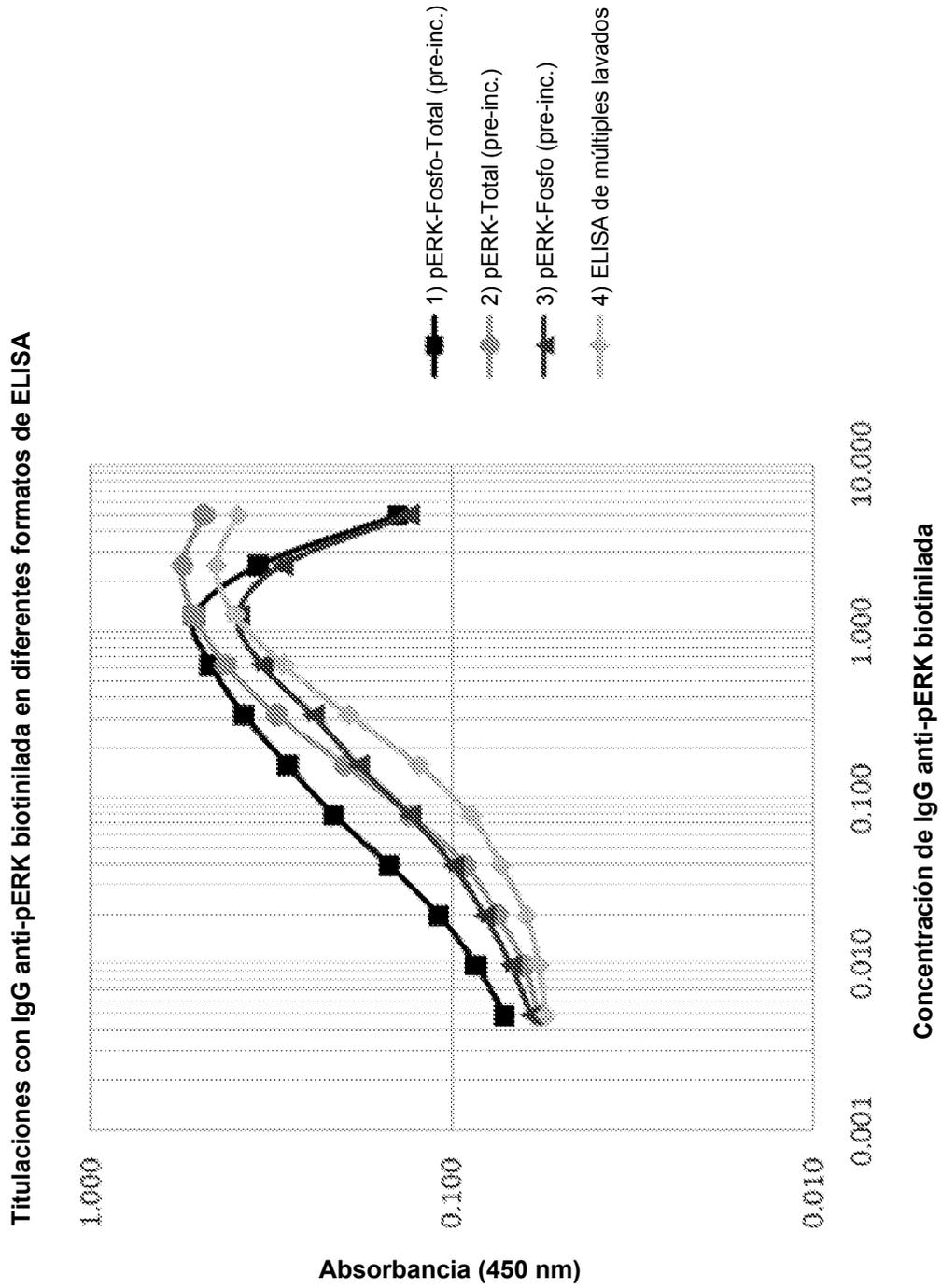


FIGURA 5

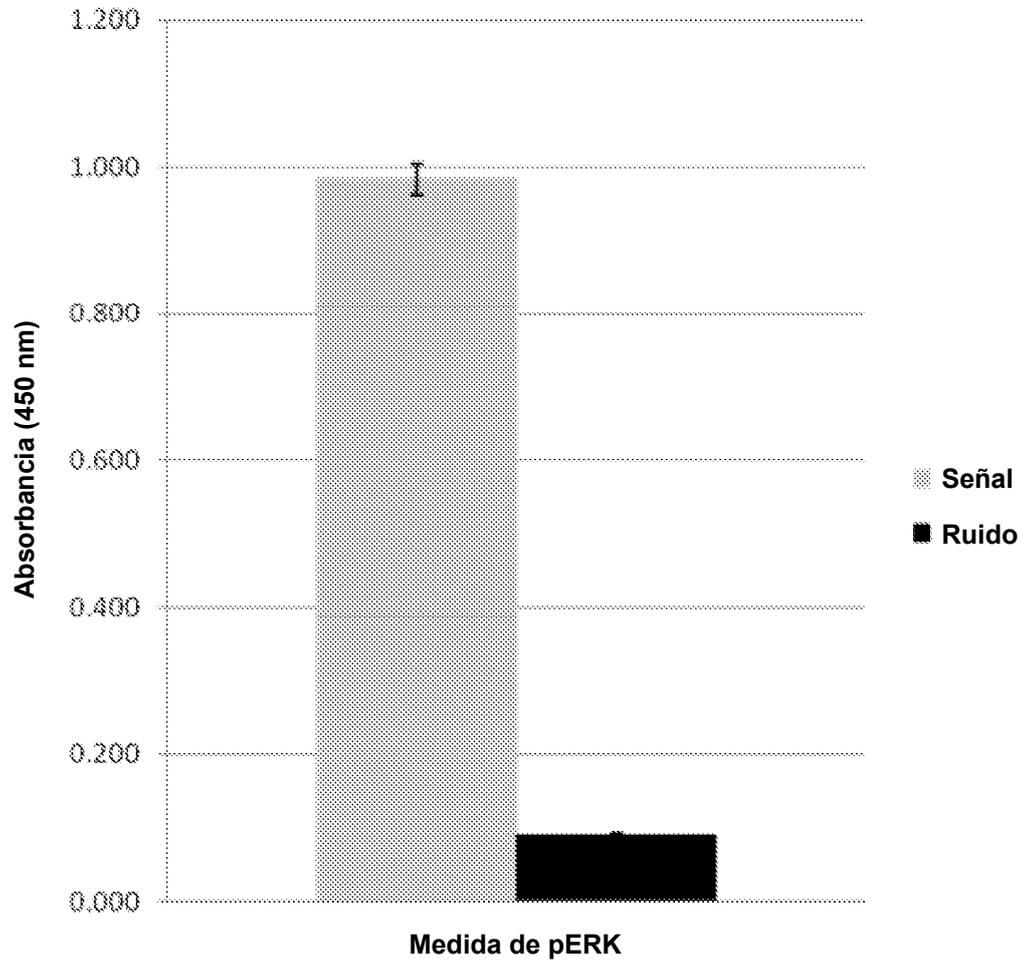


FIGURA 6

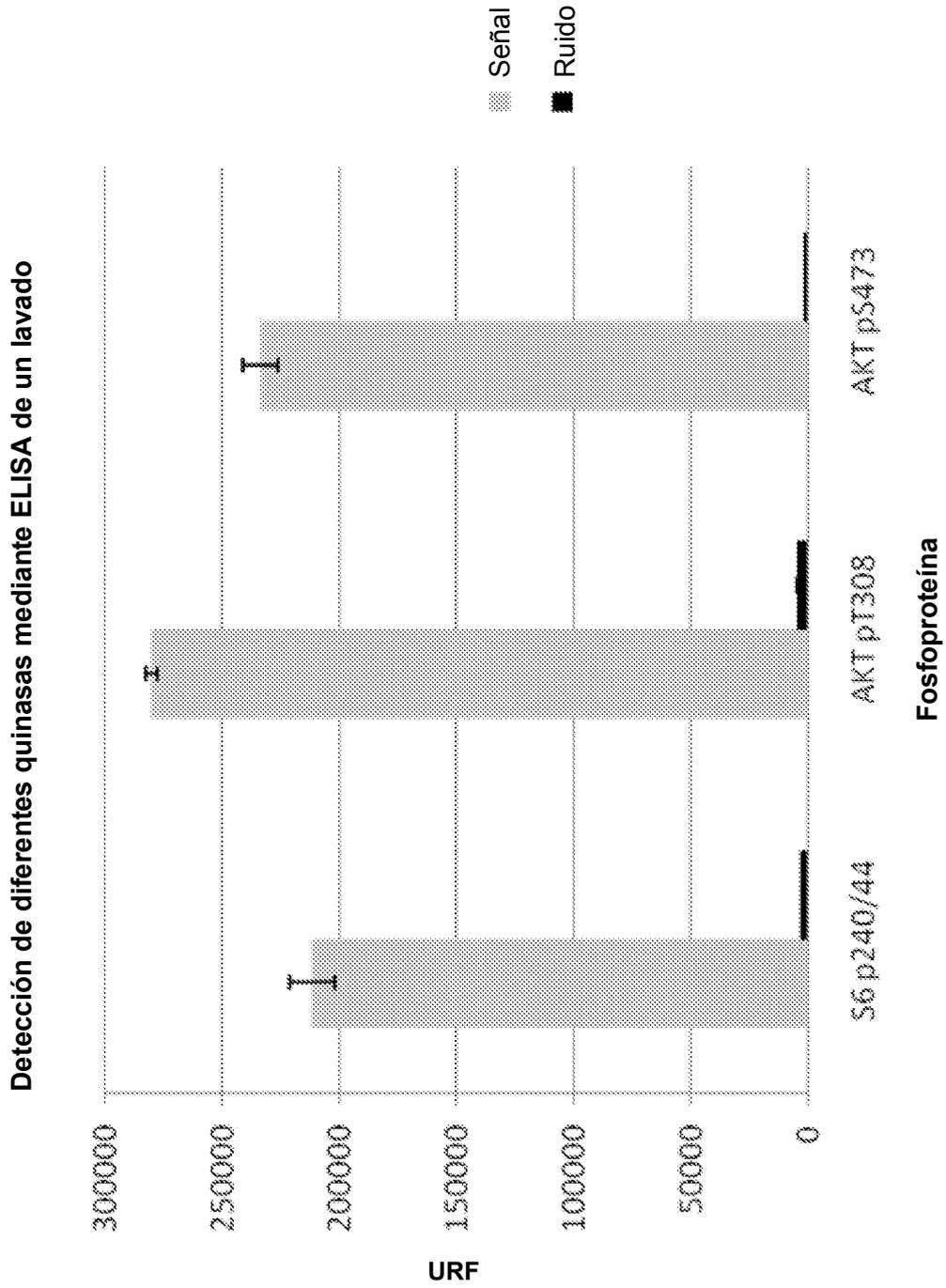


FIGURA 7

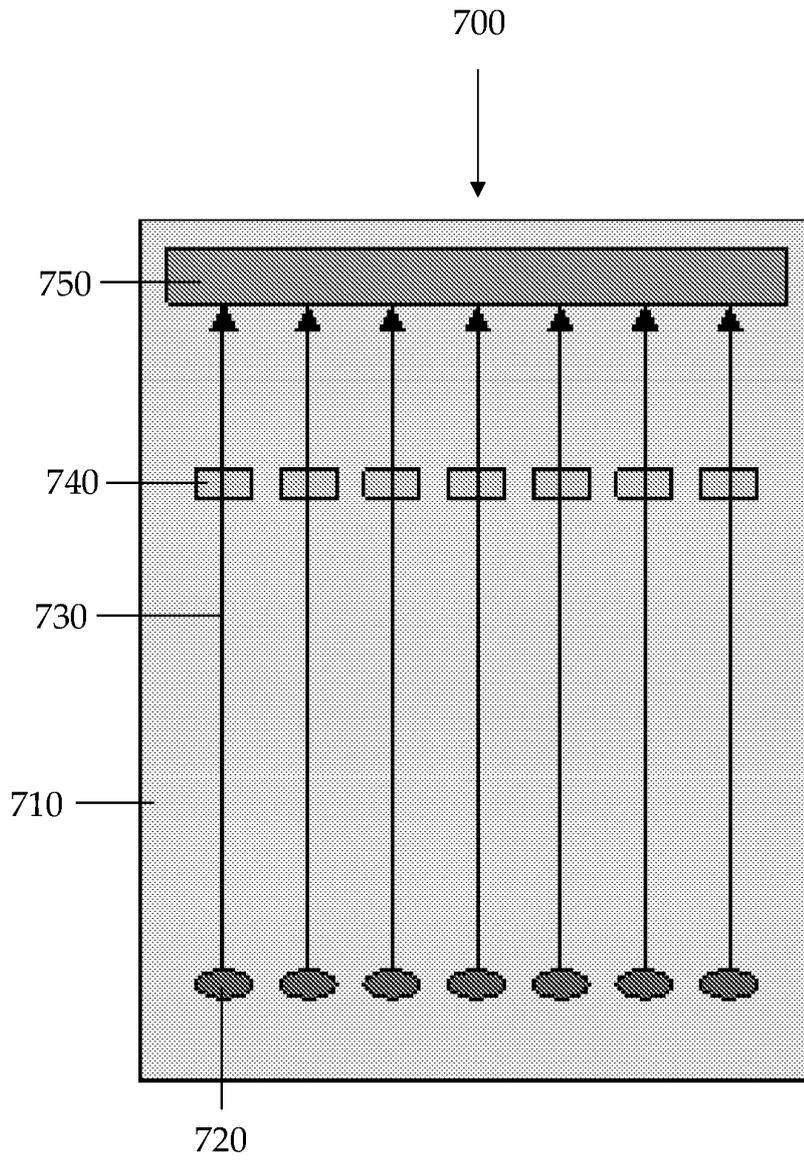


FIGURA 8A

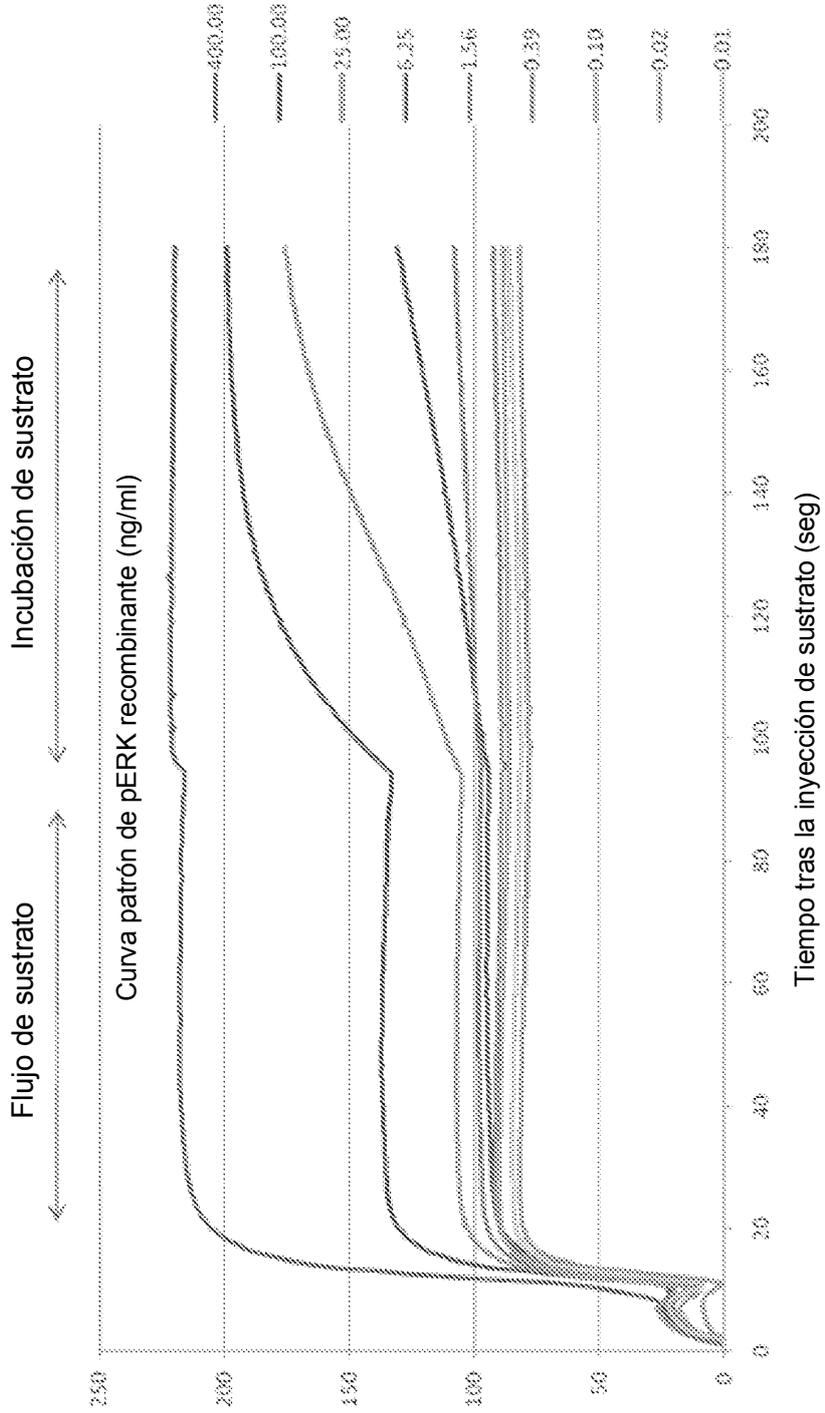


FIGURA 8B

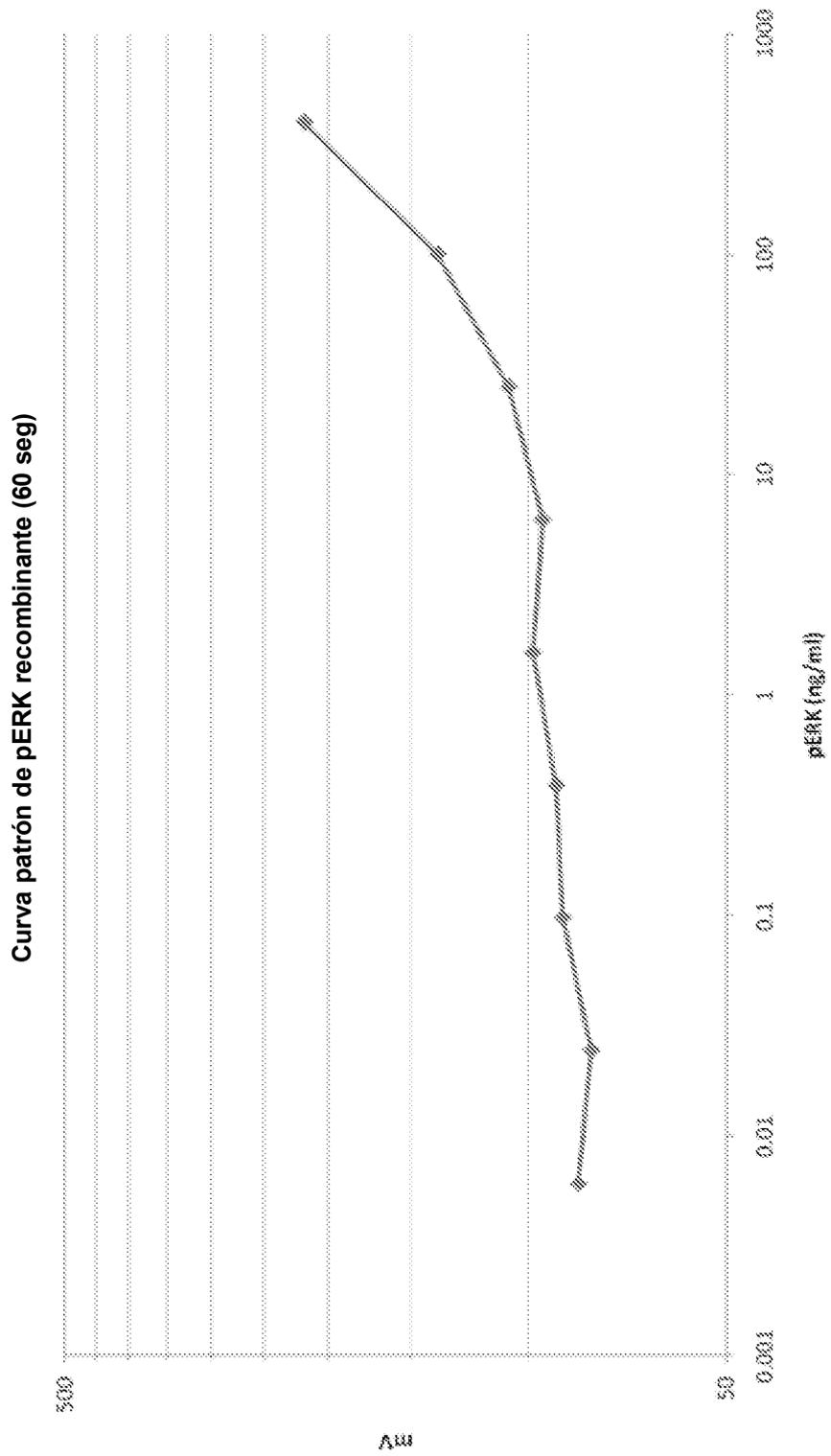


FIGURA 8C

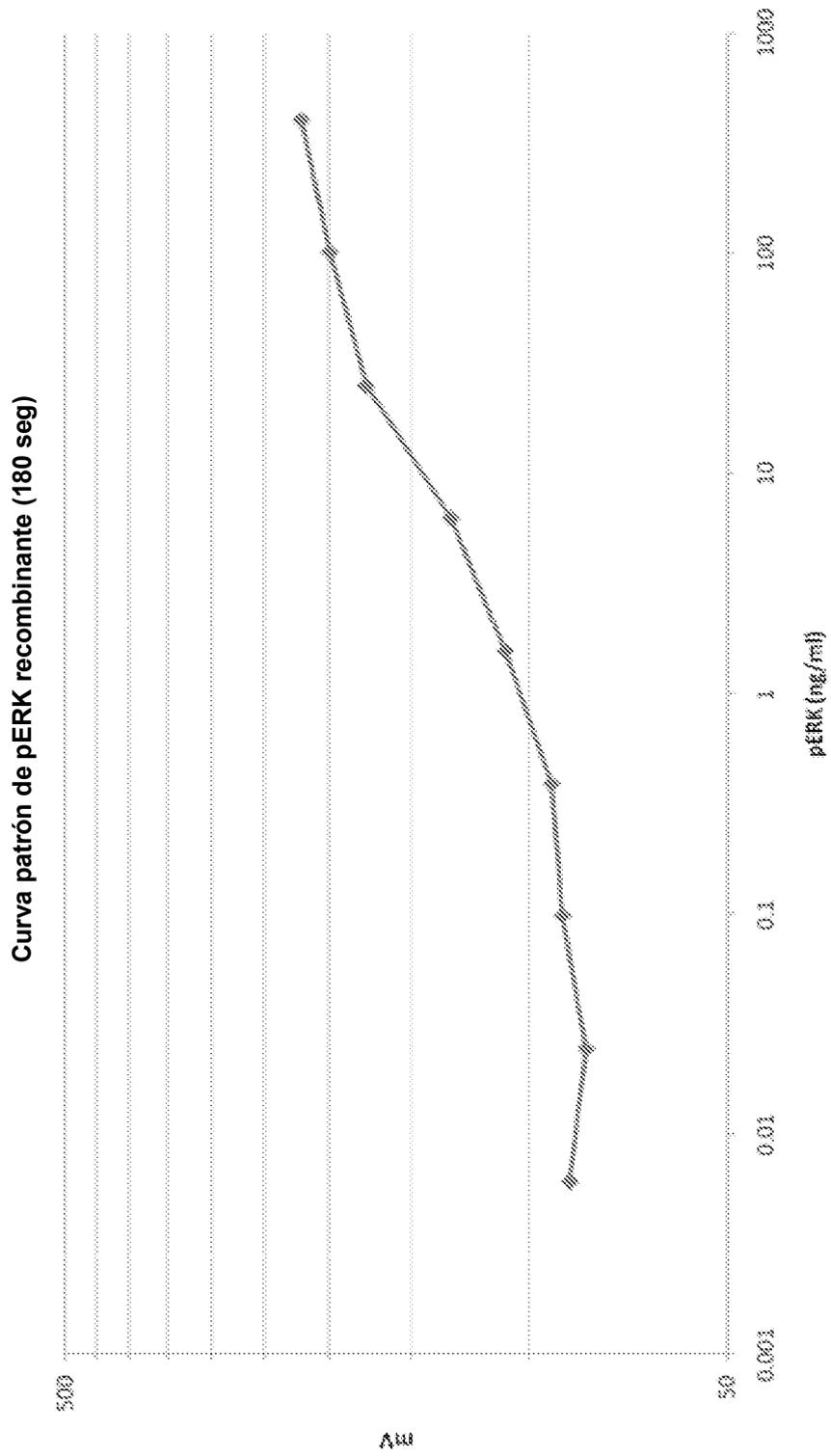


FIGURA 9A

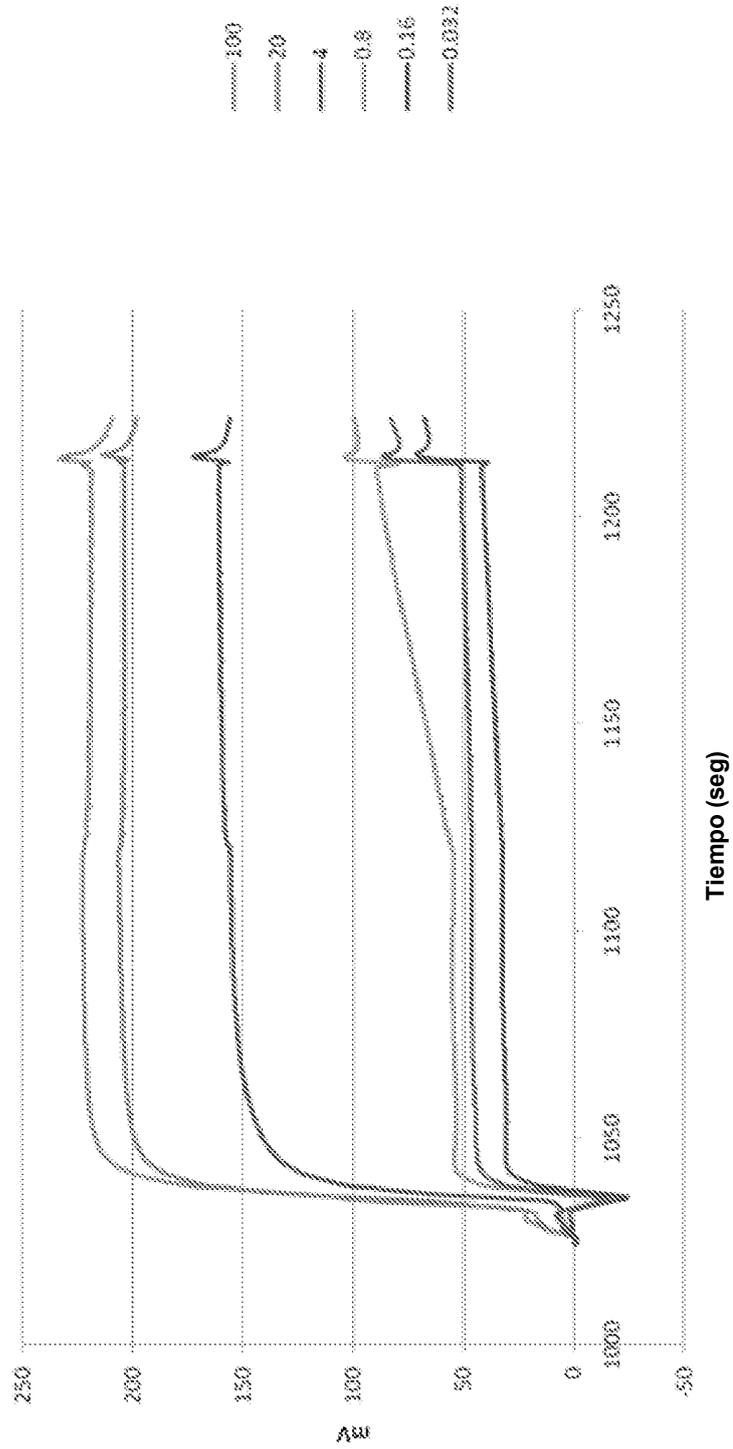


FIGURA 9B

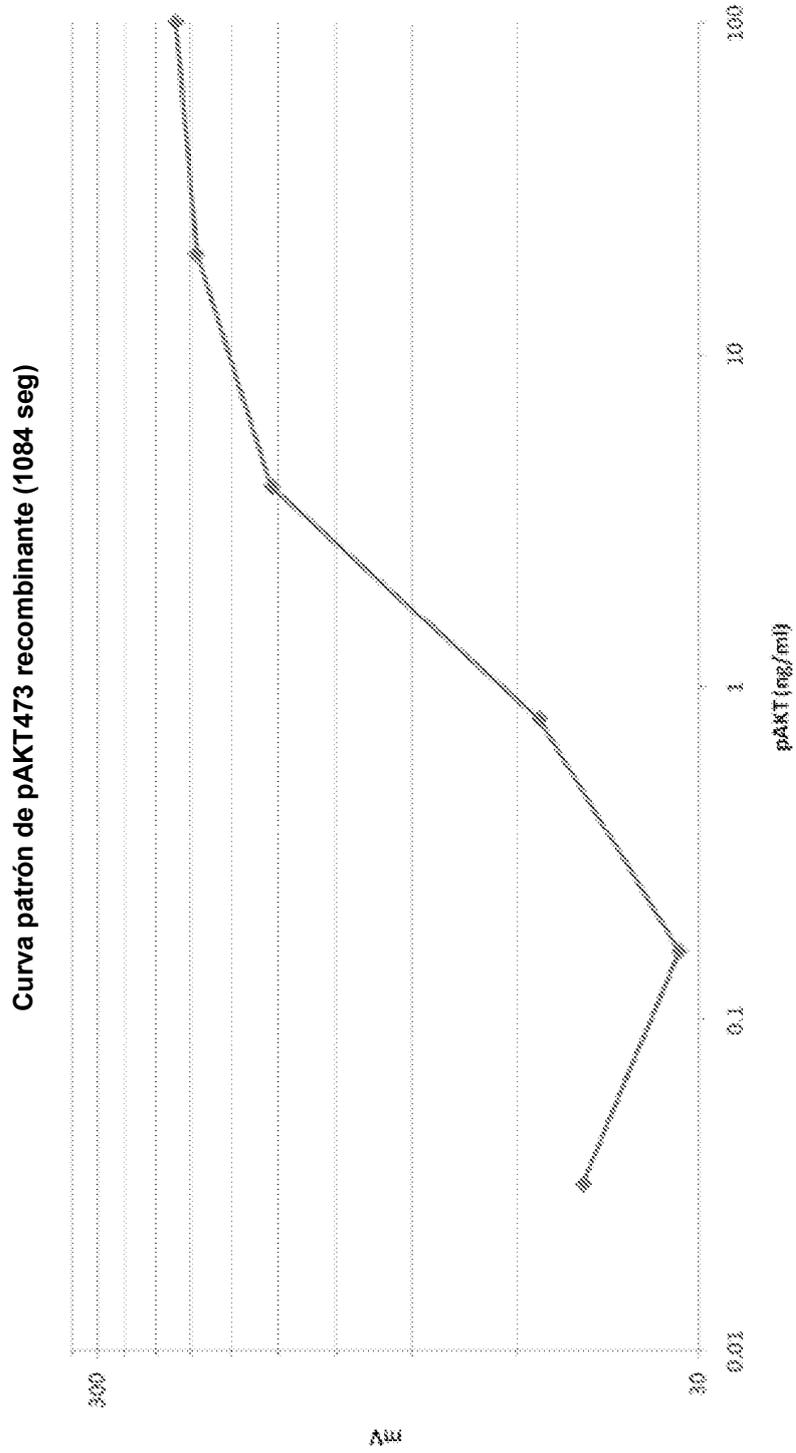


FIGURA 9C

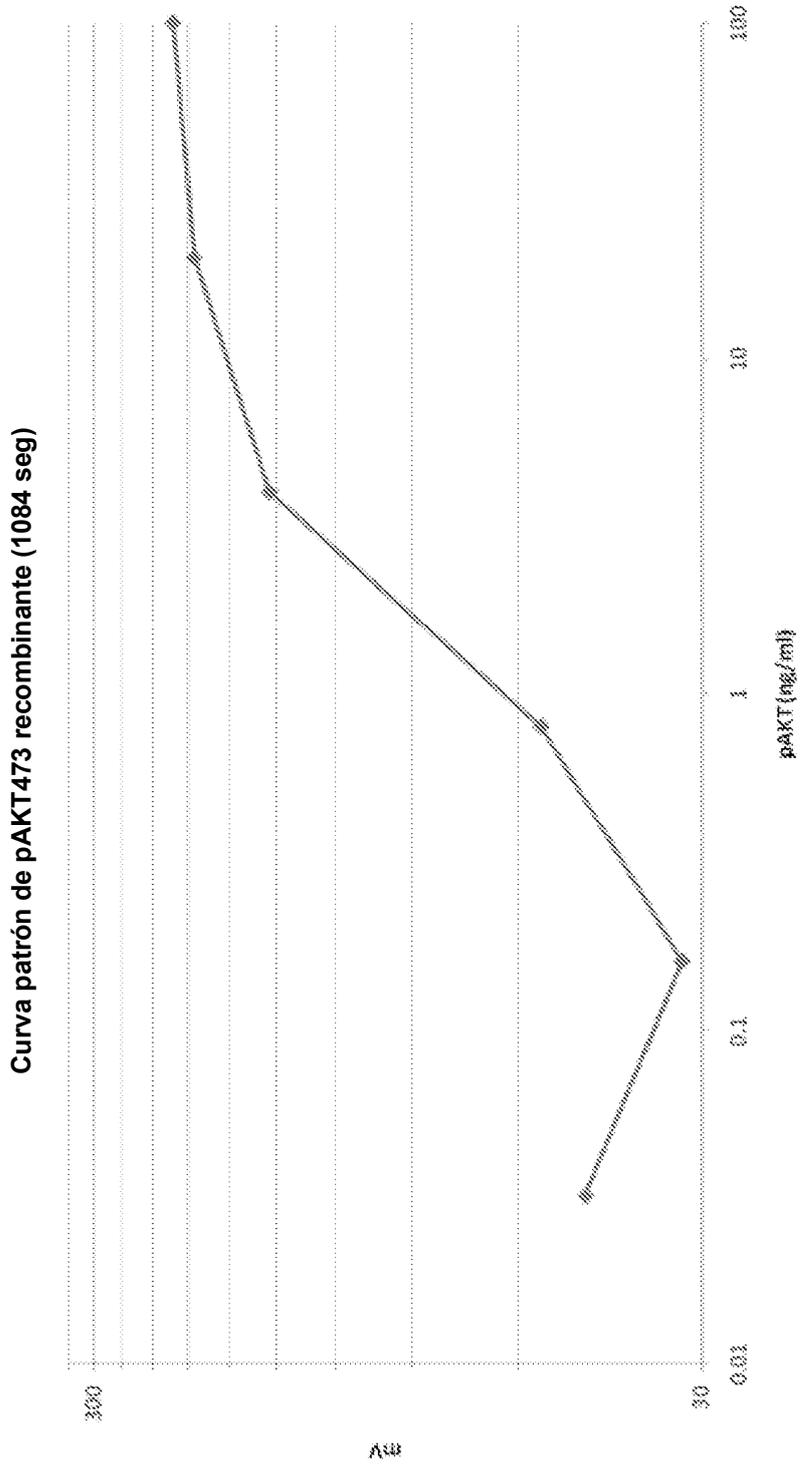


FIGURA 10

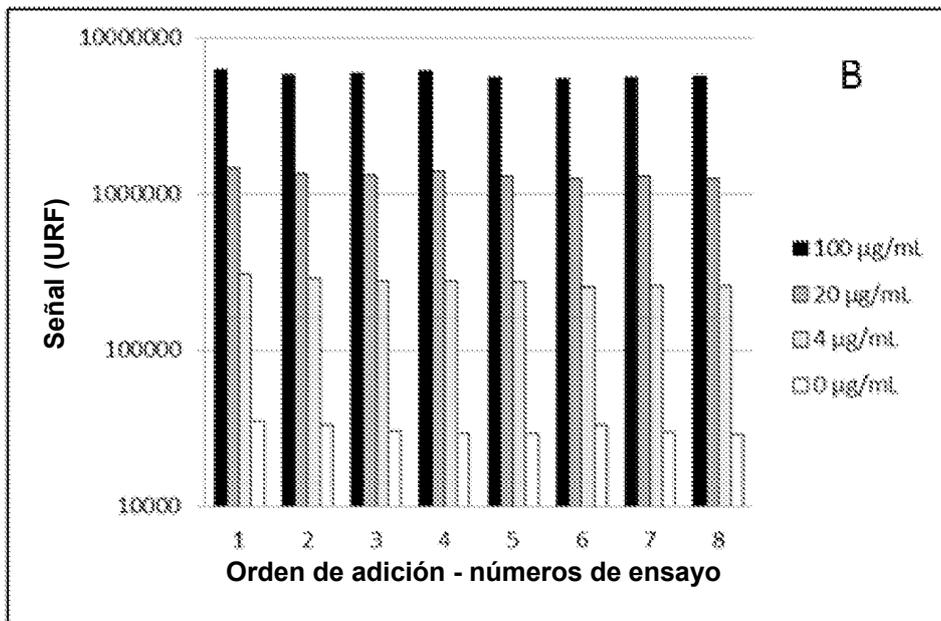
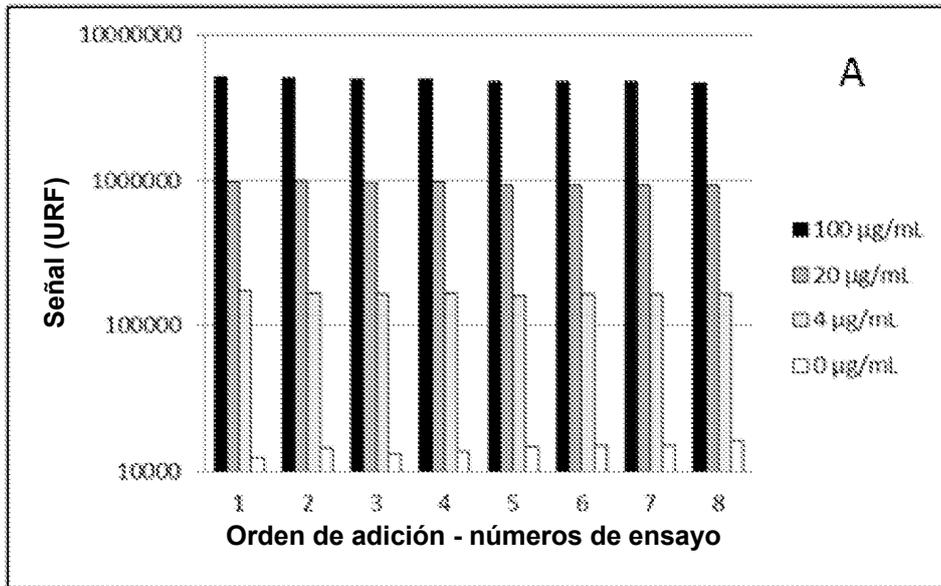


FIGURA 11

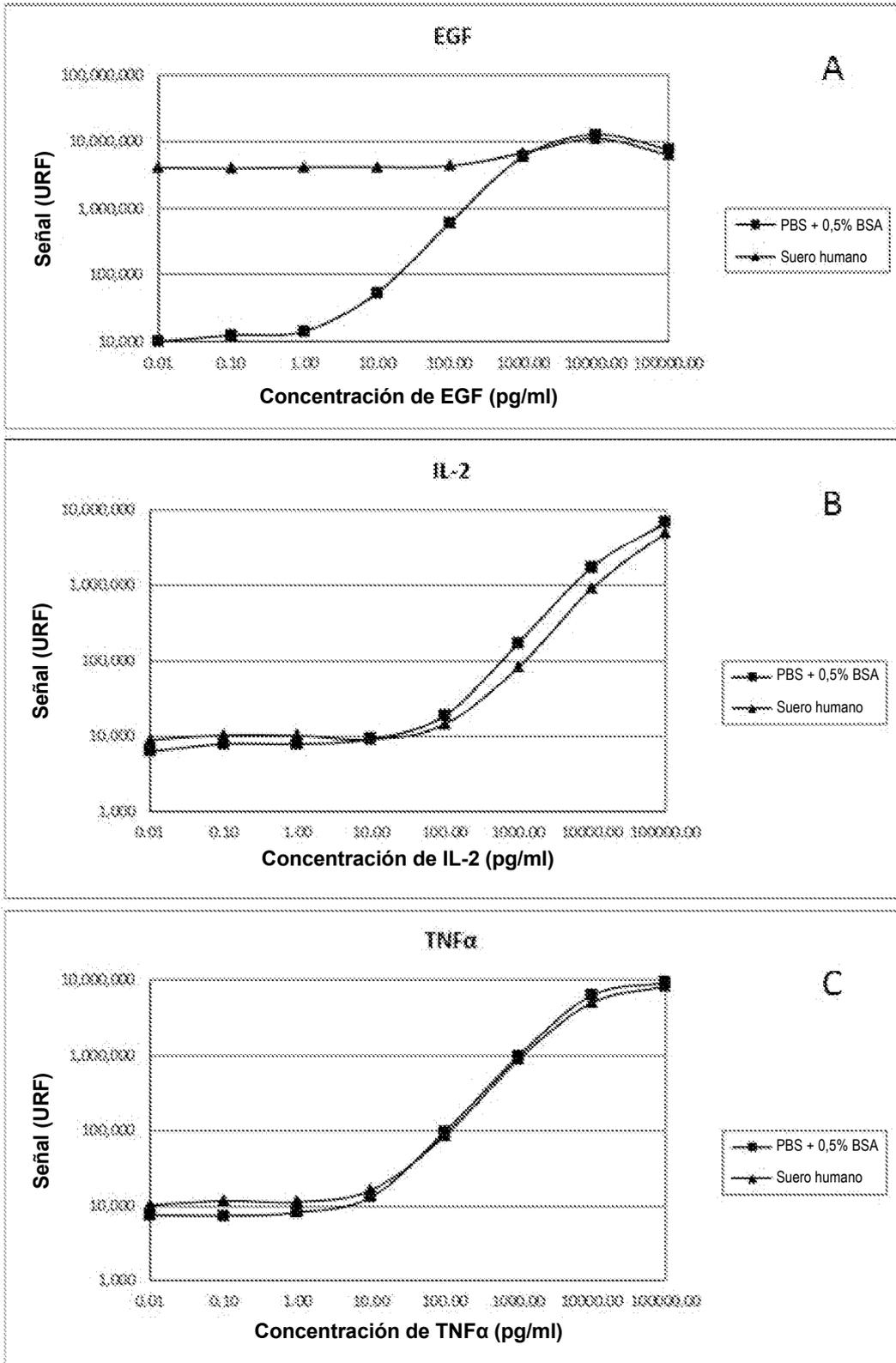


FIGURA 12

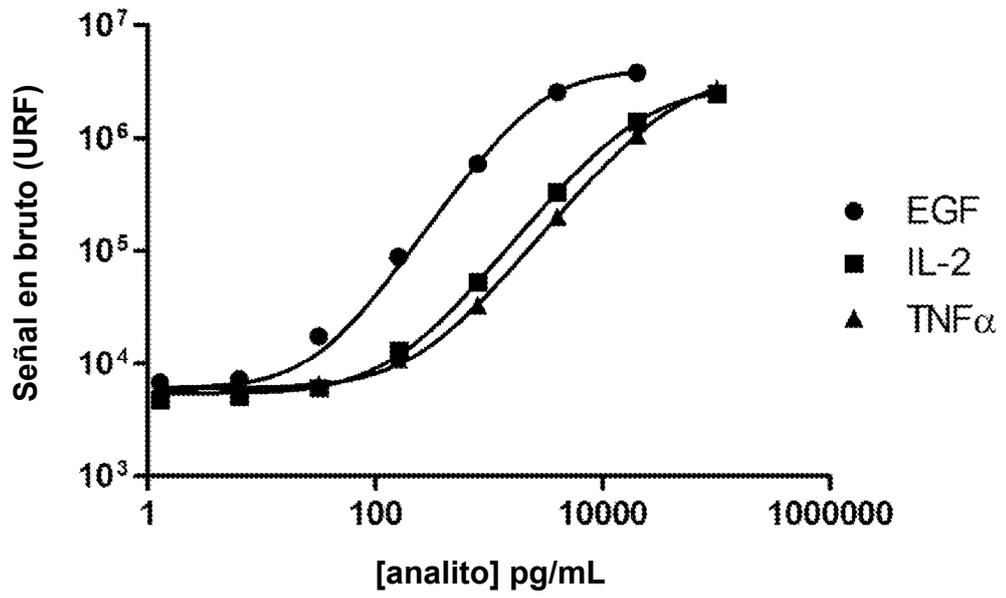


FIGURA 13

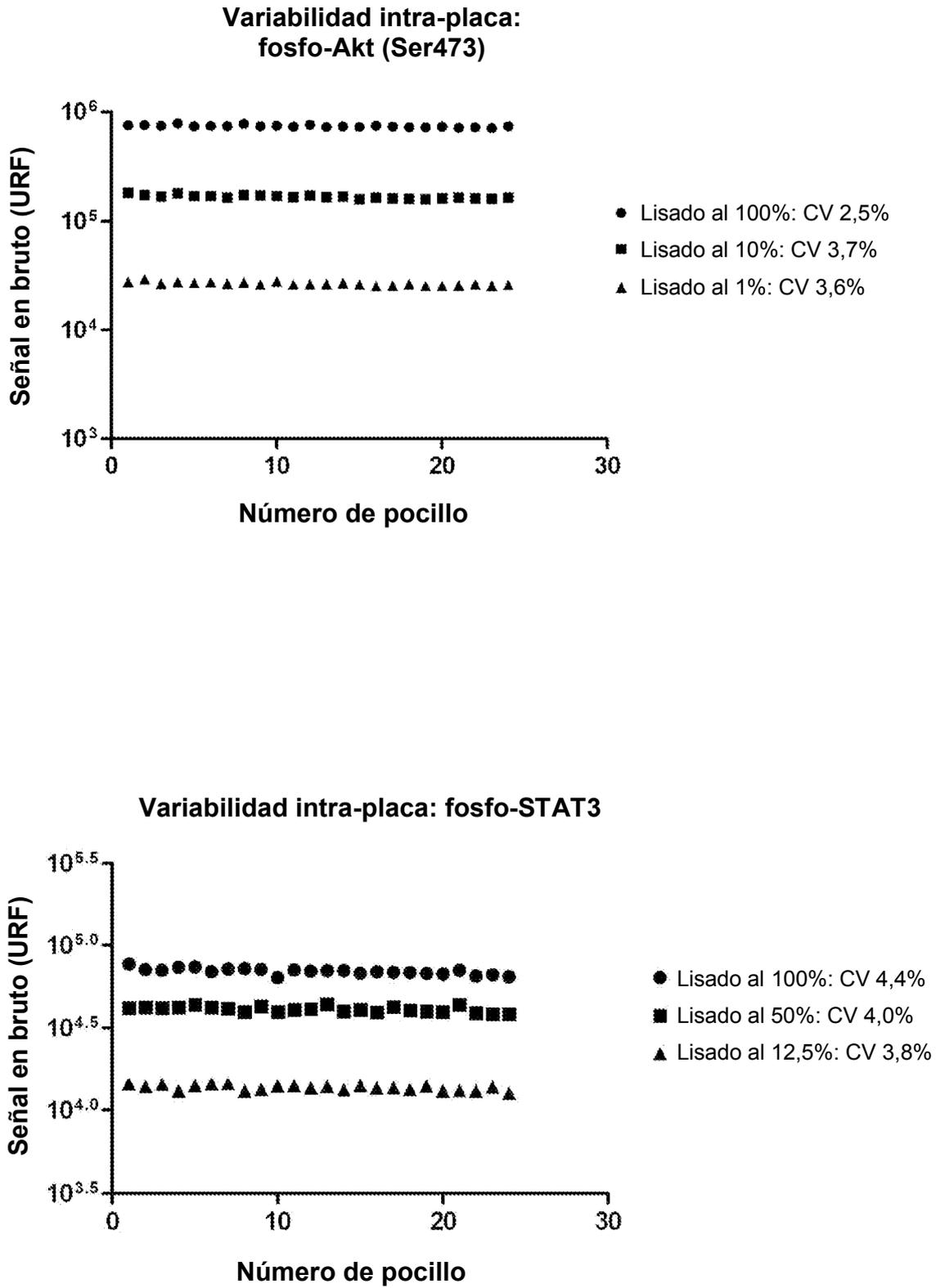


FIGURA 14

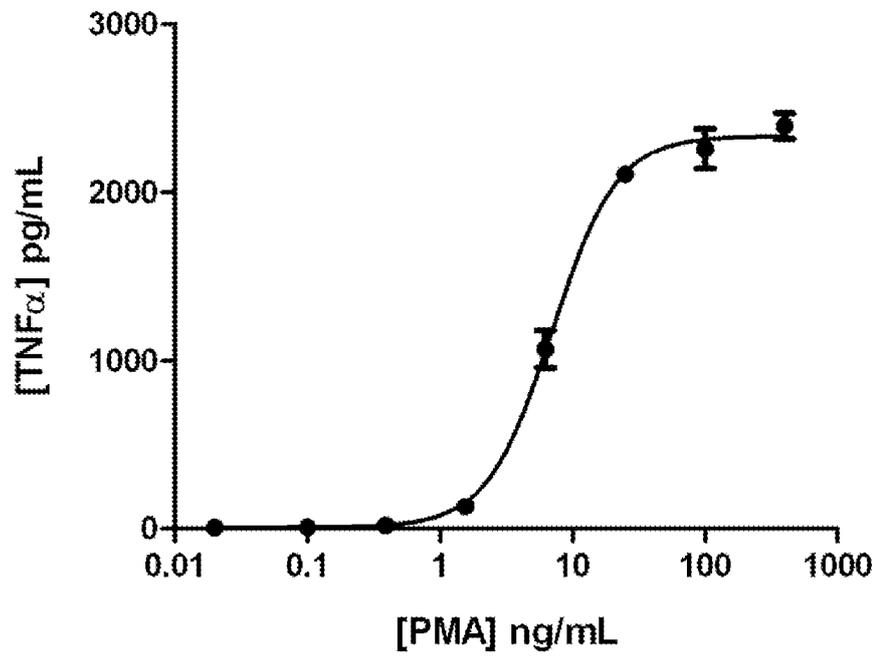


FIGURA 15

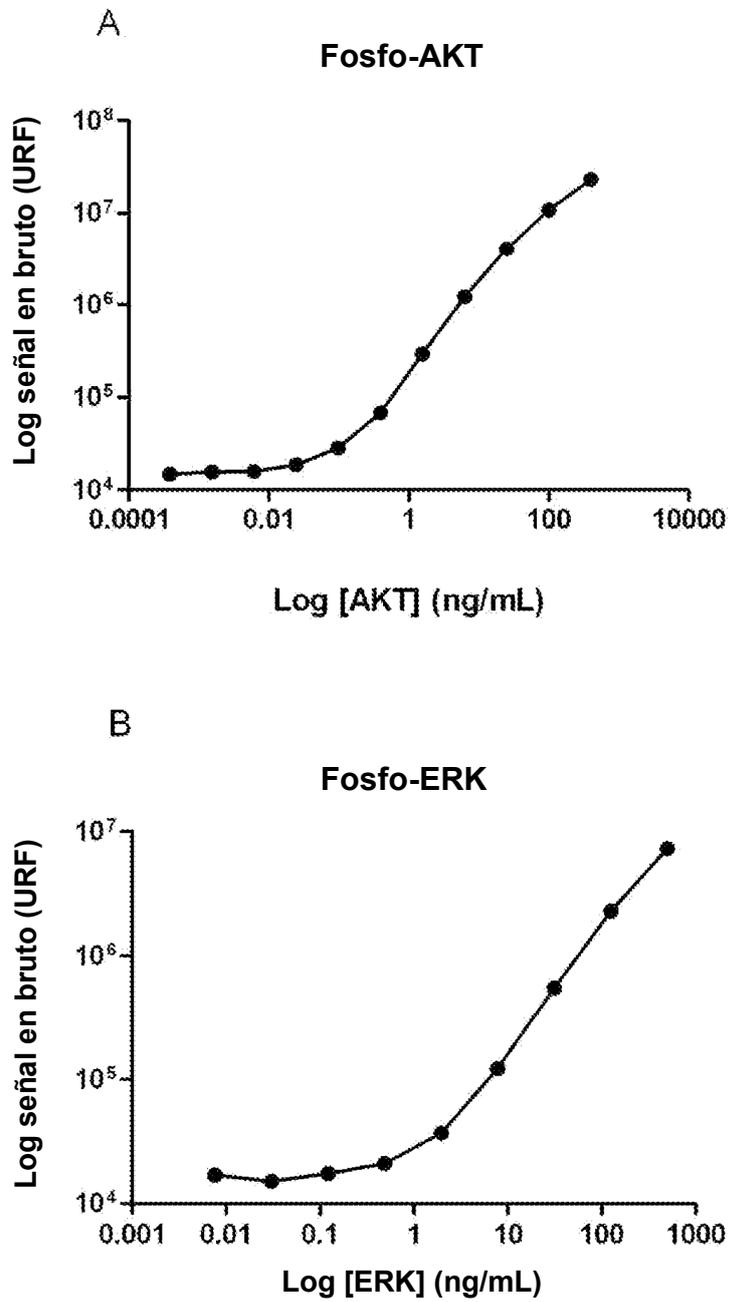


FIGURA 16

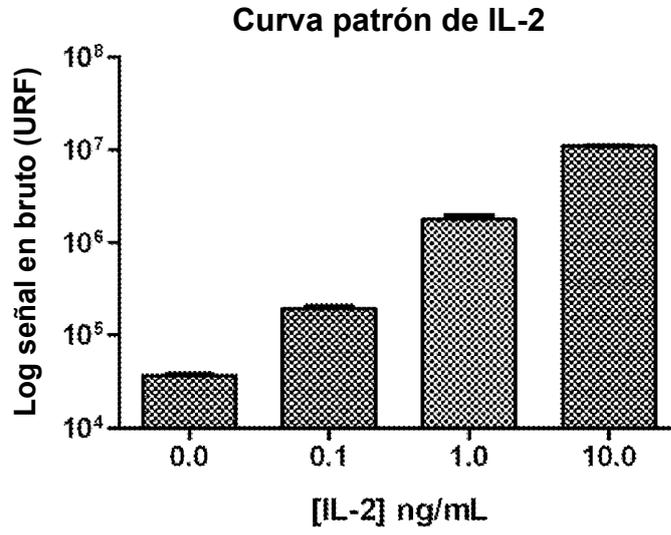


FIGURA 17

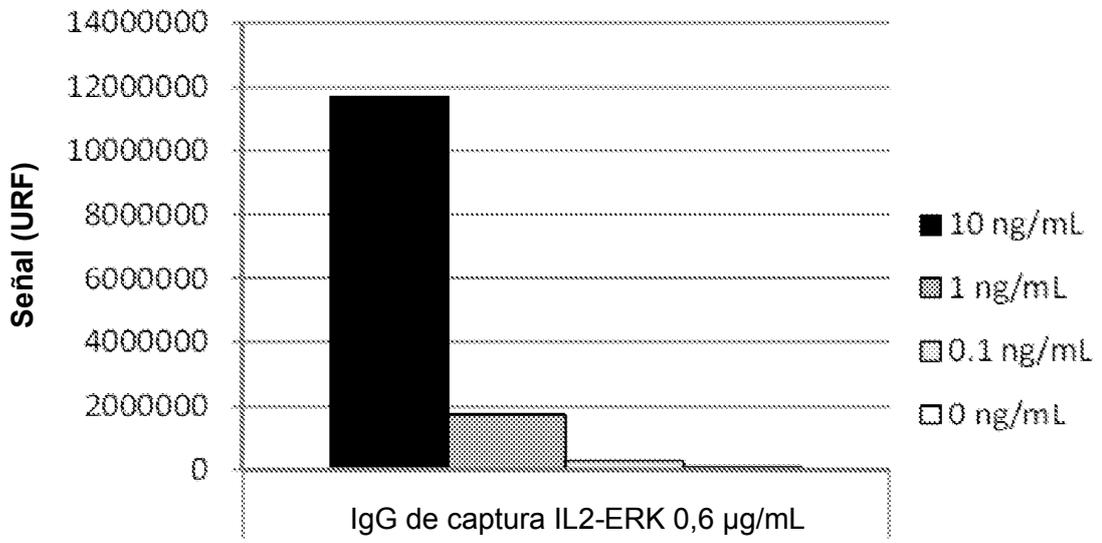


FIGURA 18

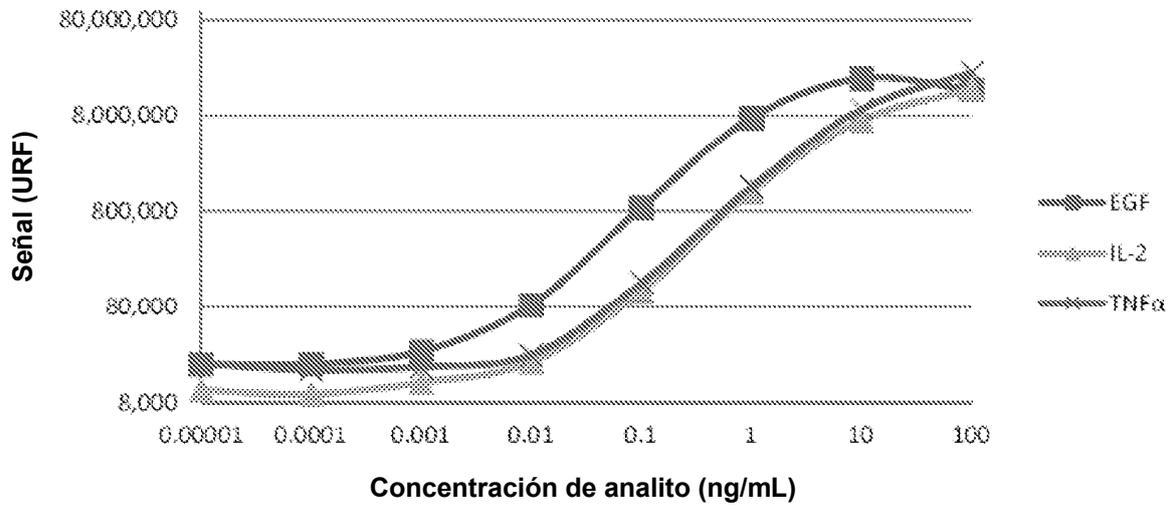


FIGURA 19

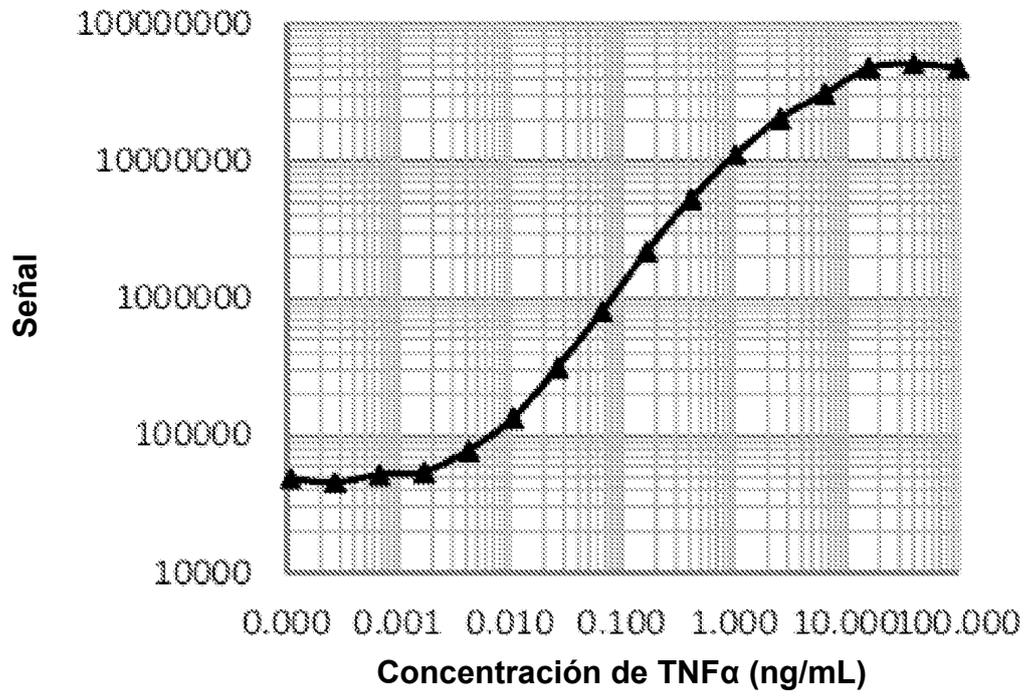


FIGURA 20

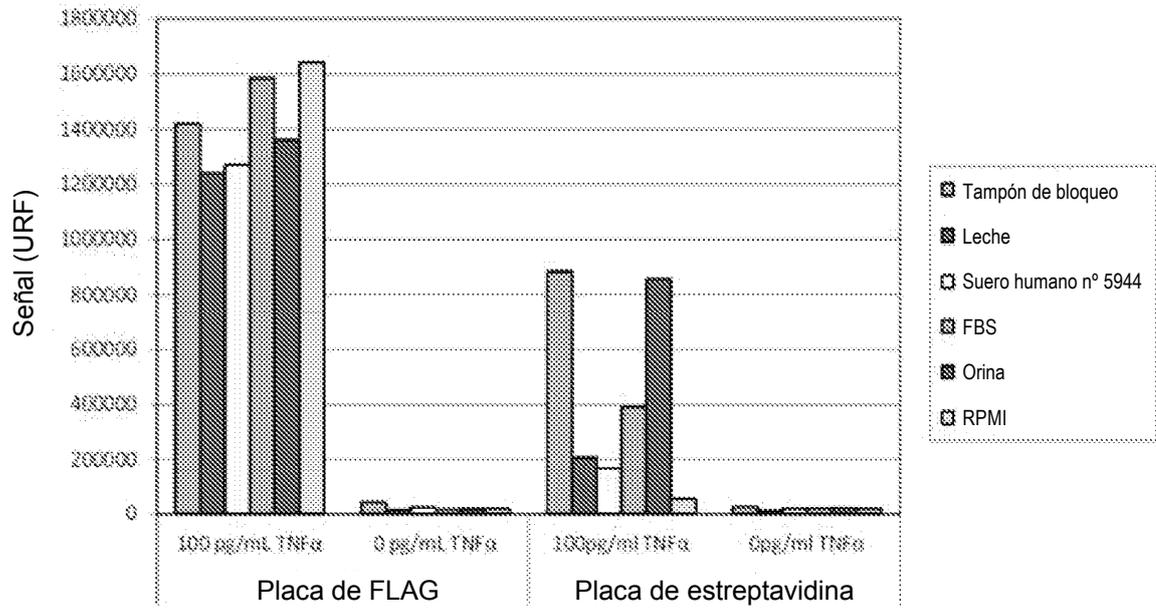
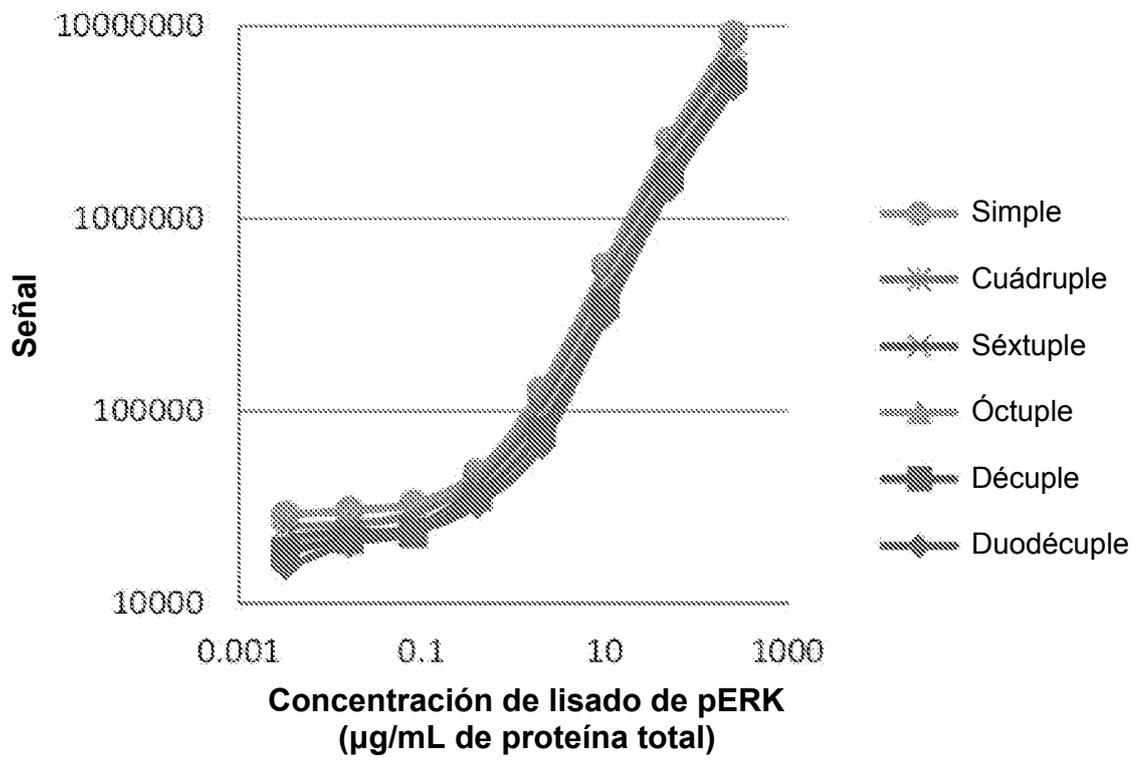


FIGURA 21

A



B

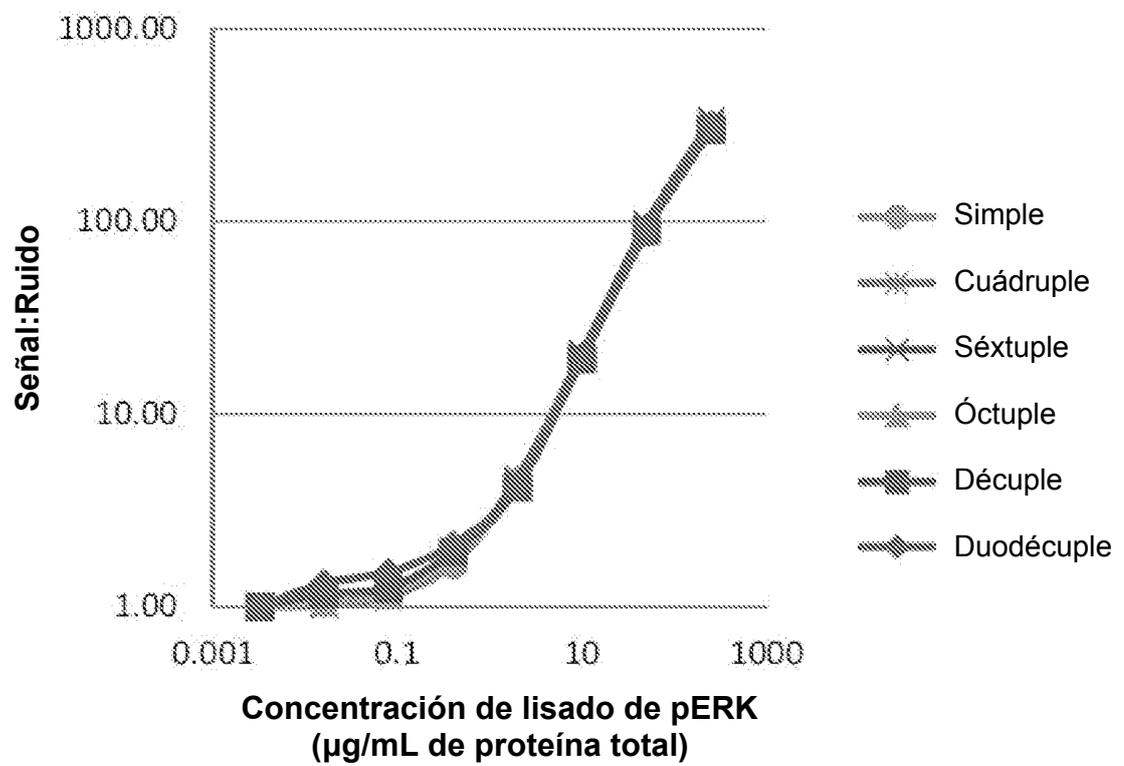


FIGURA 22

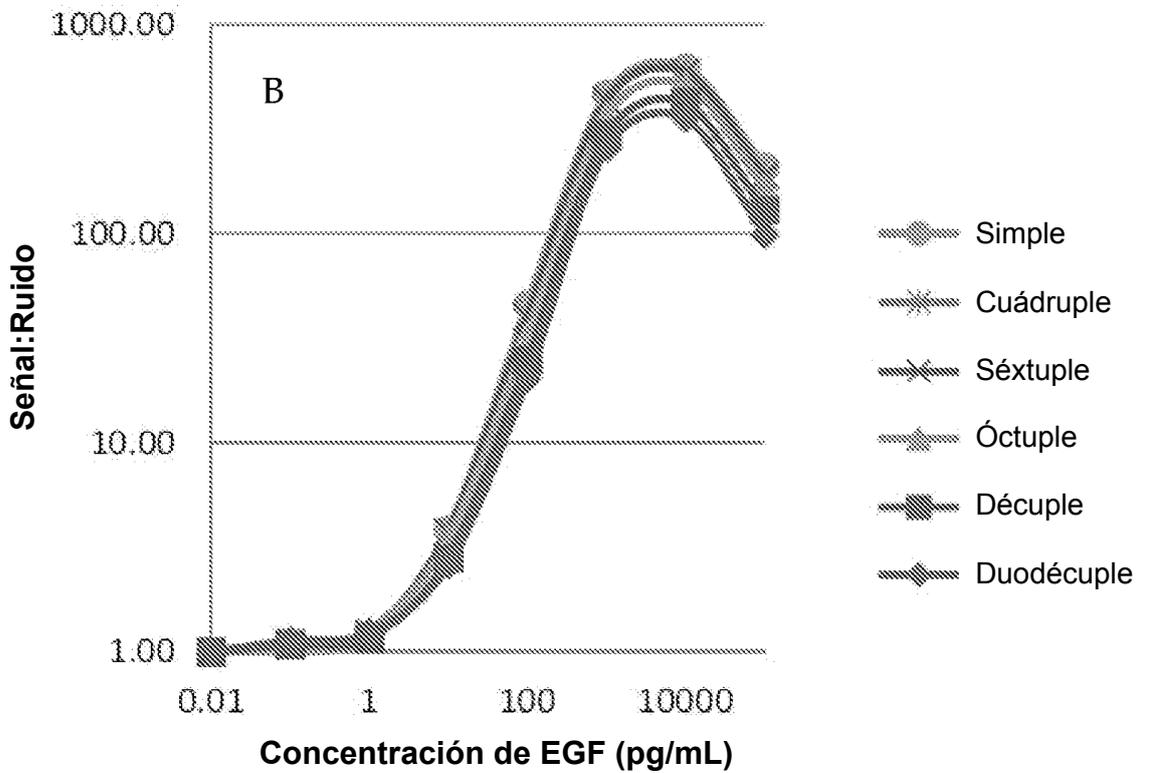
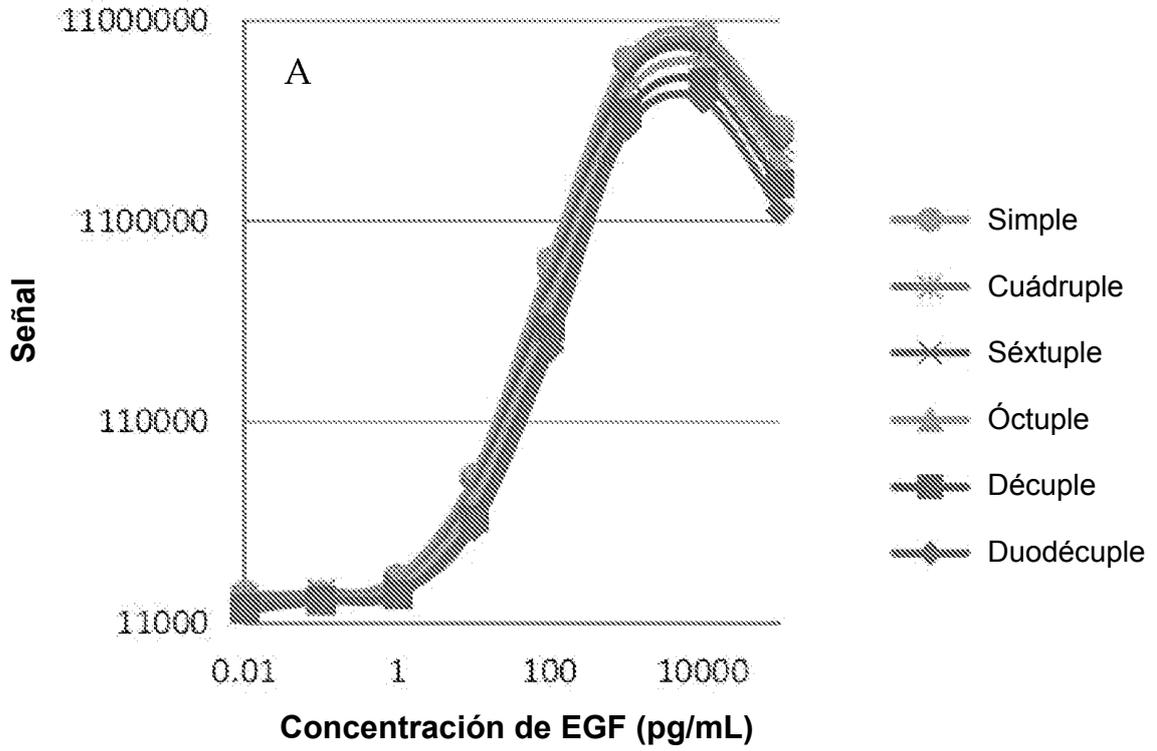
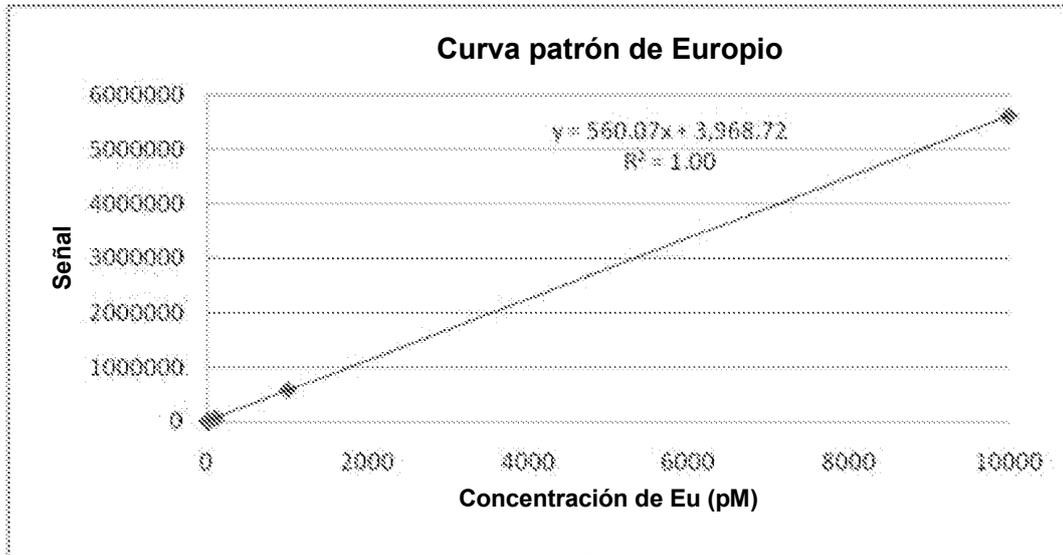


FIGURA 23

A



B

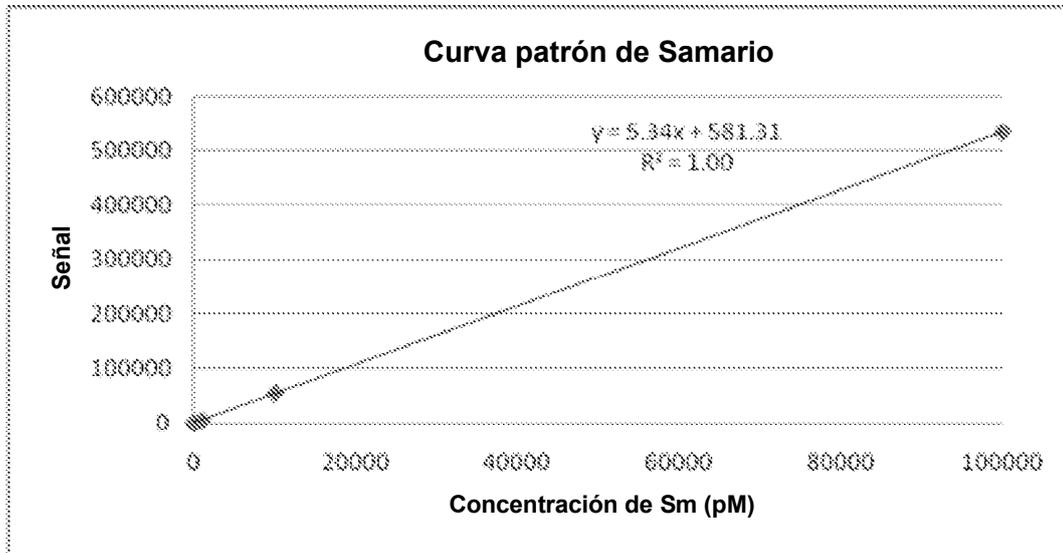


FIGURA 24

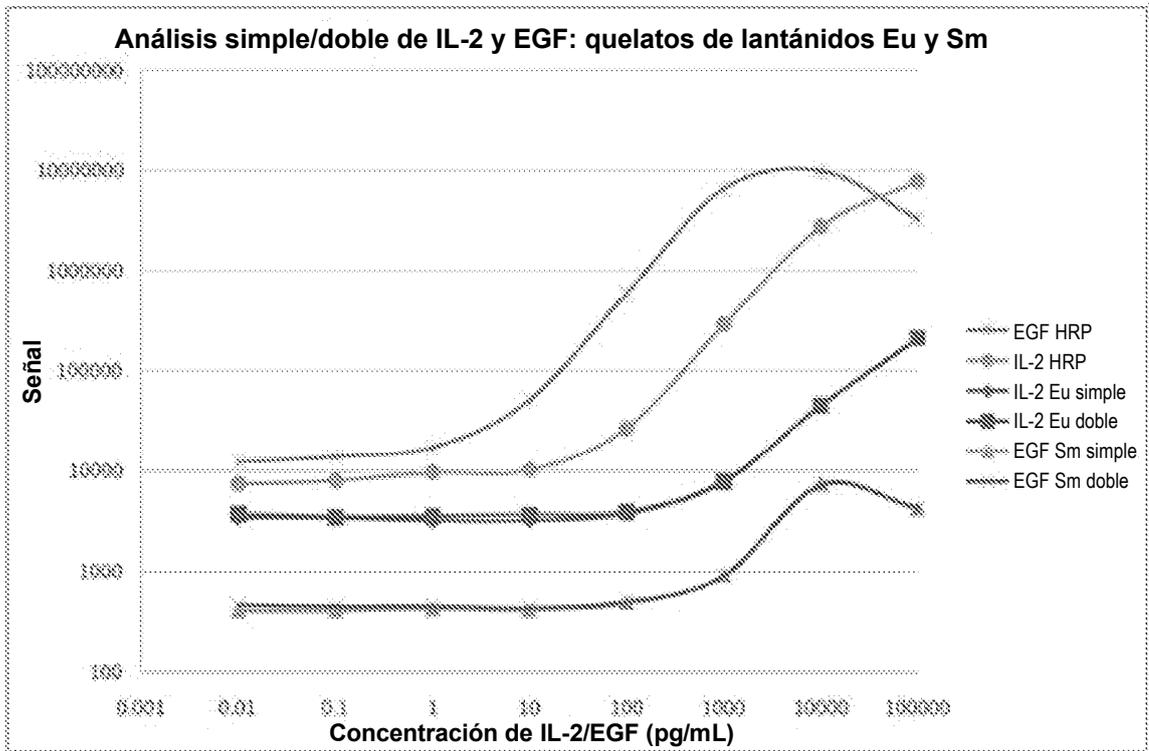


FIGURA 25

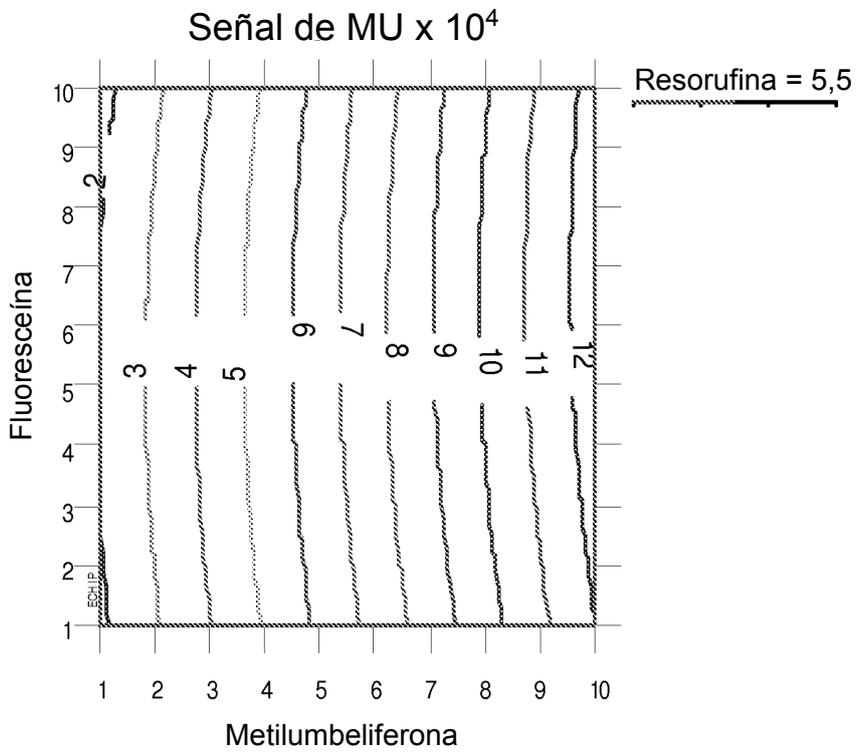


FIGURA 26

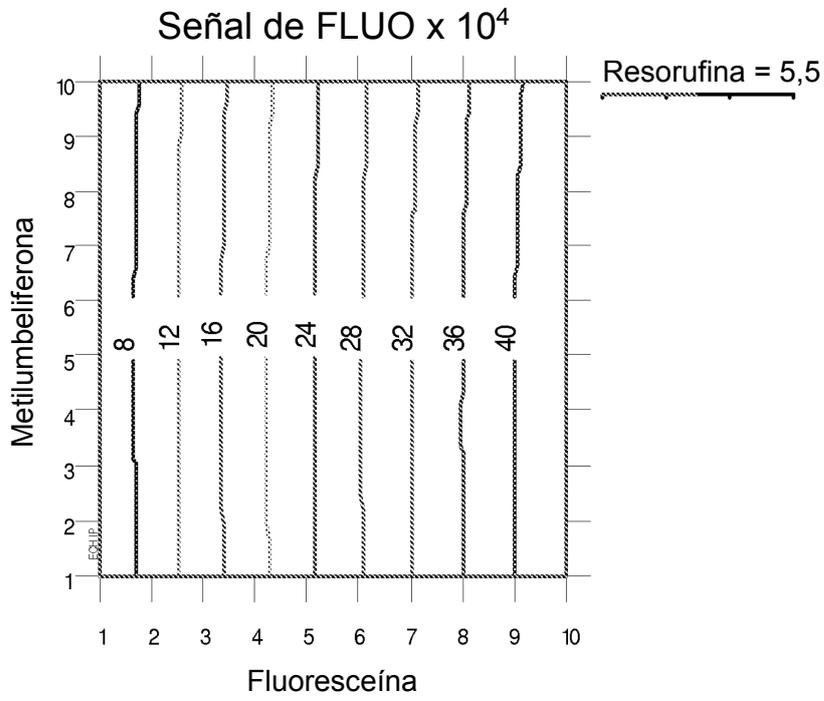


FIGURA 27

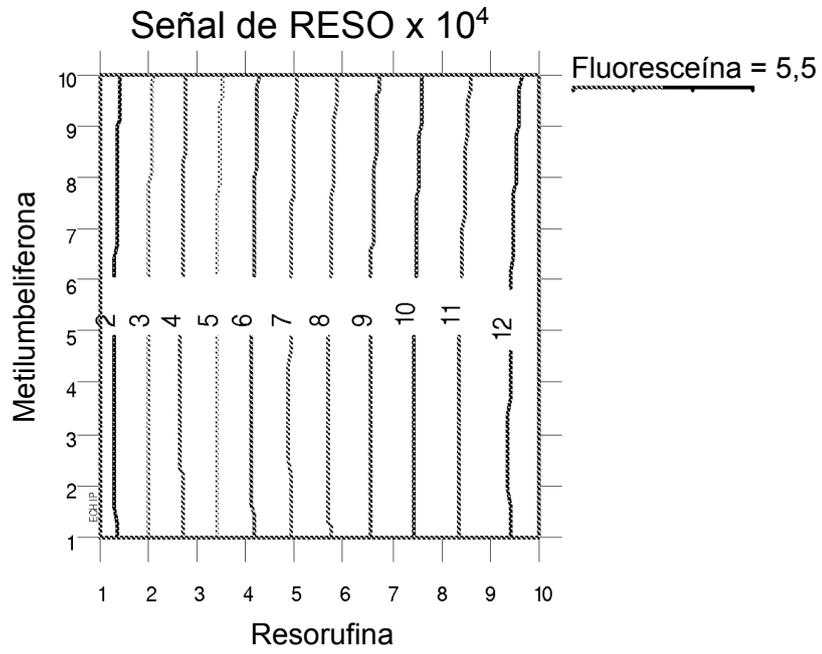


FIGURA 28

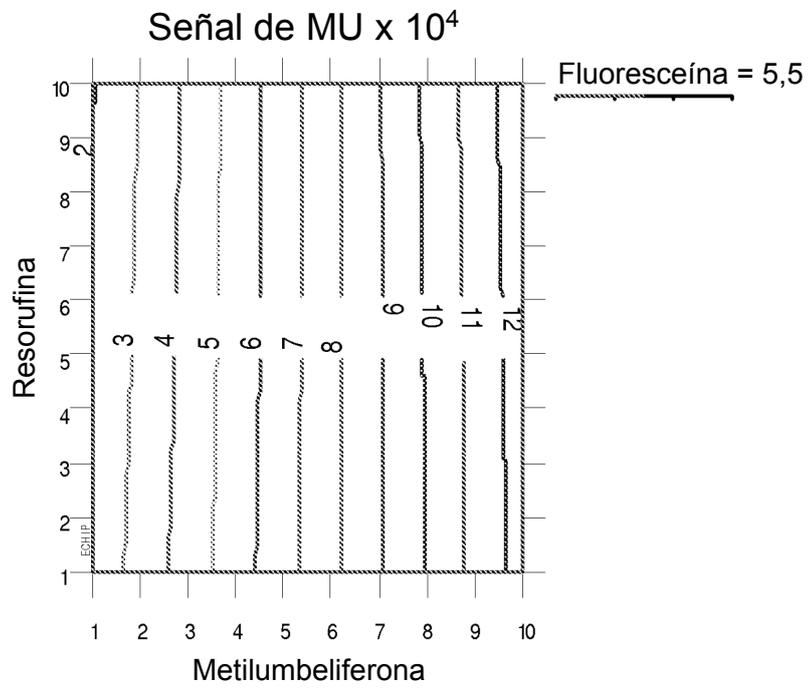


FIGURA 29

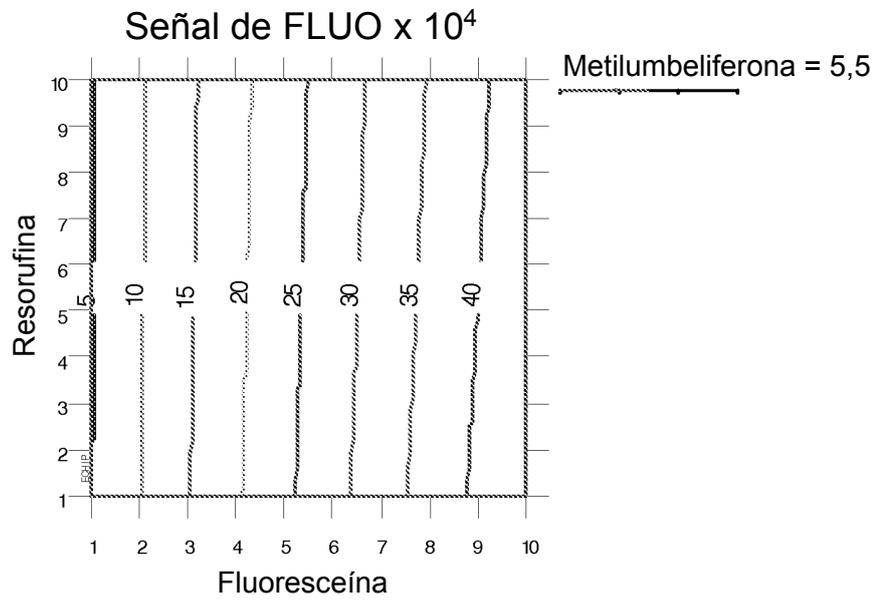


FIGURA 30

