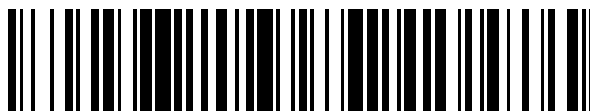


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 393**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/FI2015/050117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15712181 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3111218**

54 Título: **Método de bioensayo basado en la proteína L para determinar la presencia de anticuerpos solubles en una muestra y un kit para ello**

30 Prioridad:

27.02.2014 FI 20145191

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

04.02.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF HELSINKI (100.0%)
Yliopistonkatu 4 P.O. Box 33
00014 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**HEDMAN, KLAUS;
HEPOJOKI, JUSSI;
HEPOJOKI, SATU;
VAHERI, ANTTI y
VAPALAHTI, OLLI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 698 393 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de bioensayo basado en la proteína L para determinar la presencia de anticuerpos solubles en una muestra y un kit para ello

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método en el que la presencia de un anticuerpo soluble específico en una muestra de un fluido corporal, preferiblemente plasma o suero, de un animal, incluido el ser humano, se determina cualitativamente y/o cuantitativamente. Esta invención se refiere particularmente a una determinación serológica sin separación para fines de diagnóstico.

10

Antecedentes de la invención

Las publicaciones y otros materiales utilizados en la presente memoria para ilustrar los antecedentes de la invención, y en particular, los casos para proporcionar detalles adicionales con respecto a la práctica, se incorporan como referencia.

15

Una variedad de alternativas para los métodos serológicos son conocidas en la técnica. La revisión sobre inmunoensayos para diagnosticar el VIH por Chappel et al. [Chappel RJ, Wilson KM, Dax EM. Immunoassays for the diagnosis of HIV: meeting future needs by enhancing the quality of testing. *Future Microbiology* 2009, 4, 963-982] ilustra las técnicas conocidas de manera bastante completa.

20

Las técnicas clásicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o el inmunoensayo enzimático (EIA) requieren etapas de lavado exhaustivas, pero tienen una sensibilidad y especificidad bastante altas. El inconveniente de tales pruebas es que requieren varias etapas de lavado e incubación, y por lo tanto, requieren bastante tiempo de ejecución práctica. Por otro lado, las pruebas rápidas, en general, requieren menos tiempo y pueden estar exentas de separación. Sin embargo, el inconveniente de estas pruebas es que, en general, se puede obtener una sensibilidad y especificidad bastante bajas.

25

Tian & Heyduk 2009 [Anal Chem. 2009, 81, 5218-5225] han descrito un diseño de inmunosensor homogéneo que utiliza la naturaleza bivalente de un anticuerpo. Según Tian & Heudyk 2009, el diseño del inmunosensor puede utilizarse en aplicaciones en la detección de anticuerpos, p. ej. en el diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias o infecciosas. El diseño divulgado emplea antígenos de anticuerpos conjugados que usan enlazadores flexibles con oligonucleótidos complementarios cortos, cada uno de los cuales contiene un fluorocromo que puede formar un par donante-aceptor de transferencia de energía de resonancia de Förster (o fluorescencia) (FRET).

30

Liu et al. [Anal. Chem. 2008, 80, 7735-7741] propusieron inmunoensayos homogéneos basados en la excitación de dos fotones FRET (TP-FRET). Demostraron que el anticuerpo anti-BSA podría determinarse utilizando albúmina de suero bovino (BSA) marcada por separado con un donante y aceptor. Se sugirieron aplicaciones de análisis *in vivo* o intracelular.

35

Saraheimo Satu et al. [PLOS ONE 2013, 8 (5), e62739] describieron un ensayo basado en la medición de TR-FRET entre el antígeno marcado con el donante y el antígeno marcado con el aceptor puenteado por una molécula de IgG específica. El ensayo divulgado se basa en el marcado del antígeno de interés, en dos reacciones diferentes, tanto con el fluorocromo aceptor como con el donante. Dado que las dos reacciones de marcado se realizan comúnmente utilizando diferentes métodos de activación, el marcado del antígeno con otros fluoróforos puede tener como resultado el "enmascaramiento" de los epítomos de antígenos, impidiendo así el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos.

40

El documento WO 2008/020823 divulga un concepto general de detección de un analito, como un anticuerpo, utilizando la proteína L en un ensayo FRET.

45

Objeto y sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de bioensayo para determinar la presencia de un anticuerpo soluble específico en una muestra que comprende un fluido corporal.

50

La presente invención proporciona un método de bioensayo en el que la presencia de un anticuerpo soluble específico de un animal, incluido el ser humano, en una muestra que comprende un fluido corporal de dicho animal se determina cualitativamente y/o cuantitativamente, empleando dicho método

55

a) un primer grupo que incluye un donante de energía, y

60

b) un segundo grupo que incluye un aceptor de energía o desactivador,

en el que

i) dicho primer grupo o dicho segundo grupo comprende un antígeno de dicho anticuerpo soluble, y

5 ii) dicho segundo grupo o dicho primer grupo, respectivamente, comprende un resto de unión de resto de unión al antígeno (Fab) (FBM) acoplado a dicho donante de energía, o dicho aceptor de energía, incluido el desactivador, respectivamente, siendo dicho resto capaz de unirse a una región Fab de anticuerpos de dicho animal,

10 en el que dicho donante de energía y dicho aceptor de energía o desactivador forman un par de transferencia de energía capaz de transferir energía; y

15 el FBM se selecciona del grupo que consiste en proteína L, proteína L recombinante, proteína de unión a Ch1 o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig, preferiblemente el FBM es una proteína L recombinante o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig.

20 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit para un método de bioensayo.

La presente invención proporciona un kit para un método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado **por que** dicho kit comprende

25 i) un primer reactivo, que comprende un marcador donante de energía,

ii) un segundo reactivo que comprende un marcador aceptor de energía o marcador desactivador,

en el que

30 a) dicho primer reactivo o dicho segundo reactivo comprende un antígeno de dicho anticuerpo soluble de un animal, incluido el ser humano, y

35 b) dicho segundo reactivo o dicho primer reactivo, respectivamente, comprenden un resto de unión a Fab (FBM) acoplado a dicho donante de energía, o dicho aceptor de energía o desactivador, respectivamente, siendo dicho FBM capaz de unirse a una región Fab de anticuerpos de dicho animal,

40 en el que dicho marcador de donante y dicho marcador de aceptor o marcador desactivador forman un par de transferencia de energía capaz de transferir energía, preferiblemente transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), y lo más preferiblemente FRET de resolución temporal (TR-FRET), FRET de excitación de dos fotones (TP-FRET) o canalización de oxígeno luminiscente (LOC); y

45 el FBM se selecciona del grupo que consiste en proteína L, proteína L recombinante, proteína de unión a Ch1 o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig, preferiblemente el FBM es una proteína L recombinante o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 ilustra esquemáticamente la estructura de la molécula de inmunoglobulina G.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente el principio de ensayo de la presente invención.

55 La Figura 3 ilustra las combinaciones activas de TR-FRET de antígeno y FBM como se ilustra en una molécula de IgG y sus fragmentos.

La Figura 4 ilustra la comparación entre el ensayo de puente FRET y el ensayo basado en la proteína L que usa SA como antígeno. El eje X muestra la concentración de proteína L/concentración de anticuerpos en cada punto.

60 La Figura 5 ilustra la comparación entre el ensayo de puente FRET y el ensayo basado en proteína L utilizando GST como antígeno. El eje X muestra la concentración de proteína L/concentración de anticuerpos en cada punto.

65 La Figura 6 ilustra el anticuerpo anti-SA titulado contra GST-VP1u marcado con Eu y la proteína L marcada con AF con un anticuerpo anti-GST soluble como control (proteína L y antígeno ambos 20 nM).

La Figura 7 ilustra el anticuerpo anti-GST titulado contra SA marcado con Eu y la proteína L marcada con AF con anticuerpo anti-SA como control (tanto la proteína L como el antígeno 20 nM).

5 La Figura 8 ilustra el anticuerpo anti-SA titulado contra SA marcado con AF y la proteína L marcada con Eu con un anticuerpo anti-GST como control (proteína L y antígeno, ambos 20 nM).

La Figura 9 ilustra el anticuerpo soluble anti-GST titulado contra GST-VP1u marcado con AF y la proteína L marcada con Eu con un anticuerpo anti-SA soluble como control (proteína L y antígeno ambos 20 nM).

10 La Figura 10 ilustra los fragmentos Fab anti-SA (dilución 1/8 a 1/32) y anti-SA intacto (50 a 10 nM) titulados contra la proteína L constante (marcada con el aceptor) y la concentración de antígeno (marcado con el donante) (20 nM cada uno).

15 La Figura 11 ilustra esquemáticamente el principio de ensayo de la presente invención cuando se emplea GullSORB para eliminar las IgG por centrifugación.

La Figura 12 ilustra los resultados de 211 muestras de suero.

20 La Figura 13 ilustra los resultados de las pruebas de 211 muestras de suero cuando se emplea GullSORB para eliminar las IgG por centrifugación.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a un método definido en la reivindicación 1. La presente invención se refiere también a un kit definido en la reivindicación 13.

30 La presente invención utiliza un antígeno marcado con un único fluoróforo (donante o aceptor) junto con un resto de unión a Fab (FBM) marcado con un único fluoróforo (donante si acepta en el antígeno, y aceptor si es donante en el antígeno). La Figura 1 ilustra esquemáticamente la estructura de la molécula de IgG y los fragmentos de IgG como se muestra en <http://www.biologyexams4u.com/2012/11/antigen-antibody-interaction.html>. El FBM es un resto capaz de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab, p. ej. proteína L (un resto de unión a la cadena ligera kappa). Dado que el otro fluoróforo está en el FBM, solo se requiere una única reacción de marcado para cada antígeno, minimizando así la posibilidad de que el marcador se una a los aminoácidos en epítopos relevantes que probablemente tendrían como resultado la inhibición del reconocimiento del antígeno por el respectivo anticuerpo soluble (debido al "enmascaramiento" del epítipo por el fluoróforo). El uso de un FBM dirigido a la cadena ligera (como la proteína L que se usa en nuestros ejemplos) permite el uso del mismo reactivo en la detección de varios antígenos. Además, si se utiliza un FBM dirigido a las cadenas ligeras, los ensayos que emplean dichos reactivos son aplicables a la detección de inmunoglobulinas (Ig) de prácticamente todas las clases (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM).

40 La Figura 2 ilustra esquemáticamente una configuración de ensayo típica de la presente invención. Cuando un anticuerpo soluble se une a ambos componentes de la reacción (FBM marcado con fluoróforo, como se ilustra con la proteína L y el antígeno marcado con fluoróforo) en el mismo brazo Fab o ambos brazos Fab (o FBM en el otro brazo Fab y el antígeno en el otro), se forma un par FRET que puede medirse. Solo se muestra una configuración con el marcador del donante (D) en el antígeno y el marcador del aceptor (A) en la proteína L. El orden de los marcadores se puede invertir. Los complejos antígeno-anticuerpo-proteína L que son activos para TR-FRET (y FRET) se ilustran esquemáticamente en la Figura 3. Las combinaciones se muestran para IgG, pero también son posibles los complejos formados por la unión consecutiva del antígeno y la proteína L a una molécula de inmunoglobulina de otra clase (IgD, IgA, IgE e IgM). También los complejos con cadenas ligeras libres con antígeno y proteína L, producirían la señal TR-FRET.

45 Las inmunoglobulinas comprenden cadenas pesadas (los seres humanos tienen cadenas pesadas γ , δ , α , μ y ϵ que existen respectivamente en IgG, IgD, IgA, IgM e IgE) que forman complejos con cadenas ligeras (los seres humanos tienen cadenas ligeras κ y λ) para formar una molécula de inmunoglobulina. Como se ilustra en la Figura 1 por la molécula de IgG humana, las inmunoglobulinas contienen una región Fc que está formada por dominios constantes en las cadenas pesadas de Ig y dos (o más) regiones Fab, cada una formada por una cadena pesada y ligera (con dominios constantes y variables) en ambas). Debido a la naturaleza di- o multivalente (dos o más sitios de unión a antígenos, es decir, regiones variables) de los anticuerpos, es posible crear ensayos rápidos homogéneos, es decir, sin separación, para anticuerpos circulantes utilizando pares de reactivos adecuados, capaces de generar una señal cuando se acercan entre sí mediante la unión al anticuerpo soluble específico. En la presente invención, un par de fluoróforos capaces de transferir energía (ilustrado por el par TR-FRET: europio quelado como donante y AlexaFluor647 como aceptor) se unen de la siguiente manera: un fluoróforo (donante o aceptor) a un FBM (ilustrado por un resto de unión a la cadena ligera kappa, proteína L) y el otro fluoróforo (aceptor si el donante en FBM y donante si el aceptor en FBM) a un antígeno, para permitir la detección de anticuerpos específicos en un ensayo homogéneo.

Los ensayos bioquímicos adecuados para tales fines se denominan aquí ensayos de proximidad. Los ensayos de proximidad son ensayos en los que la unión específica, como el reconocimiento de antígenos por un anticuerpo soluble, pone conjuntos de dos marcadores en la proximidad de cada uno para crear una señal orquestada. Ensayos típicos de este tipo son todos los tipos de ensayos de transferencia de energía compuestos de marcadores fluorescentes o luminiscentes; un donante de energía y un aceptor de energía, incluyendo un desactivador. Tradicionalmente, dichos ensayos se basan en dos fluorocromos que tienen una superposición integral energética adecuada para permitir la transferencia de energía en las proximidades, dentro de las distancias de 1 a 10 nm (Förster T, Ann Physik 6:55, 1948).

Otras tecnologías capaces de controlar la proximidad de reactivos in situ son, por ejemplo, ensayos de proximidad de centelleo, ensayos de complementación de fluorescencia bimolecular, ensayos de complementación de fragmentos de enzimas o ensayos de canalización de oxígeno. El ensayo de canalización de oxígeno representa un enfoque de transferencia de energía diferente en el que el marcador del donante está en las perlas del donante y consiste en un fotosensibilizador compuesto por ftalocianina capaz de generar radicales de oxígeno con la excitación (Ullman EF et al., Clin Chem 1996; 42: 1518-26). El oxígeno excitado cuando está en las proximidades (≤ 200 nm) de las bolasceptoras, desencadena reacciones que producen emisiones, p. ej. a 613 nm con quelato de europio como aceptor. Los donantes y aceptores incrustados en nanopérlas, adecuados para esta aplicación, están disponibles en PerkinElmer (AlphaScreen® beads, PerkinElmer, Walltham, MA, EE. UU.).

Los inventores de la presente invención decidieron probar una configuración de ensayo utilizando FBM con un fluoróforo (donante o aceptor) y un antígeno con el otro fluoróforo (aceptor o donante, respectivamente). En teoría, como se ilustra en la Figura 3, la unión de FBM y el antígeno a un solo Fab (o al contrario) llevaría a los fluoróforos formadores del par de FRET a una proximidad lo suficientemente estrecha como para que TR-FRET detecte la unión. El mismo FBM se puede usar en la detección de una multiplicidad de antígenos, y así reducirá el número de reacciones de marcado requeridas para establecer ensayos para diferentes antígenos. Además, el ensayo basado en FBM marcado (como se ilustra con la proteína L) es altamente versátil, ya que puede usarse para detectar diferentes subclases de anticuerpos solubles en combinación con un rango prácticamente ilimitado de antígenos. Sorprendentemente, los inventores observaron que la intensidad de las señales de TR-FRET mejoró (aproximadamente de 7 a 10 veces el aumento de la intensidad de la señal) con este nuevo enfoque en comparación con el ensayo de puente de FRET mencionado anteriormente (figura 4 y 5). Esto podría reflejar la capacidad de cada molécula de anticuerpo soluble para formar al menos dos de estos complejos, la proximidad de los dos fluoróforos y/o la función de reticulación de la proteína L (que incorpora 4 FBM por molécula).

Los inventores de la presente invención se dieron cuenta de que la determinación serológica de la presencia de anticuerpos específicos para un antígeno dado con fines de diagnóstico puede llevarse a cabo simplemente empleando el antígeno marcado del anticuerpo soluble que se determinará en combinación con un FBM. Esto se puede hacer marcando el antígeno con un donante (o aceptor) de un par de transferencia de energía y el FBM con un aceptor (o donante) del par de transferencia de energía. Por lo tanto, una reacción entre una muestra, que comprende el anticuerpo soluble a determinar, da como resultado que la mayoría de los anticuerpos se unirán al FBM marcado con el aceptor y algunos de estos anticuerpos se unirán con uno o dos sitios de unión al antígeno al epítipo del antígeno marcado con un donante, permitiendo así la transferencia de energía entre el donante y el aceptor. Si la mezcla de reacción se excita con radiación que tiene una longitud de onda de excitación del donante, el antígeno marcado se excita y se produce la transferencia de energía del donante al aceptor, y luego el aceptor emite una radiación que puede medirse. Cuantos más anticuerpos de dicha especificidad contenga la muestra, mayor será la señal de emisión de radiación detectada del aceptor. Si la configuración del ensayo implica a un desactivador, más anticuerpos en la muestra darían como resultado una señal más baja, proporcional a la concentración de anticuerpos.

El ejemplo o un ensayo preliminar de eficacia utiliza una proteína L recombinante marcada con fluoróforo y antígenos marcados con fluoróforo (un fluoróforo que actúa como aceptor y el otro como donante) para detectar inmunoglobulinas específicas de antígeno (ilustradas por IgG). La proteína L, una proteína de superficie bacteriana originalmente derivada de *Peptostreptococcus magnus* (Akerstrom y Bjorck 1989, J Biol Chem 264: 19740-19746), tiene la capacidad de unirse a moléculas de Ig a través de la cadena ligera kappa sin interferir con la unión al antígeno (Akerstrom and Bjorck 1989, J Biol Chem 264: 19740-19746). La proteína L es capaz de unirse a todas las clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) a través de sus cadenas ligeras (si es de cadena kappa) (De Chateau et al. 1993, Scand J Immunol 37: 339-405). Por lo tanto, la proteína L se une a una gama más amplia de clases y subclases de Ig que otras proteínas de unión a anticuerpos, como las proteínas A y G (Bjorck 1988, J Immunol 140(4):1194-1197; Nilson et al. 1992, JBC 267: 2234-2239). La unión de estos dos componentes, el antígeno y la proteína L, al mismo brazo Fab de un anticuerpo soluble se puede medir por TR-FRET, inmediatamente después de la reacción de unión. Este enfoque no requiere etapas de lavado, lo que significa que es un inmunoensayo homogéneo. El ensayo mide la presencia o ausencia de inmunoglobulinas antimicrobianas (IgG y/o IgM) e indica el registro de exposición de por vida del sujeto y el estado de inmunidad (incluida la inducida por vacunas) para el antígeno microbiano estudiado. Además de los antígenos microbianos, la prueba como tal es adecuada para estudiar las reacciones a los autoantígenos, alérgenos, etc.

Los inventores han comprendido que los reactivos, es decir, un antígeno marcado con un donante o un aceptor y el FBM marcado con un par de transferencia de energía, sorprendentemente no necesitan características funcionales adicionales y el sistema puede usarse para detectar la respuesta de anticuerpos específica a un antígeno dado en un fluido corporal con una probabilidad del 99 % de que los anticuerpos en el fluido corporal se dirijan a otros antígenos no relacionados. Siempre que los marcadores no interfieran con la capacidad del anticuerpo soluble, para ser detectado, para unirse al epítipo del antígeno marcado o el FBM, el bioensayo de la presente invención es, en principio, funcional. Intrínsecamente, los brazos del Fab de las inmunoglobulinas, con los sitios de unión al antígeno, permitirán la unión tanto del antígeno como del FBM.

La idea de la presente invención se puede llevar a cabo, en principio, empleando cualquier par de transferencia de energía y/o un ensayo basado en la proximidad. Sin embargo, considerando el objetivo de proporcionar un ensayo simple y que las muestras serológicas generalmente impliquen una matriz de muestra compleja, se prefieren las alternativas que eliminan efectivamente la emisión de fondo, por ejemplo, por los componentes de la matriz de muestra.

Definiciones

La expresión *anticuerpo soluble* y el término *anticuerpo* se refiere, como sería evidente para un experto en la materia, en el contexto de esta solicitud a *anticuerpos solubles*. Dado que la presente invención se refiere particularmente a la determinación serológica para fines de diagnóstico, los anticuerpos unidos a la membrana, p. ej. los receptores de linfocitos B (BCR) no son de interés y, por lo tanto, no se mencionan.

La expresión *fluido corporal* en el contexto de esta solicitud se refiere a cualquier fluido dentro o excretado del cuerpo de un animal, incluido el ser humano. El fluido corporal por lo tanto se refiere a, por ejemplo, la sangre, sus constituyentes plasma y suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, secreción nasofaríngea y broncoalveolar, líquido aspirado o lavado, líquidos oculares, líquido pleural, exudado y ascitis, semen, bilis y derrames (por ejemplo, del oído medio o senos paranasales). El fluido corporal se refiere particularmente al plasma, suero y líquido cefalorraquídeo.

El término *antígeno* en el contexto de esta patente se refiere a un antígeno, un antígeno hapténico o un fragmento de antígeno que contiene el sitio epitópico pertinente.

La expresión *resto de unión a Fab (FBM)* en el contexto de esta solicitud se refiere a una molécula, preferiblemente un polipéptido, es decir, una proteína, que es capaz de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig. La FBM se selecciona particularmente del grupo que consiste en proteína L, proteína L recombinante, proteína de unión a Ch1 o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig, preferiblemente el FBM es una proteína L recombinante o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig.

El término *marcador* y *marcado* en el contexto de esta solicitud se refiere a una molécula marcadora detectable, que puede comprender un compuesto fluorescente, elemento metálico adecuado, p. ej. lantánido, o quelatos del mismo, fluorescentes o aceptores de energía, también puede ser una nanopera incrustada con compuestos fluorescentes o de extinción, o un fotosensibilizador, nanopuntos fluorescentes, perlas incrustadas en quelato, puntos cuánticos como aceptores, cristales de conversión ascendente o nanocuentas que los contienen. En el contexto de esta solicitud, los marcadores, descritos anteriormente, pueden estar directa, covalentemente o no covalentemente, acoplados a antígenos definidos, o pueden unirse por medios indirectos, como a través de la interacción de avidina o estreptavidina con un componente biotinilado, utilizando anticuerpos, como anti-digoxigenina o anti-fluoresceína, o anticuerpos anti-IgG anti-especies, lectinas, oligonucleótidos u otras formas indirectas de marcado generalmente utilizadas.

La expresión *transferencia de energía* debe entenderse en términos generales como una generación de señal en la que el donante, por excitación por radiación electromagnética, generalmente luz, es capaz, por medios no radiativos, radiativos o intermedios, de transportar energía al aceptor, que eventualmente puede extinguir la señal del donante o aceptar la energía y generar una señal diferente. Un *donante* es un compuesto capaz de absorber energía, por ej. por radiación de excitación, y en estrecha proximidad a un aceptor o desactivador adecuado, donará la energía al aceptor o desactivador (mediante un mecanismo adecuado como la transferencia de energía de resonancia de Förster, FRET). El *aceptor* puede ser un compuesto orgánico coloreado, fluorescente o no fluorescente. También puede ser un compuesto organometálico, o una nanopera metálica, un punto cuántico, un nanopunto, o una nanopera que contiene compuestos que aceptan energía adecuada. Las tecnologías típicas, pero no limitativas, son varios tipos de FRET, reacciones de extinción y reacciones de canalización de oxígeno. La tecnología FRET de resolución temporal (TR-FRET) es una tecnología que emplea la diferencia entre el estado excitado de donante y

aceptor, por lo tanto, utiliza la resolución temporal (detección regulada) en la detección. Los ejemplos específicos de transferencia de energía son TR-FRET que utilizan lantánidos y sus quelatos, o perlas incrustadas con lantánido como donantes, que usan lantánidos que contienen cristales de conversión ascendente como aceptores, o perlas que contienen lantánido como aceptores finales en LOC.

5

Realizaciones preferidas de la invención

El marcado de antígenos para el ensayo de acuerdo con la invención depende del sistema de elección. Para los ensayos de tipo FRET y TR-FRET, la forma técnicamente más eficiente es marcar covalentemente los antígenos o sus fragmentos y el FBM con los respectivos conjuntos de donantes y aceptores. La cantidad total de marcados por antígeno o fragmentos y el FBM depende, p.ej., de su tamaño. Un mayor número de marcadores permite una buena proximidad de al menos un par de marcados en el complejo formado, a menos que el marcado bloquee los sitios epitópicos y evite la reacción.

10

Para la optimización práctica del ensayo, una alternativa es utilizar un procedimiento de marcado indirecto, empleando antígenos biotinilados y conjuntos de dos avidina/estreptavidinas marcadas con donantes y aceptores, respectivamente, o combinando biotina con otro par de unión (por ejemplo, hapteno anti-hapteno).

15

La forma preferida de usar la FRET en esta invención es usar la resolución temporal para distinguir la emisión del donante y del aceptor de la emisión activada de transferencia de energía creada. Al usar la resolución temporal, se puede mejorar la especificidad de la señal y también evitar todos los problemas de fondo relacionados con la muestra ambiental y los reactivos (Hemmilä I, Applications of fluorescence in immunoassays, Willey & Sons Ltd, Nueva York, 1991). Los pares de marcadores preferidos consisten en quelatos de Eu fluorescentes (ver, p. Ej. Hemmilä I y Mukkala V-M; Crit Rev Clin Lab Sci 2001; 38; 441-519, Mathis G y Bazin H, Lanthanide Luminescence, Springer, Heidelberg, pp 47-88) junto con aceptores adecuados, como la alofococianina, Cy-5, algunas rodaminas, AlexaFluor 647 o un producto similar de otras fuentes (HiLight, DyLight, Ulight, etc.) (Hemmilä I y Laitinen V, Lanthanide Luminescence, Springer, Heidelberg, pp.361-280). De manera similar, un par de marcadores preferido consiste en quelatos de terbio (Tb) fluorescentes y conjuntos de aceptores, tales como rodamina, fluoresceína, Cy-3. También se pueden usar como donantes nanocuentas compuestas de los quelatos mencionados anteriormente. Los aceptores pueden incluir puntos cuánticos, nanopuntos, nanopelotas, nanopelotas incrustadas con compuestos fluorescentes o de extinción, un fotosensibilizador, perlas incrustadas en quelatos, cristales de conversión ascendente, o nanopelotas que comprenden cualquiera de los mencionados anteriormente.

20

25

30

De manera similar, en el principio del ensayo LOC, un conjunto preferido de marcadores comprende perlas donadoras que contienen ftalocianina, y perlas aceptoras que contienen una reacción de quimioluminiscencia adecuada y quelatos de etilacetona Eu como aceptores, dichas perlas están fácilmente disponibles en PerkinElmer.

35

En muchos métodos de bioensayo preferidos de acuerdo con la invención, el anticuerpo soluble es un anticuerpo soluble humano. En algunos métodos de bioensayo preferidos de acuerdo con la invención, el anticuerpo soluble es un animal, excluyendo el anticuerpo humano soluble.

40

Un método típico de bioensayo de acuerdo con la invención comprende las etapas de

45

a) poner en contacto la muestra, el primer grupo y el segundo grupo para obtener una mezcla de reacción,

b) permitir que la mezcla de reacción reaccione,

c) excitar el donante de energía con radiación que tiene una longitud de onda de excitación, formando así un antígeno marcado excitado

50

d) detectar la emisión de radiación de

i) el aceptor resultante de la transferencia de energía del donante, de modo que una señal de emisión aumentada se correlaciona con un mayor nivel del primer anticuerpo soluble específico en la muestra, o

55

ii) el donante si se emplea un desactivador, de modo que una señal de emisión disminuida del donante se correlaciona con un mayor nivel de primer anticuerpo soluble específico en la muestra.

En muchos métodos de bioensayo preferidos de la invención, la muestra y el grupo que comprende el FBM se ponen en contacto en la etapa a), y se les permite reaccionar; y luego se añade el grupo, primero o segundo, que comprende el antígeno.

60

En algunos métodos de bioensayo preferidos de la invención, la etapa a) comprende dos fases consecutivas,

i) una primera fase en la que la muestra se pone en contacto con una inmunoglobulina de captura inmovilizada en la que el anticuerpo soluble de la muestra es capturado por dicha inmunoglobulina de captura, y posteriormente

65

ii) una segunda fase en la que dicho anticuerpo soluble capturado de dicha muestra se pone en contacto con el primer grupo y el segundo grupo para obtener la mezcla de reacción.

5 En algunos métodos de bioensayo preferidos de la invención, la etapa a) comprende la adición de un reactivo kosmotrópico, caotrópico, precipitante y/o desalante tal como, pero sin limitarse a, sulfato de amonio, polietilenglicol (PEG), disolvente orgánico, sal, urea, guanidina, ácida o base.

10 En algunos métodos de bioensayo preferidos de la invención, la detección de emisión se lleva a cabo al menos dos veces,

i) una vez cuando se incluye un agente desnaturalizante o caotrópico en la mezcla de reacción, y

ii) una vez cuando dicho agente desnaturalizante y/o caotrópico no esté incluido en la mezcla de reacción,

15 por lo que la diferencia en las emisiones se correlaciona con la avidéz del anticuerpo soluble, si está presente. En tales métodos de bioensayo, el agente desnaturalizante y/o caotrópico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en dodecil sulfato de sodio (SDS), urea, tiocianato, guanidina y dietilamina.

20 En los métodos de bioensayo preferidos de la invención, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina, secreción nasofaríngea, secreción broncoalveolar, líquido aspirado, líquido de lavado, líquido ocular, líquido pleural, exudado, ascitis, semen, bilis, derrames y cualquier combinación de los mismos; preferiblemente plasma, suero y líquido cefalorraquídeo.

25 En los métodos de bioensayo preferidos de la invención, el anticuerpo soluble se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas humanas A, D, E, G (incluidas las subclases 1, 2, 3 y 4) y M; y las correspondientes inmunoglobulinas de otras especies (por ejemplo, IgY se considera el equivalente aviar y reptiliano de IgG), correspondiendo preferiblemente al grupo que consiste en inmunoglobulinas humanas A, E, G (incluidas las subclases 1, 2, 3 y 4) y M.

30 En los métodos de bioensayo preferidos de la invención, el anticuerpo soluble se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos contra antígenos seleccionados de los grupos que consisten en antígenos microbianos, incluyendo antígenos bacterianos, parásitos, fúngicos y virales; antígenos exógenos; autoantígenos; alérgenos y antígenos tumorales.

35 En los métodos de bioensayo preferidos de la invención, el par de transferencia de energía es capaz de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). En tales métodos de bioensayo, el bioensayo es preferiblemente un ensayo FRET (TR-FRET) de resolución temporal o un ensayo FRET de excitación de dos fotones.

40 En algunos métodos de bioensayo preferidos de la invención, el ensayo es un ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOC).

45 En muchos kits preferidos de la presente invención, el anticuerpo soluble es un anticuerpo soluble humano. En algunos kits preferidos de la presente invención, el anticuerpo soluble es un animal, excluyendo el anticuerpo humano soluble.

50 En muchas realizaciones preferidas del kit de la presente invención, la relación entre la cantidad de donante del primer reactivo, o segundo reactivo, y la cantidad de aceptor, incluido el desactivador, del segundo reactivo o primer reactivo, respectivamente, es

i) al menos 10 %, preferiblemente al menos 90 %, y

ii) no más de 1.000 %, preferiblemente no más de 120 %, y

55 iii) lo más preferiblemente aproximadamente 100 %,

en el que una relación correspondiente al 100 % se obtiene mediante una cantidad equivalente de donante a aceptor, incluido el desactivador.

60 Ejemplos

Ejemplo 1

65 *Evaluación preliminar, un ensayo de TR-FRET homogénea (fase de solución) basado en proteína L para la detección de anticuerpos solubles*

Métodos

La proteína L recombinante se adquirió en Thermo Scientific (Pierce Protein Biology Products) y se marcó por separado con el QuickAllAssay Eu-chelate Protein Labelling Kit (BN products & Services Oy) y el Alexa Fluor® 647 (AF647) Protein Labelling Kit (Invitrogen). El marcado se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se solicitaron estreptavidina marcada con AF647 y Eu-quelato (AF647-SA y Eu-SA, respectivamente) a Invitrogen y PerkinElmer, respectivamente. La región única de la proteína de la cápside menor VP1 del parvovirus humano B19 (B19V) se expresó en *E. coli* como proteína de fusión GST (aquí denominada GST-VP1u), se purificó y se marcó de forma independiente con Eu (utilizando el QuickAllAssay Eu-chelate Protein Labelling Kit) de BN Products & Services Oy) y AF647 (utilizando el QuickAllAssay Eu-chelate Protein Labelling Kit de Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. GST-VP1u sirvió como antígeno para experimentos con anticuerpos anti-GST. El anticuerpo monoclonal (MAb) contra SA (anti-SA) (clon S3E11, 6,1 mg/ml) se adquirió en Thermo Scientific (Pierce Protein Biology Products). El anti-GST monoclonal era de Abcam Ltd (1 mg/ml) y la albúmina de suero bovino (BSA) sin IgG de Jackson ImmunoResearch Inc.

Los valores de TR-FRET se midieron con el fluorómetro Wallac Victor² (PerkinElmer) por excitación a 320 nm, seguido por un retraso de 70 μ s antes de registrar los recuentos fluorescentes durante 100 μ s con filtros de emisión de 615 nm (Eu) y 665 nm (AF647). Para tener en cuenta la emisión de Eu a 665 nm, los valores medidos de TR-FRET se normalizaron de acuerdo con la siguiente ecuación: $AF647N = AF647 \cdot k \cdot Eu$, donde $AF647N$ = recuentos fluorescentes de AF647 normalizados, $AF647$ = recuentos de A647 no normalizados (a 655 nm), k = emisión de Eu a 665 nm/Eu (a 615 nm) y Eu = recuentos fluorescentes de Eu (a 615 nm). Se encontró que la constante k es independiente de la concentración de Eu-SA, por lo que se usó un valor de 0,001342 (promedio de los recuentos de AF647 a Eu en diluciones de Eu-SA de 1:1.000 a 1:8.000) en los cálculos posteriores.

El protocolo básico para todos los ensayos de TR-FRET fue el siguiente: después de que los componentes de la reacción se diluyeron en solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 pM [pH 7,4]) complementado con BSA al 0,2 % (TBS-BSA), la proteína L se mezcló 1:1 con MAb, se incubó durante 15 min a +37 °C y se mezcló 1:1 con el antígeno marcado. El volumen de reacción final (20 μ l/pocillo) se pipeteó en una microplaca de 384 pocillos (ProxiPlate-384 Plus F, Black 384-Shallow Well Microplate de PerkinElmer).

Resultados

Para evaluar las cantidades óptimas de proteína L y antígenos respecto a las concentraciones de anticuerpos, valoramos los anticuerpos (anti-GST y anti-SA a 50 nM – 3,1 nM) frente a concentraciones constantes de los antígenos (SA y GST marcados con Eu o AF y -VP1u a 20 nM) y proteína L (marcada con Eu- o AF a 20 nM). En los experimentos con MAb anti-SA, el MAb anti-GST sirvió como control, y viceversa. Con la proteína L marcada con AF y los antígenos marcados con Eu, tanto la estreptavidina (Figura 4) como GST (Figura 7) indujeron señales TR-FRET dependientes de la dosis con las concentraciones de anticuerpos. Sin embargo, cuando el marcador del donante (Eu) estaba en la proteína L, AF-SA (Figura 8) indujo respuestas TR-FRET notablemente más altas que AF-GST-VP1u (Figura 7). Las señales de TR-FRET cercanas al fondo medido se detectaron en presencia (o ausencia) de los anticuerpos de control en ambas configuraciones experimentales (AF-L y Eu-L, Figuras 6-9).

Ejemplo 2

El ensayo TR-FRET basado en la proteína L se basa en la unión simultánea del antígeno y la proteína L a un único fragmento Fab

Métodos

El MAb anti-SA (S3E11) se fragmentó usando papaína como anteriormente (Saraheimo et al. PLOS ONE 2013, 8(5), e62739), brevemente, se diluyó papaína 25 mg/ml, 40 U/mg, (P3125, Sigma-Aldrich) 1 a 10 en L-cisteína 100 mM (en PBS, pH 7,4) y se preactivó durante 15 min de incubación a temperatura ambiente. El MAb anti-SA se diluyó de 1 a 3 en un tampón de reacción (L-cisteína 10 mM y EDTA 10 mM en PBS) produciendo una solución de anticuerpo de 2 mg/ml. La papaína preactivada se diluyó adicionalmente 1 a 100 en tampón de reacción. La reacción de escisión se fijó mezclando 1 parte de solución de papaína con 1 parte de anticuerpo diluido. La escisión se llevó a cabo a 37 °C durante 4 h, después de lo cual la papaína se inactivó mediante la adición de yodoacetamida 0,3 M (en PBS) para alcanzar una concentración final de 30 mM. Se usó la adsorción con Gammabind™ Plus Sepharose™ (GE Healthcare) para eliminar las moléculas de IgG intactas y para separar aproximadamente los productos de escisión (partes Fab y Fc) entre sí. Brevemente, las perlas Gammabind™ se equilibraron a PBS+ (PBS con NaCl 150 mM adicional y 0,01 % de Tween 20), se mezclaron con la mezcla de reacción y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Las perlas se sedimentaron mediante centrifugación (500 xg, 2 min) y se recuperó el sobrenadante. Las perlas se lavaron dos veces con 150 μ l de PBS+ y los sobrenadantes resultantes se combinaron junto con el sobrenadante inicial. La mezcla de sobrenadante que contenía los fragmentos Fab y la papaína inactivada se concentró y el tampón se intercambió por PBS utilizando unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra de 10 kDa (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del producto.

Resultados

Se diluyeron en serie los fragmentos Fab y anticuerpos anti-SA y se mezclaron por separado con las proteínas L y SA marcadas. Como se muestra en la Figura 10, los fragmentos Fab producen un aumento dependiente de la dosis en las señales TR-FRET, análogamente a las señales inducidas por el MAb. Las intensidades de señal inducidas por los fragmentos Fab fueron aproximadamente la mitad de las inducidas por el MAb, lo que refleja la menor concentración de los fragmentos Fab en comparación con la concentración de los MAb. Los resultados confirman que TR-FRET puede originarse a partir de un único fragmento Fab.

Ejemplo 3

Comparación con el ensayo de puente FRET

Métodos

El ensayo para la aplicación basada en proteína L fue como se describe anteriormente. Las concentraciones de los MAbs correspondientes (anti-SA y anti-GST) y de la proteína L marcada con AF se variaron, mientras que las de los antígenos (Eu-SA y Eu-GST-VP1u) se mantuvieron constantes (10 nM). Las concentraciones de anticuerpos variaron de 25 nM a 3,1 nM, mientras que la concentración de proteína L fue siempre dos veces mayor que la del anticuerpo (50 nM a 6,3 nM). Para el ensayo de puente FRET, la mezcla de reacción final (20 μ l) consistió en 10 μ l de la mezcla de antígenos y 10 μ l de solución de anticuerpo que se dispensaron en una microplaca de 384 pocillos. Los antígenos y los anticuerpos se diluyeron en TBS suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) 0,2 %.

Resultados

Ambos antígenos, SA y GST-VP1u, indujeron señales TR-FRET más altas en el ensayo de proteína L (Figura 4 frente a Figura 5, respectivamente). De hecho, el antígeno GST-VP1u no indujo ninguna señal en el ensayo de puente FRET (Figura 5), lo que refuerza nuestra hipótesis anterior (Saraheimo et al. PLOS ONE 2013, 8 (5), e62739) de que en el ensayo de puente FRET, la multimericidad del antígeno es beneficiosa. Anteriormente también habíamos observado que la mayor parte de la actividad de TR-FRET deriva de inmunocomplejos de gran tamaño, cuya formación podría en realidad estar inhibida por antígenos monoméricos. En el ensayo de proteína L, SA indujo señales TR-FRET dos veces más altas en comparación con GST-VP1u. Por lo tanto, parece posible que también en el enfoque de la proteína L, la multimericidad del antígeno sea beneficiosa, aunque no sea obligatoria.

Ejemplo 4

La TR-FRET homogénea (fase de solución) basada en proteína L es aplicable para la detección de la respuesta serológica, prueba de evaluación preliminar

Métodos

El virus Puumala (PUUV), un patógeno zoonótico, puede inducir una leve fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) cuando se transmite al hombre. La infección induce una fuerte respuesta serológica (tanto la IgM como la IgG están prácticamente siempre presentes en el momento del diagnóstico) contra la proteína de la nucleocápside (N) de PUUV. La proteína N de PUUV recombinante se adquirió en Reagena Ltd (Finlandia) y se marcó con Eu utilizando el QuickAllAssay Eu-chelate Protein Labelling Kit (BN products & Services Oy) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína L recombinante marcada con AF647 se preparó como se describe en el ejemplo 1. Se configuraron dos formatos de ensayo, representados esquemáticamente en la figura 2 y la figura 11, para la evaluación del rendimiento del ensayo. El ensayo representado en la figura 2 está diseñado para detectar tanto la IgM como la IgG contra un antígeno dado y, en realidad, todas las clases de Ig específicas de antígeno. El ensayo representado en la figura 11 está diseñado para detectar clases de Ig distintas de IgG, principalmente IgM. Antes de realizar el ensayo representado en la figura 11, el analito (la solución a estudiar, el suero en este ejemplo) se mezcla con el reactivo GullSORB (Meridian Bioscience Inc.) y se eliminan las IgG por centrifugación. Los componentes del ensayo, la proteína L marcada con AF647 y la proteína PUUV N marcada con Eu, se diluyeron en TBS-BSA y se dispensaron en una microplaca de 384 pocillos (ProxiPlate-384 Plus F; Black 384-Shallow-Well Microplate de PerkinElmer), y se añadieron 5 μ l de dilución de suero. Después de 30 minutos a 37 °C, los valores de TR-FRET se midieron con el fluorómetro Wallac Victor² (PerkinElmer) y los valores se normalizaron como se describe en el ejemplo 1. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Después de las optimizaciones, se utilizaron 25 nM de proteína L y 5 nM de PUUV-N con una dilución de suero de 1/100. Las señales TR-FRET de las muestras se compararon con la señal TR-FRET inducida por una mezcla de sueros de control negativo (el promedio del valor normalizado de TR-FRET dividido por el promedio del valor normalizado de TR-FRET del control negativo, una mezcla de control PUUV negativo), y los valores de prueba se expresaron como números enteros.

Resultados

5 Evaluamos la prueba estudiando 211 muestras de suero (tabla 1): 61 agudas, 27 de convalecencia/infección pasada y 123 seronegativos. Usando un panel de suero bien caracterizado, establecimos el umbral de ensayo TR-FRET de la proteína L en un nivel de señal de 3 veces sobre el fondo (los valores ≥ 3 veces la señal de TR-FRET obtenida con una mezcla de suero negativo se consideran positivos). Con la configuración de la prueba descrita en la figura 2, 59 de las 61 muestras de fase aguda y 14 de las 27 infecciones pasadas se identificaron como PUUV seropositivas (tabla 1 y figura 12). Siete de las 123 muestras seronegativas de PUUV dieron un resultado falso positivo en el ensayo de proteína L TR-FRET (tabla 1 y figura 12). Cuando las muestras de suero se trataron previamente con GullSORB, 58 de las 61 fases agudas y ninguna de las muestras pasadas y seronegativas dieron un resultado positivo en el ensayo TR-FRET de la proteína L (tabla 1 y figura 13). Estos resultados proporcionan la prueba de evaluación preliminar para la aplicabilidad del ensayo TR-FRET de la proteína L en solución para la detección de anticuerpos utilizando suero humano como material de muestra.

15

Tabla 1 Resultados de la prueba de 211 muestras de suero

Resultado de la prueba	Aguda (IgG+ e IgM+, N = 61)		Pasada (IgG+ e IgM-, N = 27)		Negativa (IgG- e IgM-, N = 123)		
	Ensayo de la proteína L	Referencia	Ensayo de la proteína L	Referencia	Ensayo de la proteína L	Referencia	
Sin eliminación de IgG (config. Fig. 2)	+	59	61	14	27	7	0
	-	2	0	13	0	116	123
Tras eliminación de IgG (config. Fig. 11)	+	58	ND	0	ND	0	ND
Después de IgG	-	3	ND	27	ND	123	ND

Ejemplo 5*Ensayo de canalización de oxígeno luminiscente*

20 El formato de ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOC) se puede aplicar a la presente invención, por ejemplo, obteniendo perlas donadoras yceptoras recubiertas en la superficie con estreptavidina disponible en PerkinElmer (www.perkinelmer.fi), y antígeno marcado con biotina. El lector de placas Envision disponible en PerkinElmer se puede usar para medir la señal producida por la excitación de las perlas a 613 nm.

Otras realizaciones preferidas

25 Se apreciará que los métodos y kits de la presente invención se pueden incorporar en forma de una variedad de realizaciones, solo algunas de las cuales se describen en la presente memoria. Será evidente para el experto en la materia que existen otras realizaciones y no se apartan del espíritu de la invención. Por lo tanto, las realizaciones descritas son ilustrativas y no deben interpretarse como restrictivas.

30

REIVINDICACIONES

1. Un método de bioensayo en el que la presencia de un anticuerpo soluble específico de un animal, incluido el ser humano, en una muestra que comprende un fluido corporal de dicho animal se determina cualitativamente y/o cuantitativamente, empleando dicho método
- 5 a) un primer grupo que incluye un donante de energía, y
b) un segundo grupo que incluye un aceptor de energía o desactivador,
- 10 en el que
- i) dicho primer grupo o dicho segundo grupo comprende un antígeno de dicho anticuerpo soluble, y
ii) dicho segundo grupo o dicho primer grupo, respectivamente, comprende un resto de unión de resto de unión al antígeno (Fab) (FBM) acoplado a dicho donante de energía, o dicho aceptor de energía, incluido el desactivador,
- 15 respectivamente, siendo dicho resto capaz de unirse a una región Fab de anticuerpos de dicho animal,
- en el que dicho donante de energía y dicho aceptor de energía o desactivador forman un par de transferencia de energía capaz de transferir energía; y
el FBM se selecciona del grupo que consiste en proteína L, proteína L recombinante, proteína de unión a Ch1 o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig, preferiblemente el FBM es una proteína L recombinante o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig.
- 20 2. El método de bioensayo según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el anticuerpo soluble es un anticuerpo soluble humano, o un anticuerpo soluble animal, excluyendo un anticuerpo humano.
- 30 3. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de
- a) poner en contacto la muestra, el primer grupo y el segundo grupo para obtener una mezcla de reacción,
b) permitir que la mezcla de reacción reaccione,
c) excitar el donante de energía con radiación que tiene una longitud de onda de excitación, formando así un antígeno marcado excitado
d) detectar la emisión de radiación de
- 35 i) el aceptor resultante de la transferencia de energía del donante, de modo que una señal de emisión aumentada se correlaciona con un mayor nivel del anticuerpo soluble específico en la muestra, o
ii) el donante si se emplea un desactivador, de modo que una señal de emisión disminuida del donante se correlaciona con un mayor nivel del anticuerpo soluble específico en la muestra.
- 40 4. El método de bioensayo de la reivindicación 3, **caracterizado por que** en la etapa a), la muestra y el grupo que comprende el FBM se ponen en contacto y se les permite reaccionar; y a continuación se añade el grupo, primero o segundo, que comprende el antígeno.
- 45 5. El método de bioensayo de la reivindicación 3 o 4, **caracterizado por que** la etapa a) comprende dos fases consecutivas,
- 50 i) una primera fase en la que la muestra se pone en contacto con una inmunoglobulina de captura inmovilizada en la que el anticuerpo soluble de la muestra es capturado por dicha inmunoglobulina de captura, y a continuación
ii) una segunda fase en la que dicho anticuerpo soluble capturado de dicha muestra se pone en contacto con el primer grupo y el segundo grupo para obtener la mezcla de reacción.
- 55 6. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado por que** la etapa a) comprende la adición de un reactivo kosmotrópico, caotrópico, precipitante y/o desalante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en sulfato de amonio, polietilenglicol (PEG), disolvente orgánico, sal, urea, guanidina, ácido y base.
- 60 7. El método de bioensayo según la reivindicación 6, **caracterizado por que** la detección de emisiones se realiza al menos dos veces.
- i) una vez cuando se incluye un agente desnaturalizante y/o caotrópico en la mezcla de reacción, y
ii) una vez cuando dicho agente desnaturalizante y/o caotrópico no está incluido en la mezcla de reacción,
- 65

de modo que la diferencia en las emisiones se correlaciona con la avidéz del anticuerpo soluble, si está presente.

8. El método de bioensayo según la reivindicación 7, **caracterizado por que** el agente desnaturalizante y/o caotrópico se selecciona del grupo que consiste en dodecilsulfato de sodio (SDS), urea, tiocianato, guanidina y dietilamina.

9. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, el anticuerpo soluble se selecciona del grupo que consiste en inmunoglobulinas humanas A, D, E, G, incluidas las subclases 1, 2, 3 y 4, y M; y las correspondientes inmunoglobulinas de otras especies; preferiblemente correspondiente al grupo que consiste en inmunoglobulinas humanas A, E, G, incluidas las subclases 1, 2, 3 y 4, y M.

10. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, el anticuerpo soluble se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos contra antígenos seleccionados de los grupos que consisten en antígenos microbianos, que incluyen antígenos bacterianos, parasitarios, fúngicos y virales; antígenos exógenos; autoantígenos; alérgenos y antígenos tumorales.

11. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el par de transferencia de energía es capaz de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), preferiblemente el bioensayo es un ensayo de FRET de resolución temporal (TR-FRET) o un ensayo de FRET de excitación de dos fotones.

12. El método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** el ensayo es un ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOC).

13. Un kit para un método de bioensayo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicho kit comprende

- i) un primer reactivo, que comprende un marcador donante de energía,
- ii) un segundo reactivo que comprende un marcador aceptor de energía o marcador desactivador,

en el que

- a) dicho primer reactivo o dicho segundo reactivo comprende un antígeno de un anticuerpo soluble de un animal, incluido el ser humano, y
- b) dicho segundo reactivo o dicho primer reactivo, respectivamente, comprenden un resto de unión a Fab (FBM) acoplado a dicho donante de energía, o dicho aceptor de energía o desactivador, respectivamente, siendo dicho FBM capaz de unirse a una región Fab de anticuerpos de dicho animal,

en el que dicho marcador de donante y dicho marcador de aceptor o marcador desactivador forman un par de transferencia de energía capaz de transferir energía, preferiblemente transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), y lo más preferiblemente FRET de resolución temporal (TR-FRET), FRET de excitación de dos fotones (TP-FRET) o canalización de oxígeno luminiscente (LOC); y

el FBM se selecciona del grupo que consiste en proteína L, proteína L recombinante, proteína de unión a Ch1 o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig, preferiblemente el FBM es una proteína L recombinante o al menos un dominio o fragmento de la misma con la capacidad de unirse a la cadena ligera, a la cadena pesada, a ambas, la ligera y la pesada, a la interfaz entre la cadena ligera y la cadena pesada, o a la superficie formada por la cadena ligera y la cadena pesada en la región Fab de la molécula de Ig.

14. El kit según la reivindicación 13 **caracterizado por que** el anticuerpo soluble es un anticuerpo soluble humano, o un animal, excluyendo el anticuerpo soluble humano.

15. El kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado por que** la relación entre la cantidad de donante del primer reactivo, o segundo reactivo, y la cantidad de aceptor, incluido el desactivador, del segundo reactivo o primer reactivo, respectivamente, es

- i) al menos 10 %, preferiblemente al menos 90 %, y
- ii) no más de 1.000 %, preferiblemente no más de 120 %, y
- iii) lo más preferiblemente aproximadamente 100 %,

en el que una relación correspondiente al 100 % se obtiene mediante una cantidad equivalente de donante a aceptor, incluido el desactivador.

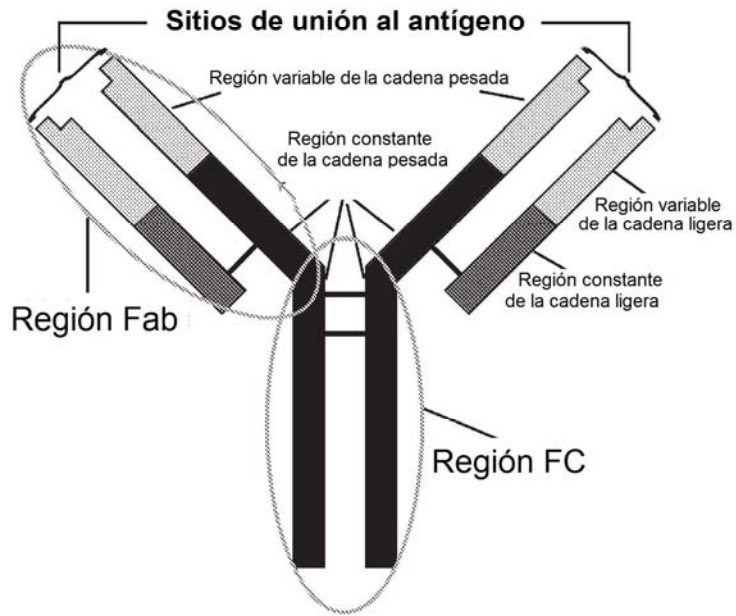


Figura 1

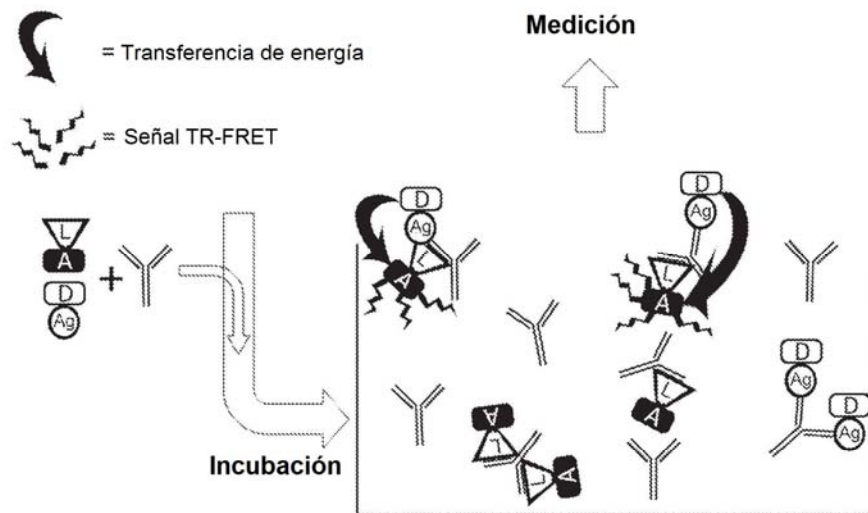


Figura 2

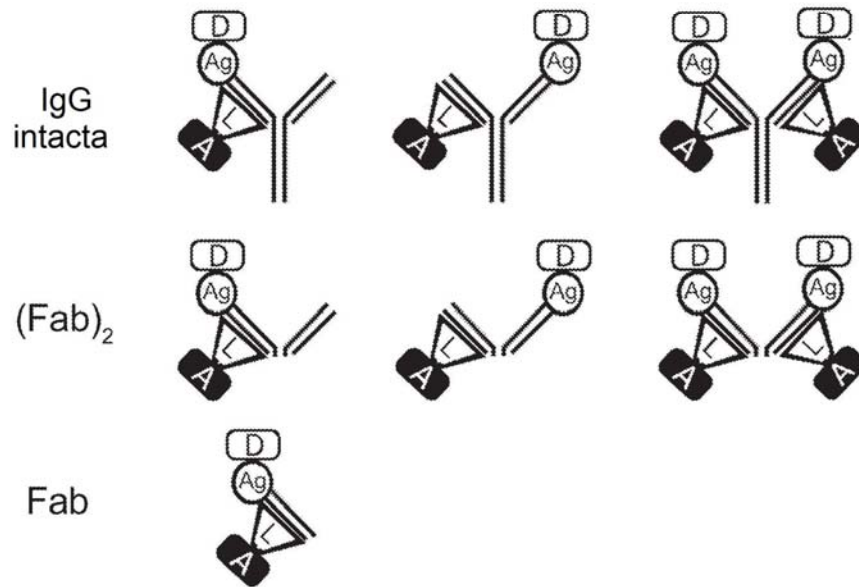


Figura 3

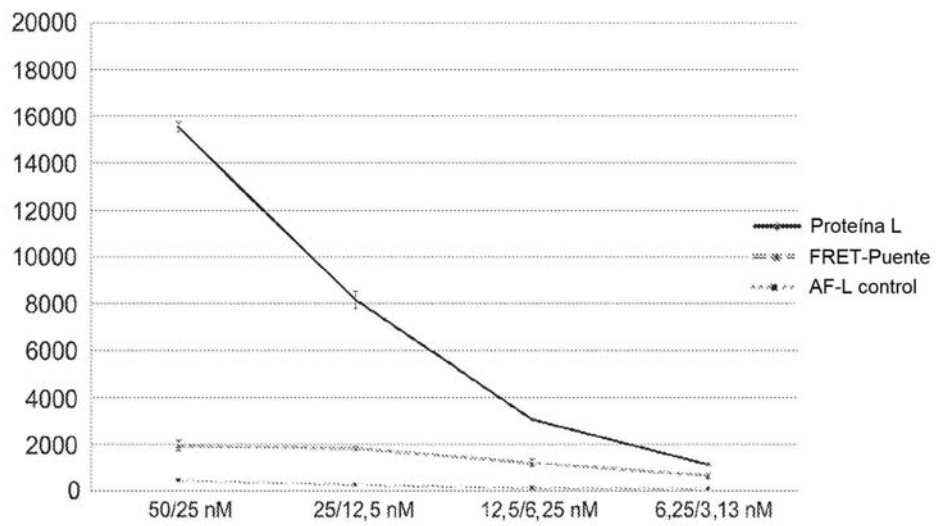


Figura 4

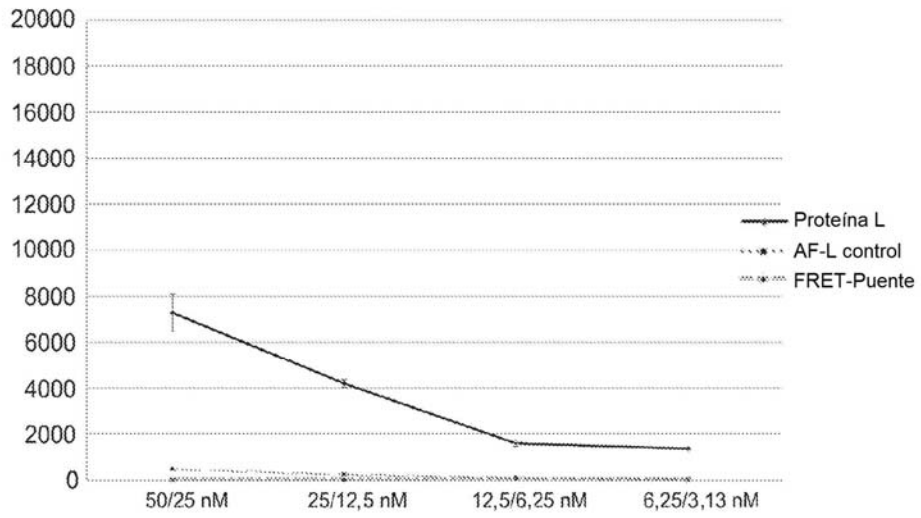


Figura 5

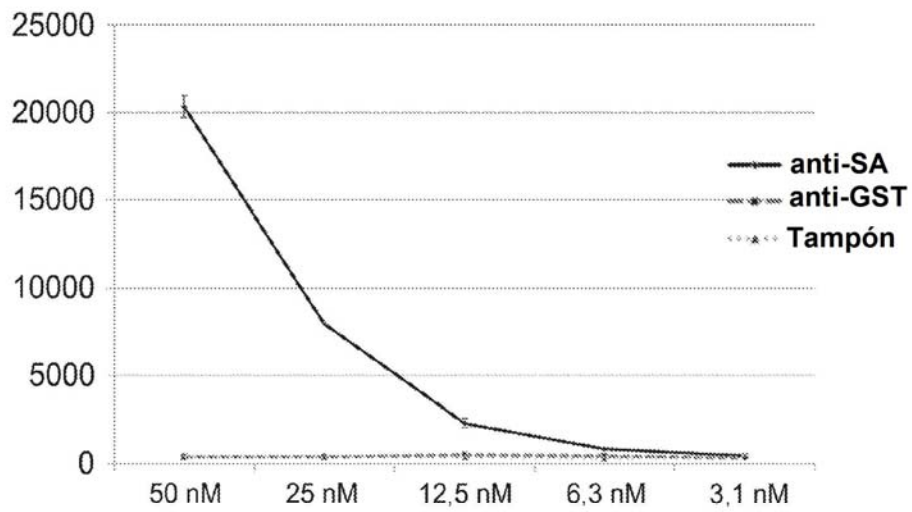


Figura 6

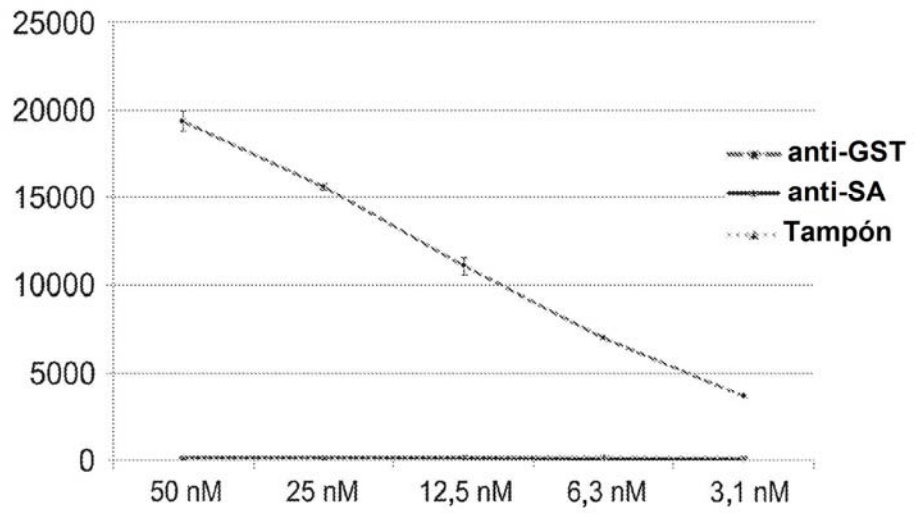


Figura 7

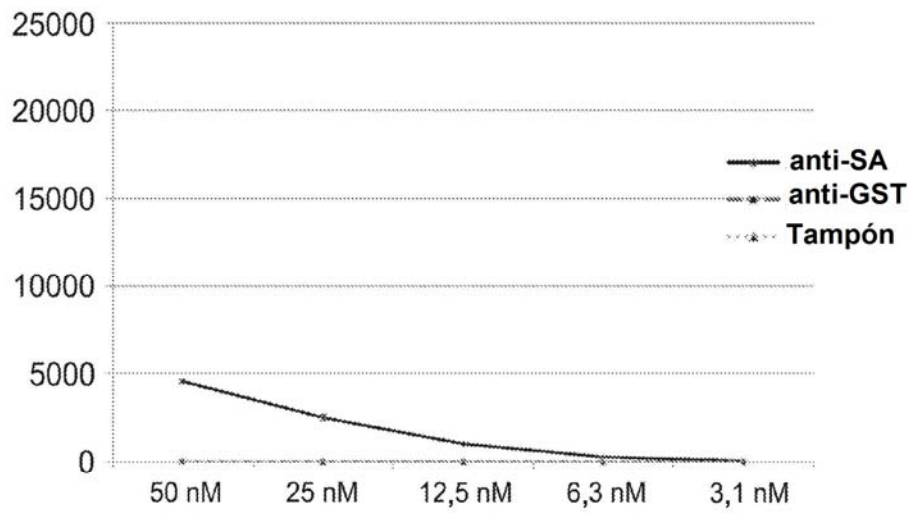


Figura 8

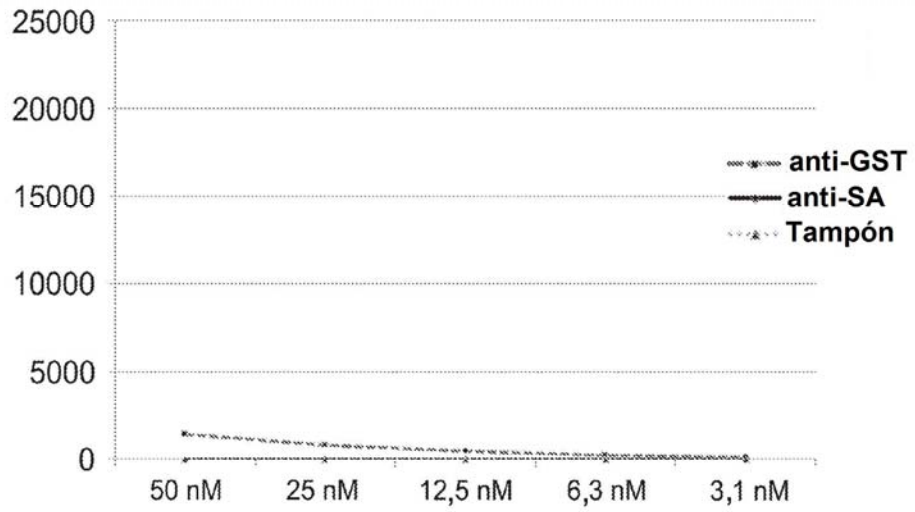


Figura 9

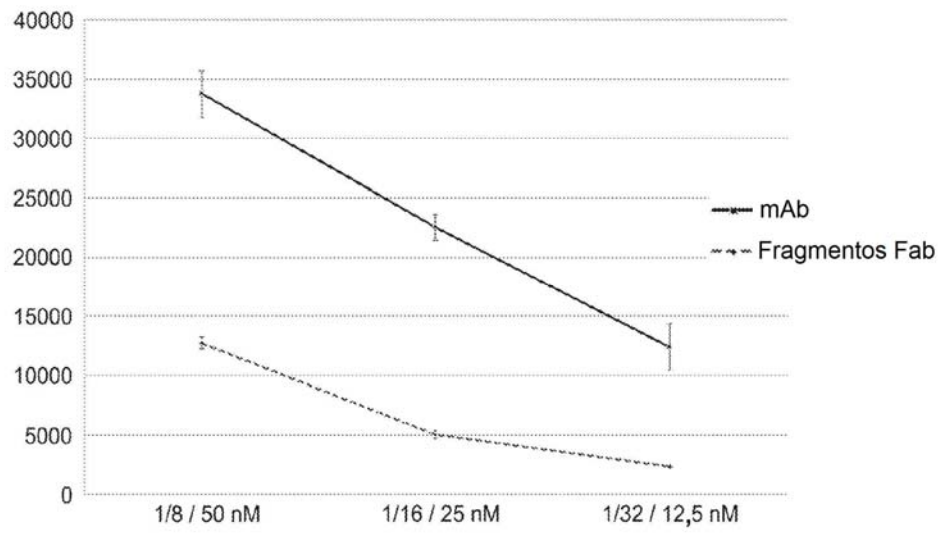


Figura 10

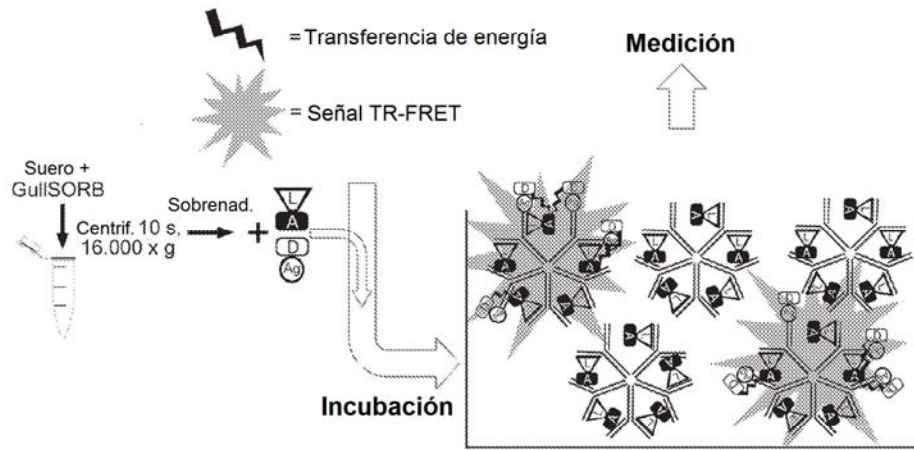


Figura 11

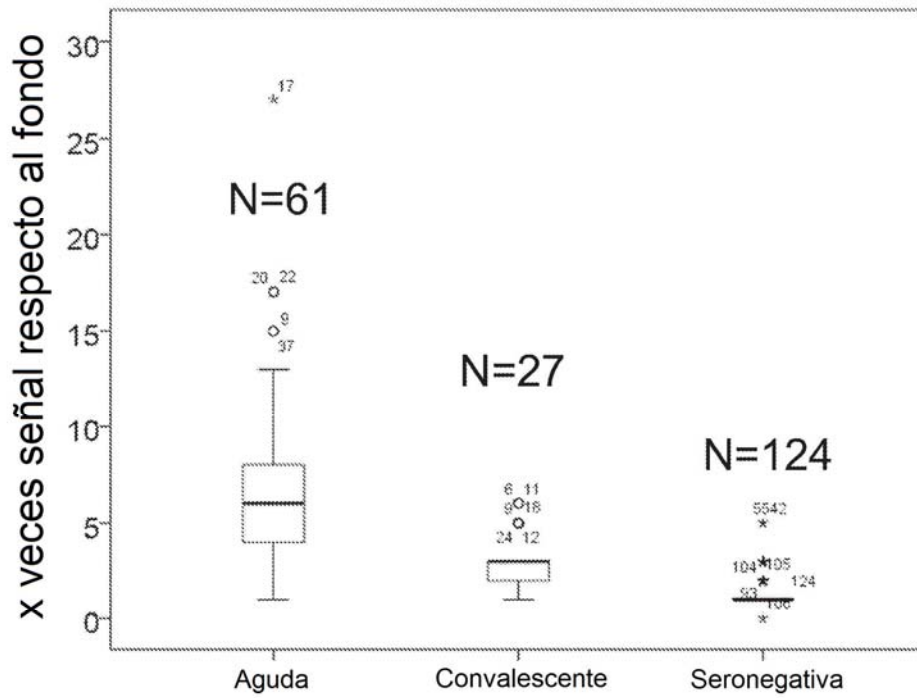


Figura 12

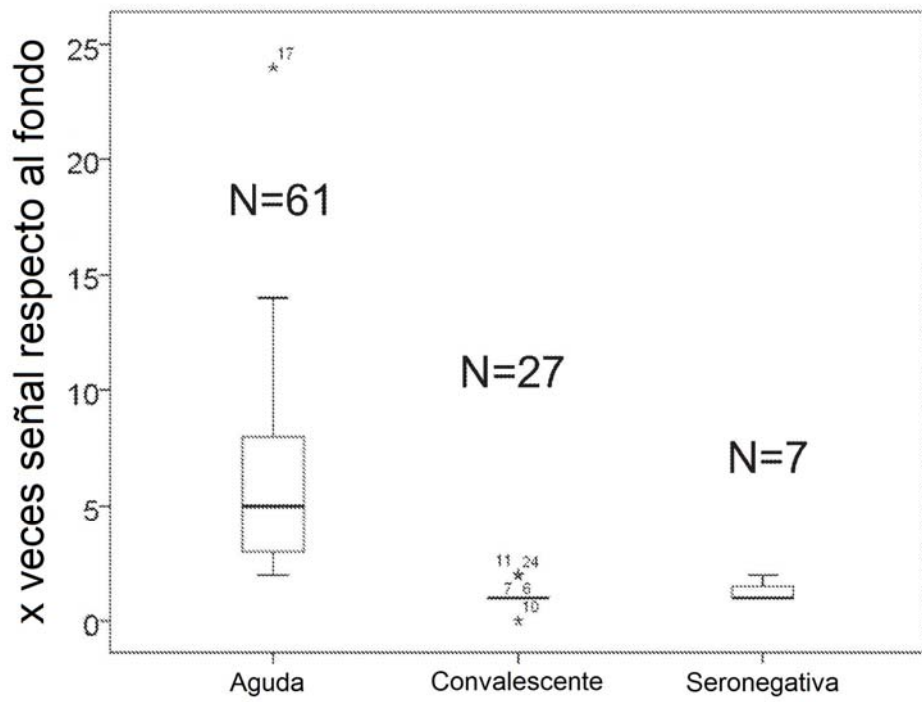


Figura 13