

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 792**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2012 PCT/US2012/064263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2012 E 12848432 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2776833**

54 Título: **Procedimientos de ensayo asistidos por coagente de unión**

30 Prioridad:

11.11.2011 US 201161558537 P

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

19.02.2019

73 Titular/es:

**GLEZER, ELI N. (50.0%)
13746 Durango Drive
Del Mar, California 92014, US y
SIGAL, GEORGE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GLEZER, ELI N. y
SIGAL, GEORGE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 700 792 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

Procedimientos de ensayo asistidos por coagente de unión.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional US nº 61/558.537, presentada el 11 de noviembre de 2011.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para llevar a cabo inmunoensayos. Los procedimientos resultan particularmente adecuados para reducir la reactividad cruzada entre especies utilizadas en inmunoensayos, por ejemplo anticuerpos y antígenos.

15

Antecedentes de la invención

Se ha desarrollado una cantidad sustancial de literatura referida a técnicas que utilizan reacciones de unión, por ejemplo Reacciones de antígeno-anticuerpo, hibridación de ácidos nucleicos y reacciones de receptor-ligando, para la medición precisa de analitos de interés en muestras. El alto grado de especificidad en muchos sistemas de unión bioquímica ha conducido a muchos procedimientos y sistemas de ensayo valiosos en una diversidad de mercados, incluyendo la investigación básica, el diagnóstico humano y veterinario, la monitorización medioambiental y los ensayos industriales. La presencia de un analito de interés puede medirse mediante la medición directa de la participación del analito en una reacción de unión. En algunos enfoques, esta participación puede indicarse mediante la medición de un marcaje observable unido a uno o más de los materiales de unión.

Uno de los retos de las mediciones de inmunoensayo es el potencial de reactividad cruzada entre anticuerpos y analitos. La reactividad cruzada puede conducir a fondos más altos, menor sensibilidad y a influir sobre la detección de un analito de entre una pluralidad. En un inmunoensayo multiplexado con N anticuerpos de captura y N anticuerpos de detección, existen NxN potenciales interacciones de anticuerpos (incluyendo interacciones de unión no específicas). Por lo tanto, en un ensayo 25-plexado, existen 625 posibles interacciones. Aunque los anticuerpos típicamente son altamente específicos para un analito particular, las interacciones no deseadas son comunes y deben eliminarse mediante cribado al formular un panel de ensayo multiplexado. Descubrir anticuerpos que funcionan bien en un formato multiplexado resulta crecientemente difícil a medida que se incrementa el grado de multiplexación.

El documento nº WO 2010/059820 (A1) se refiere a un procedimiento para detectar una diana que comprende un epítipo repetido.

El documento US 2010/261292 (A1) se refiere a procedimiento para llevar a cabo ensayos de unión en fase sólida. Un ejemplo es un procedimiento de ensayo que presenta una especificidad de analito mejorada en donde la especificidad está limitada por la presencia de interacciones de unión no específica.

Heyduk *et al.*, in *Anal. Chem.* 80(13):5152-5159, 2008 ("Molecular Pincers: Antibody-Based Homogeneous Protein Sensors"), describe un diseño homogéneo de sensor de proteínas a base de anticuerpos (pinzas moleculares) que permite la detección rápida y sensible de una proteína específica en solución.

El documento US 2004/121382 (A1) se refiere a procedimientos y composiciones que se proporcionan para la detección de analitos, tales como las fracciones de superficie celular, preferentemente en ensayos multiplexados, de manera que pueden someterse a ensayo simultáneamente múltiples analitos.

El documento WO 2009/067009 (A1) se refiere a la detección entre otras de proteínas de fusión específicas de tumor e interacciones entre proteínas.

En un formato de inmunoensayo de tipo sándwich multiplexado, la especificidad de analito es proporcionada por el anticuerpo de captura. Tal como se muestra en la figura 1(a), en el caso de que el anticuerpo de captura (unido a una superficie) y el anticuerpo de detección marcado se unan cada uno al analito A, se detecta A en el ensayo. Sin embargo, tal como se muestra en las figuras 1(B)-(d), pueden resultar interacciones no deseadas entre los anticuerpos de captura y detección (1(b)), el anticuerpo de captura y analito B (1(c)) o los anticuerpos de captura y detección y un anticuerpo adicional presente en la muestra (1(d)). En el caso de que un anticuerpo de captura reaccione cruzadamente con otra especie en la muestra, por ejemplo tal como se muestra en la figura 1(b)-(d), la señal resultante puede interpretarse erróneamente como presencia del analito diana, rindiendo un falso resultado positivo.

Además, las matrices complejas, tales como suero/plasma humano y los lisados celulares, pueden contener moléculas o complejos moleculares que entrecruzarán anticuerpos de captura con anticuerpos de detección.

Esto resulta particularmente problemático debido a que el efecto es impredecible (al contrario que la reactividad cruzada de anticuerpo-anticuerpo) y puede conducir a mediciones falsamente elevadas de un analito particular. Un ejemplo de una clase de reactividad cruzada mediada por matriz son los anticuerpos humanos antirratón (conocido como efecto HAMA) u otros anticuerpos humanos antianimal. En el caso de que se encuentren presentes anticuerpos antirratón en el suero humano, pueden unirse a anticuerpos derivados del ratón que se utilizan típicamente en inmunoensayos y potencialmente forman un puente entre los anticuerpos de captura y de detección, imitando falsamente la presencia de un analito. Aunque este problema es relevante en inmunoensayos de analitos individuales, resulta exacerbado por un factor de N² en inmunoensayos multiplexados, en los que N anticuerpos de detección pueden ser puenteados por N anticuerpos de captura.

Sumario de la invención

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona, según su primera forma de realización, un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en la que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en la que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dichos primer y segundo reactivos de unión se sitúan próximos entre sí mediante dichos primer y segundo agentes de enlace, respectivamente unidos a cada uno de los reactivos de unión, en donde una energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para unir establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de la primera y segunda regiones de unión al analito, y
- (b) medir la cantidad de dicho analito a dicho analito unido a dicho soporte sólido.

La primera forma de realización se presenta en la reivindicación 1, tal como se adjunta en la presente memoria. La presente invención proporciona además, según su segunda forma de realización, un kit para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende:

- (a) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y
- (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en donde la energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para unir establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de la primera y segunda regiones de unión al analito. La segunda forma de realización se presenta en la reivindicación 3, tal como se adjunta en la presente memoria.

Las variantes preferidas de las primera y segunda formas de realización anteriormente mencionadas se presentan en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Aspectos adicionales de la exposición de la invención

La exposición de la invención proporciona además un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo

bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (b) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

5 En un aspecto alternativo, la exposición de la invención proporciona además un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, (b) poner en contacto la
10 mezcla formada en la etapa (a) con un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (b) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

20 En un aspecto, la exposición de la invención incluye un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, e (iii)
25 una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (b) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

Todavía adicionalmente, la exposición de la invención incluye un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con (i) una
35 superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (a) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito, (b) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (b) con una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto (c) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (d) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

Además, la exposición de la invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, en el que dicha etapa de puesta en contacto (a) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera región de unión se une a dicho analito, (b) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (a) con un segundo reactivo de unión que comprende una segunda
55 región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha segunda región de unión se une a dicho analito, (c) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (b) con una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (c) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (d) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

65 También se encuentra contemplada por la exposición de la invención un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos que comprende: (a) poner en contacto una muestra que

comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden cada uno una primera región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se unen a uno o más primeros agentes de enlace, comprendiendo cada uno una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) uno o más segundos reactivos de unión, comprendiendo cada uno una segunda región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se une a uno o más segundos agentes de unión, comprendiendo cada uno una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión que se unen a dichos analitos y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (c) medir la cantidad de dichos analitos unida a dicho soporte sólido.

La exposición de la invención proporciona además un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se unen a uno o más primeros agentes de enlace, comprendiendo cada uno una primera secuencia oligonucleotídica, (b) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (a) con uno o más segundos reactivos de unión, comprendiendo, cada uno, una segunda región de unión que se une a uno o más de dichos analitos, en la que cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se une a uno o más segundos agentes de enlace, comprendiendo cada uno una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (c) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

Alternativamente, entre los procedimientos de la exposición de la invención se incluyen: (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden cada uno una primera región de unión que se une a dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, e (iii) una o más secuencias oligonucleotídicas de puente, cada una de las cuales comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en donde la primera y segunda regiones de unión se unen a dichos analitos y dichas secuencias oligonucleotídicas de puente se hibridan con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (b) medir la cantidad de dichos analitos unida a dicho soporte sólido.

También se encuentra contemplada en la exposición de la invención un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en los que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a dichos analitos, en los que cada uno de dichos primeros reactivos de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) uno o más segundos reactivos de unión cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dichos cada uno de uno o más segundos reactivos de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (a) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dichos analitos, (b) se pone en contacto la mezcla formada en la etapa (b) con una o más secuencias oligonucleotídicas de puente cada una de las cuales comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto (c) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica, y (c) se mide la cantidad de dichos analitos unidos a dicho soporte sólido.

También se encuentra contemplada en la exposición de la invención un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a dichos analitos, en la que cada uno de dichos primeros reactivos de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, en la

que dicha etapa de puesta en contacto (a) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera región de unión se une a dichos analitos, (b) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (a) con uno o más segundos reactivos de unión cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dichos analitos, en los que cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha secuencia segunda región de unión se une a dichos analitos, (c) se pone en contacto la mezcla formada en la etapa (b) con una o más secuencias oligonucleotídicas de puente que comprenden una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto (c) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas uno o más secuencias oligonucleotídicas de puente se hibridan con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y (d) se mide la cantidad de dichos analitos unida a dicho soporte sólido.

La presente exposición contempla además kits para llevar a cabo un ensayo de unión, que comprenden: (a) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y (b) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de unión que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica.

Además, los kits de la exposición de la invención pueden comprender además una superficie sólida, que incluye:

- (i) un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica,
- (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, y
- (iii) una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica.

Además, los kits de la presente exposición están configurados para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos y comprenden: (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se une a uno o más primeros agentes de unión, cada uno de los cuales comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se une a uno o más segundos agentes de enlace, cada uno de los cuales comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en los que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica.

Otro aspecto de un kit configurado para llevar a cabo un ensayo de unión para una pluralidad de analitos según la exposición de la invención incluye: (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se unen a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica,

- (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en los que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, y
- (iii) una o más secuencias oligonucleotídicas de puente cada una de las cuales comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1(a)-(d) representan diversas interacciones entre un anticuerpo de captura unido a un soporte sólido y una o más especies que pueden encontrarse presentes en una muestra biológica que pueden

conducir a interacciones de unión no deseadas y señales de fondo elevadas en un inmunoensayo. La figura 1(a) muestra una interacción de unión deseada entre un anticuerpo de captura unido a una superficie, unido al analito A, que se encuentra unido a un anticuerpo de detección marcado. Las figuras 1(b)-(d) muestran interacciones de unión no deseadas. La figura 1(b) muestra un suceso de unión entre un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección marcado; la figura 1(c) muestra un suceso de unión entre un anticuerpo de captura y un analito B extraño, que puede encontrarse presente en una muestra, y la figura 1(d) muestra un suceso de unión entre un anticuerpo de captura y un anticuerpo adicional que puede encontrarse presente en la muestra.

Las figuras 2(a)-(c) representan la utilización de una secuencia oligonucleotídica de puente para facilitar una interacción de unión en un inmunoensayo. La figura 2(a) muestra un puente entre un anticuerpo de captura, un analito A y un anticuerpo de detección, en el que el oligonucleótido de puente incluye un marcado detectable. La figura 2(b) muestra un puente entre un anticuerpo de captura y un analito adicional en una muestra, B, y la figura 2(c) muestra una interacción de unión entre un anticuerpo de captura, un analito B y un anticuerpo de detección en ausencia de una secuencia oligonucleotídica de puente.

Descripción detallada de la invención

A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación a la presente invención presentan los significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos singulares incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular. Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, «un elemento» se refiere a un elemento o a más de un elemento.

La presente invención mejora la especificidad de los inmunoensayos mediante la introducción de un reactivo de enlace que se une a un primer reactivo de unión, por ejemplo, un anticuerpo de captura, en el caso de que el segundo reactivo de unión correctivo, por ejemplo, un anticuerpo de detección, se encuentre presente. Por lo tanto, según una primera forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en la que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en la que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dichos primer y segundo reactivos de unión se sitúan próximos entre sí mediante dichos primer y segundo agentes de enlace, respectivamente unidos a cada uno de los reactivos de unión, en donde una energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para unir establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de la primera y segunda regiones de unión al analito, y

(b) medir la cantidad de dicho analito a dicho analito unido a dicho soporte sólido.

Además, la exposición de la invención enseña un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende poner en contacto una muestra que incluye un analito de interés con:

(i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une al analito de interés, en el que el primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y

(ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une al analito de interés, en el que el segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que la segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de la primera secuencia oligonucleotídica. La etapa de puesta en contacto preferentemente se lleva a cabo bajo condiciones en las que la primera y segunda regiones de unión se unen al analito y la primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con la segunda secuencia oligonucleotídica. Por lo tanto, en este aspecto de la exposición de la invención, el primer y segundo reactivos de unión se aproximan entre sí mediante un primer y segundo agentes de enlace, respectivamente, unidos a cada uno de los reactivos de unión, en donde los agentes

de enlace incluyen secuencias oligonucleotídicas complementarias.

En un aspecto alternativo de la exposición de la invención, el primer y segundo reactivos de unión se aproximan entre sí mediante una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte del primer agente de enlace y el segundo agente de enlace. Por lo tanto, la exposición de la invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende:

(a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con:

(i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica,

(ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, y

(iii) una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica,

y (b) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

En cada aspecto de la exposición de la invención, las secuencias oligonucleotídicas de unión y/o puente están diseñadas de manera que las interacciones de unión, es decir, entre el primer y segundo reactivo de unión y la secuencia de unión o de puente, resultan necesarias para un enlace estable. Por lo tanto, en el primer aspecto de la exposición de la invención en el que el primer y segundo reactivos de unión se mantienen próximos mediante una interacción entre el primer y segundo agentes de enlace, se forma un enlace estable cuando el primer y segundo reactivos de unión se unen entre sí y el primer agente de enlace se une a la secuencia complementaria del segundo agente de enlace. En el caso de que se utilice una secuencia oligonucleotídica de puente, se forma un enlace estable en el caso de que el primer y segundo reactivos de unión se unen entre sí y la secuencia oligonucleotídica de puente se una a su complemento en el primer y segundo agentes de enlace.

En un aspecto preferente de la exposición de la invención, la secuencia complementaria utilizada en el agente de enlace y/o secuencia de puente está diseñada para presentar una energía de unión relativamente baja, de manera que una única interacción resulta insuficiente para enlazar establemente el agente de enlace a cualquiera de los reactivos de unión por sí solo, pero la avidéz combinada de la unión simultánea a los reactivos de unión está diseñada para resultar suficiente para unir establemente la secuencia de enlace y/o de puente. Los oligonucleótidos de ADN ofrecen una elección convenientemente ajustable y específica para las secuencias de enlace y/o puente. La energía de unión puede ajustarse a partir de la longitud de la secuencia de unión, la temperatura y la concentración salina. Los oligonucleótidos ofrecen además un anclaje flexible conveniente entre reactivos de unión y la longitud puede seleccionarse de manera que el conector o secuencia de puente pueda unirse al primer y segundo reactivos de unión, por ejemplo, los anticuerpos de captura y detección, tal como se muestra en la figura 2.

La secuencia oligonucleotídica de puente/enlace debe seleccionarse para que sea única y tan ortogonal como resulte posible respecto a otras secuencias con el fin de minimizar sucesos de unión no deseados. En un aspecto de la exposición de la invención, la secuencia oligonucleotídica de puente/enlace presenta una longitud de aproximadamente 5 a 20 bases, preferentemente de 8 a 15 bases, más preferentemente de aproximadamente 8 a 12 bases y lo más preferentemente de aproximadamente 4 a 8 bases. La secuencia y longitud dependerá de la temperatura de incubación, concentración salina y contenido de G/C deseados. En un aspecto preferente de la exposición de la invención, el contenido de G/C es de entre aproximadamente 40% y 60%. La energía de unión de los emparejamientos individuales debe seleccionarse para que resulte suficientemente débil para que los emparejamientos de oligonucleótidos individuales no resulten estables por sí solos. Además, la secuencia de enlace/puente debe ser suficientemente larga para permitir el enlace/puente entre el primer y segundo reactivos de unión. La secuencia oligonucleotídica puede comprender una secuencia de ADN, por ejemplo, poliA o poliT, o podría incluir fracciones adicionales, por ejemplo, unidades de polímero, tal como etilenglicol. Además, las secuencias oligonucleotídicas utilizadas en las fracciones de enlace/puente no necesitan ser de longitud idéntica y en determinados aspectos de la exposición de la invención puede resultar beneficioso proporcionar una secuencia oligonucleotídica que sea más larga que su pareja de unión, por ejemplo, en hasta 25 bases, o hasta 15 bases o hasta 10 bases.

Los procedimientos de la presente exposición pueden implicar una o más etapas. Por ejemplo, el ensayo de

unión puede comprender:

(a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y

(b) medir la cantidad de dicho analito a dicho analito unido a dicho soporte sólido.

Alternativamente, el procedimiento de la exposición de la invención puede implicar una secuencia oligonucleotídica de puente, de la manera siguiente:

(a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se enlaza a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se enlaza a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, e (iii) una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y

(b) medir la cantidad de dicho analito a dicho analito unido a dicho soporte sólido.

Todavía adicionalmente, en el caso de que se utilice una secuencia oligonucleotídica de puente, el ensayo de unión según la exposición de la invención puede implicar varias etapas discretas, de la manera siguiente:

(a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, en donde dicha etapa de puesta en contacto (a) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera región de unión se une a dicho analito,

(b) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (a) con un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se enlaza a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en donde dicha etapa de puesta en contacto (b) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha segunda región de unión se une a dicho analito,

(c) poner en contacto la mezcla formada en la etapa (b) con una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en las que dicha etapa de puesta en contacto (c) se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha secuencia oligonucleotídica de puente se hibrida con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y

(d) medir la cantidad de dicho analito unida a dicho soporte sólido.

Todavía adicionalmente, el procedimiento de la presente exposición puede aplicarse a formatos singleplex o multiplex en los que se llevan a cabo múltiples mediciones de ensayo en una única muestra. Las mediciones multiplex pueden comprender los actos de poner en contacto por lo menos una parte de una muestra con una o más superficies de unión que comprenden una pluralidad de dominios de unión, la inmovilización de uno o más analitos en los dominios y la medición de los analitos inmovilizados en los dominios. En determinados aspectos de la exposición de la invención, por lo menos dos de los dominios de unión difieren en su especificidad para los analitos de interés. En un ejemplo de dicho aspecto, los dominios de unión se preparan mediante inmovilización, sobre una o más superficies, de dominios discretos de reactivos de unión que se unen a los analitos de interés.

Opcionalmente, la muestra se expone a una superficie de unión que comprende una serie de reactivos de unión. Opcionalmente, la superficie o superficies pueden definir, en parte, uno o más límites de un recipiente (por ejemplo, una celda de flujo, pocillo, cubeta, etc.) que contiene la muestra o por la que se hace pasar la muestra. El procedimiento puede comprender además generar señales de ensayo que son indicativas de la cantidad de los analitos en los diferentes dominios de unión, por ejemplo, cambios de absorbancia óptica, cambios de fluorescencia, generación de quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia, cambios de reflectividad, índice refractivo o dispersión de la luz, acumulación o liberación de marcajes detectables respecto de los dominios, oxidación o reducción de especies redox, corrientes o potenciales eléctricos, cambios en campos magnéticos, etc.

En un aspecto preferente de la exposición de la invención, un procedimiento de ensayo multiplexado comprende:

- (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se une a uno o más primeros agentes de enlace, comprendiendo cada uno una primera secuencia oligonucleotídica, e (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se une a uno o más segundos agentes de enlace, cada uno de los cuales comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en la que dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dicha primera y segunda regiones de unión se unen a dichos analitos y dicha primera secuencia oligonucleotídica se hibrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y

- (c) medir la cantidad de dichos analitos unida a dicho soporte sólido.

Alternativamente, un procedimiento de ensayo multiplexado según la exposición de la invención puede implicar una secuencia oligonucleotídica de puente, de la manera siguiente:

- (a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de analitos con (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se enlaza a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, e (iii) una o más secuencias oligonucleotídicas de puente, cada una de las cuales comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en donde dicha etapa de puesta en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas primera y segunda regiones de unión se unen a dichos analitos y dichas secuencias oligonucleotídicas de puente se hibridan con dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica, y

- (b) medir la cantidad de dichos analitos unida a dicho soporte sólido.

Además, el ensayo de unión puede incluir una o más etapas de lavado. Por ejemplo, una vez se ha combinado la muestra y el primer reactivo de unión, el soporte sólido puede lavarse antes de poner en contacto la mezcla con el segundo reactivo de unión y/o antes de introducir un oligonucleótido de puente.

Según su segunda forma de realización, la invención contempla además un kit para llevar a cabo un ensayo de unión, que comprende:

- (a) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y
- (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en donde la energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para unir establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de la primera y segunda regiones de unión al analito.

Alternativamente, el kit de la presente exposición puede comprender una superficie sólida que incluye:

- 5 (i) un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se une a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica,
- 10 (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, y
- 15 (iii) una secuencia oligonucleotídica de puente que comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica.

Todavía adicionalmente, la exposición de la invención proporciona un kit para una medición de ensayo multiplexado de una pluralidad de analitos, que comprende:

- 20 (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se enlaza a uno o más primeros agentes de enlace, cada uno de los cuales comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y
- 25 (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a uno o más de dichos analitos y cada uno de dichos uno o más segundos reactivos de unión se enlaza a uno o más segundos agentes de enlace, cada uno de los cuales comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en la que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica.
- 30

Alternativamente, el kit según la exposición de la invención puede utilizar un oligonucleótido de puente para facilitar un ensayo multiplexado, que comprende:

- 35 (i) una superficie sólida que incluye uno o más primeros reactivos de unión inmovilizados en la misma, en la que dichos uno o más primeros reactivos de unión comprenden, cada uno, una primera región de unión que se une a dichos analitos y cada uno de dichos uno o más primeros reactivos de unión se enlaza a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica,
- 40 (ii) uno o más segundos reactivos de unión, cada uno de los cuales comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en los que dicho segundo reactivo de unión se une a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, y
- 45 (iii) una o más secuencias oligonucleotídicas de puente cada una de las cuales comprende una secuencia complementaria respecto a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica y dicha segunda secuencia oligonucleotídica.

Entre los ejemplos de muestras que pueden analizarse mediante los procedimientos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, muestras de alimentos (incluyendo extractos alimentarios, homogenados alimentarios, bebidas, etc.), muestras medioambientales (por ejemplo, muestras de suelo, suspensiones medioambientales, aerosoles ambientales recolectados, toallitas ambientales, agua filtrada, etc.), muestras industriales (por ejemplo, materias primas, productos o intermediarios de un procedimiento de producción industrial), muestras clínicas humanas, muestras veterinarias y otras muestras de origen biológico. Entre las muestras biológicas que pueden analizarse se incluyen, aunque sin limitación, heces, frotis mucosales, líquidos y/o muestras fisiológicas que contienen suspensiones de células. Entre los ejemplos específicos de muestras biológicas se incluyen sangre, suero, plasma, heces, frotis mucosales, aspirados de tejidos, homogeneizados de tejidos, cultivos celulares y sobrenadantes de cultivos celulares (incluyendo cultivos de células eucarióticas y procarrióticas), orina, saliva, esputo y líquido cefalorraquídeo.

Entre los analitos que pueden medirse utilizando los procedimientos de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, proteínas, toxinas, ácidos nucleicos, microorganismos, virus, células, hongos, esporas, carbohidratos, lípidos, glucoproteínas, lipoproteínas, polisacáridos, fármacos, hormonas, esteroides, nutrientes, metabolitos y cualquier derivado modificado de las moléculas anteriormente indicadas, o cualquier complejo que comprende una o más de las moléculas anteriormente indicadas o combinaciones de los mismos. El nivel de un analito de interés en una muestra puede ser indicativo de una enfermedad o condición de enfermedad o puede indicar simplemente si el paciente ha sido expuesto a ese analito.

Los ensayos de la presente invención pueden utilizarse para determinar la concentración de uno o más, por ejemplo dos o más analitos en una muestra. De esta manera, pueden medirse dos o más analitos en la misma muestra. Entre los paneles de analitos que pueden medirse en la misma muestra se incluyen, por ejemplo, paneles de ensayos de analitos o actividades asociadas a un estado de enfermedad o a condiciones fisiológicas. Entre algunos de dichos paneles se incluyen paneles de citoquinas y/o sus receptores (por ejemplo, uno o más de TNF-alfa, TNF-beta, IL1-alfa, IL1-beta, IL2, IL4, IL6, IL-10, IL-12, IFN-y, etc.), factores de crecimiento y/ sus receptores (por ejemplo, uno o más de EGF, VGF, TGF, VEGF, etc.), drogas de abuso, fármacos terapéuticos, vitaminas, anticuerpos específicos de patógeno, autoanticuerpos (por ejemplo, uno o más anticuerpos dirigidos contra los antígenos Sm, RNP, SS-A, SS-alfa, J0-1 y Scl-70), anticuerpos específicos de alérgeno, marcadores tumorales (por ejemplo, uno o más de CEA, PSA, CA-125 II, CA 15-3, CA 19-9, CA 72-4, CYFRA 21-1, NSE, AFP, etc.), marcadores de enfermedad cardíaca, incluyendo la enfermedad cardíaca congestiva y/o infarto de miocardio agudo (por ejemplo, uno o más de troponina-T, troponina-I, mioglobina, CKMB, mieloperoxidasa, glutatión peroxidasa, proteína β -natriurética (BNP), proteína alfa-natriurética (ANP), endotelina, aldosterona, proteína C-reactiva (CRP), etc.), marcadores asociados a hemostasis (por ejemplo, uno o más de monómero de fibrina, dímero-D, complejo de trombina-anti trombina, fragmentos 1 y 2 de protrombina, anti-Factor Xa, etc.), marcadores de la infección de hepatitis vírica aguda (por ejemplo, uno o más de anticuerpo IgM contra el virus de la hepatitis A, anticuerpos IgM contra antígeno nuclear de la hepatitis B, antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpo contra el virus de la hepatitis C, etc.), marcadores de la enfermedad de Alzheimer (amiloides alfa, amiloide beta, A β 42, A β 40, A β 38, A β 39, A β 37, A β 34, proteína tau, etc.), marcadores de osteoporosis (por ejemplo, uno o más de N o C-telopéptidos entrecruzados, desoxipiridinolina total, desoxipiridinolina libre osteocalcina, fosfatasa alcalina, propéptido C-terminal de colágeno de tipo I, fosfatasa alcalina específica ósea, etc.), marcadores de estado de fertilidad o trastornos asociados a fertilidad (por ejemplo, uno o más de estradiol, progesterona, hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), prolactina, hCG, testosterona, etc.), marcadores de trastornos del tiroides (por ejemplo Uno o más de hormona estimulante del tiroides (TSH), T3 total, T3 libre, Total T4 total, T4 libre y T3 inversa), y marcadores de cáncer de próstata (por ejemplo, uno o más de PSA total, PSA libre, PSA acompañado, fosfatasa de ácido prostático, creatina quinasa, etc.). Entre determinadas formas de realización de la invención se incluyen medir, por ejemplo, uno o más, dos o más, cuatro o más o 10 o más analitos asociados a un estado de enfermedad o condición fisiológica específica (por ejemplo, analitos agrupados juntos en un panel, tal como los indicados anteriormente, por ejemplo un panel útil para el diagnóstico de trastornos del tiroides puede incluir, por ejemplo, uno o más de hormona estimulante del tiroides (TSH), T3 total, T3 libre, T4 total, T4 libre y T3 inversa).

Los procedimientos de la presente invención están diseñados para permitir la detección de una amplia diversidad de agentes biológicos y bioquímicos, tal como se ha indicado anteriormente. En una forma de realización, el procedimiento puede utilizarse para detectar virus, bacterias y toxinas patogénicas y/o potencialmente patogénicas, incluyendo agentes de guerra biológica («AGB»9 en una diversidad de matrices clínicas y medioambientales relevantes, incluyendo y sin limitación, sangre, esputo, heces, filtros, frotis, etc. Una lista no limitativa de patógenos y toxinas que pueden analizarse (solos o en combinación) utilizando los procedimientos de la presente invención es: *Bacillus anthracis* (ántrax), *Yersinia pestis* (peste), *Vibrio cholerae* (cólera), *Francisella tularensis* (tularemia), *Brucella* spp. (brucelosis), *Coxiella burnetii* (fiebre Q), virus Orthopox incluyendo el virus variola (viruela), encefalitis vírica, virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus de la encefalitis equina occidental (EEO), virus de la encefalitis equina oriental (EEO), alfavirus, fiebres hemorrágicas víricas, Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, virus ébola, enterotoxinas estafilocócicas, ricina, toxinas botulínicas, *Clostridium botulinum*, micotoxina, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys*, muermo, hongo del trigo, *Bacillus globigii*, *Serratia marcescens*, «lluvia amarilla», micotoxinas de tricotecenos, *Salmonella typhimurium*, aflatoxina, *Xenopsylla cheopis*, *Diamanus montanus*, alastrim, viruela símica, Arnavirus, Hantavirus, fiebre de Lassa, fiebres hemorrágicas argentinas, fiebres hemorrágicas bolivianas, virus de la fiebre del valle del Rift, virus de Crimea-Congo virus, virus Hanta, fiebres hemorrágicas de Marburg, virus de la fiebre amarilla, virus de la fiebre dengue, influenza (incluyendo cepas humanas animales, incluyendo el virus de la gripe aviar H5N1), virus I y II de la inmunodeficiencia humana (VIH I y II), hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis (no A, B o C), enterovirus, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, virus herpes simplex, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, virus del papiloma humano, *Treponema pallidum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium difficile*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, coronavirus, virus Coxsackie A, rinovirus, virus parainfluenza, virus sincitial respiratorio (VSR), metaneumovirus y adenovirus.

El experto en el campo de los ensayos de unión apreciará fácilmente el alcance de los agentes de unión y parejas de unión compañeras que pueden utilizarse en los presentes procedimientos. Una lista no limitativa de tales parejas incluye (en cualquier orden) parejas de receptor/ligando, anticuerpos/antígenos, parejas de receptor/ligando natural o sintético, amins y compuestos carbonilo (es decir, de unión mediante la formación de una base de Schiff), parejas de hapteno/anticuerpo, parejas de antígeno/anticuerpo, parejas de epitopo/anticuerpo, parejas de mimitopo/anticuerpo, parejas de aptámero/molécula diana, parejas de hibridación y parejas de intercalante/molécula diana.

Los ensayos de unión de los procedimientos de la presente invención pueden utilizar anticuerpos u otras proteínas receptoras como reactivos de unión. El término «anticuerpo» incluye moléculas de anticuerpo intactas (incluyendo anticuerpos híbridos ensamblados mediante reasociación in vitro de subunidades de anticuerpo), fragmentos de anticuerpo y constructos de proteínas recombinantes que comprenden un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo (tal como se describen en, por ejemplo, Porter, R. R. y Weir, R. C. J. Cell Physiol., 67 (supl.); 51-64 (1966) y Hochman, I. Inbar, D. y Givol, D. Biochemistry 12: 1130 (1973)), así como constructos de anticuerpos que han sido modificados químicamente, por ejemplo mediante la introducción de un marcaje detectable.

Los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse en una diversidad de dispositivos y/o formatos de ensayo. Entre los dispositivos de ensayo pueden incluirse, por ejemplo, módulos de ensayo, tales como placas de ensayo, cartuchos, placas de ensayo multipocillo, recipientes de reacción, probetas, cubetas, celdas de flujo, chips de ensayo, dispositivos de flujo lateral, etc., a los que se han añadido reactivos de ensayo (que pueden incluir agentes de localización u otros reactivos de unión) a medida que avanza el ensayo o precargados en los pocillos, cámaras o regiones de ensayo del módulo de ensayo. Estos dispositivos pueden utilizar una diversidad de formatos de ensayo para ensayo de unión específica, por ejemplo, inmunoensayos o ensayos inmunocromatográficos. Los dispositivos y formatos de ensayo ilustrativos se describen posteriormente en la presente memoria. En determinadas formas de realización, los procedimientos de la presente invención pueden utilizar reactivos de ensayo que se almacenan en un estado seco y los dispositivos/kits de ensayo pueden además comprender o suministrarse con materiales desecantes para mantener los reactivos de ensayo en un estado seco. Los dispositivos de ensayo precargados con los reactivos de ensayo pueden mejorar en gran medida la velocidad y reducir la complejidad de las mediciones de ensayo, manteniendo simultáneamente una excelente estabilidad durante el almacenamiento. Los reactivos de ensayo secos pueden ser cualquier reactivo de ensayo que pueda secarse y después reconstituirse antes de la utilización en un ensayo. Entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, reactivos de unión útiles en ensayos de unión, enzimas, sustratos enzimáticos, pigmentos indicadores y otros compuestos reactivos que pueden utilizarse para detectar un analito de interés. Entre los reactivos de ensayo pueden incluirse además sustancias que no participan directamente en el mecanismo de detección, sino que desempeñan un papel auxiliar en un ensayo, incluyendo, aunque sin limitación, agentes de bloqueo, agentes estabilizadores, detergentes, sales, tampones del pH, conservantes, etc. Los reactivos pueden encontrarse presentes en forma libre o soportados sobre fases sólidas, incluyendo las superficies de compartimientos (por ejemplo, cámaras, canales, celdas de flujo, pocillos, etc.) en los módulos de ensayo o las superficies de coloides, perlas u otros soportes de partículas.

Una amplia diversidad de fases sólidas resulta adecuada para la utilización en los procedimientos de la presente invención, incluyendo fases sólidas convencionales en la técnica de los ensayos de unión. Las fases sólidas pueden realizarse en una diversidad de materiales diferentes, incluyendo polímeros (por ejemplo, poliestireno y polipropileno), cerámica, vidrio, materiales compuestos (por ejemplo, materiales compuestos de carbono-polímero, tales como tintas a base de carbono). Entre las fases sólidas adecuadas se incluyen superficies de objetos macroscópicos, tales como una superficie interior de un recipiente de ensayo (por ejemplo, probetas, cubetas, celdas de flujo, cartuchos, pocillos en una placa multipocillo, etc.), portaobjetos, chips de ensayo (tales como los utilizados en mediciones en chip génico o de proteínas), puntas o sondas, perlas, medios de filtración, medios de flujo lateral (por ejemplo, membranas de filtración utilizadas en tiras de ensayo de flujo lateral), etc.

Entre las fases sólidas adecuadas se incluyen además partículas (incluyendo, aunque sin limitación, coloides o perlas) utilizadas comúnmente en otros tipos de ensayos a base de partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, de polipropileno y látex, materiales utilizados típicamente en la síntesis en fase sólida, por ejemplo partículas de poliestireno y poliácridamida, y materiales utilizados típicamente en aplicaciones cromatográficas, por ejemplo, sílice, alúmina, poliácridamida y poliestireno. Los materiales también pueden ser una fibra, tal como una fibrilla de carbono. Las micropartículas pueden ser inanimadas, o alternativamente, pueden incluir entidades biológicas vivas, tales como células, virus, bacterias y similares.

Las partículas utilizadas en el presente procedimiento pueden comprender cualquier material adecuado para la unión a una o más parejas de unión y/o marcajes, y que pueden recolectarse mediante, por ejemplo, centrifugación, gravedad, filtración o recolección magnética. Una amplia diversidad de diferentes tipos de partículas que pueden unirse a reactivos de unión se encuentra disponible comercialmente para la utilización en ensayos de unión. Entre ellos se incluyen partículas no magnéticas, así como partículas que comprenden materiales magnetizables que permitan la recolección de las partículas con un campo magnético. En una forma de realización, las partículas comprenden un material conductor y/o semiconductor, por ejemplo, partículas de oro coloidal.

Las micropartículas pueden presentar una amplia diversidad de tamaños y formas. A título ejemplar y no limitativo, las micropartículas pueden presentar entre 5 nanómetros y 100 micrómetros. Preferentemente, las micropartículas presentan un tamaño de entre 20 nm y 10 micrómetros. Las partículas pueden ser esféricas, oblongas, en forma de bastón, etc., o pueden presentar una forma irregular.

Las partículas utilizadas en el presente procedimiento pueden codificarse para permitir la identificación de partículas o subpoblaciones de partículas específicas dentro de una mezcla de partículas. La utilización de tales partículas codificadas se ha utilizado para permitir el multiplexado de ensayos que utilizan partículas como soportes de fase sólida para ensayos de unión. En un enfoque, las partículas se fabrican de manera que incluyan uno o más pigmentos fluorescentes y se identifican poblaciones de partículas específicas basándose en la intensidad y/o intensidad relativa de las emisiones de fluorescencia a una o más longitudes de onda. Este enfoque se ha utilizado en los sistemas sMAP Luminex (ver, por ejemplo, patente US nº 6.939.720 y en los sistemas citométricos de matrices de perlas de Becton Dickinson. Alternativamente, las partículas pueden codificarse a través de diferencias en otras propiedades físicas, tales como tamaño, forma, patrones ópticos incluidos y similares.

Los procedimientos de la invención pueden utilizarse con una diversidad de procedimientos para la medición de la cantidad de un analito y, en particular, la medición de la cantidad de un analito unida a una fase sólida. Entre las técnicas que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, técnicas conocidas, tales como los ensayos basados en el cultivo celular, ensayos de unión (incluyendo ensayos de aglutinación, inmunoensayos, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos, etc.), ensayos enzimáticos, ensayos colorimétricos, etc. Otras técnicas adecuadas resultarán fácilmente evidentes para el experto medio en la materia. Algunas técnicas de medición permiten realizar mediciones mediante inspección visual; otros pueden requerir o beneficiarse de la utilización de un instrumento para llevar a cabo las mediciones.

Entre los procedimientos para medir la cantidad de un analito se incluyen técnicas libres de marcaje, que incluyen aunque sin limitación: i) técnicas que miden cambios en la masa o índice refractivo en una superficie después de la unión de un analito a una superficie (por ejemplo, técnicas de onda acústica de superficie, sensores de resonancia del plasmón superficial, técnicas elipsométricas, etc.), ii) técnicas de espectrometría de masas (incluyendo técnicas como MALDI, SELDI, etc. que pueden medir analitos sobre una superficie), iii) técnicas cromatográficas o electroforéticas, iv) técnicas de fluorescencia (que pueden basarse en la fluorescencia inherente de un analito), etc.

Entre los procedimientos para medir la cantidad de un analito se incluyen además técnicas que miden analitos mediante la detección de marcajes que pueden unirse directa o indirectamente (por ejemplo, mediante la utilización de parejas de unión marcadas de un analito) a un analito. Entre los marcajes adecuados se incluyen marcajes que pueden visualizarse directamente (por ejemplo, partículas que pueden observarse visualmente y marcajes que generan una señal medible, tal como dispersión de la luz, absorbancia óptica, fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, radioactividad, campos magnéticos, etc.). Entre los marcajes que pueden utilizarse se incluyen además enzimas u otras especies químicamente reactivas que presentan una actividad química que conduce a una señal medible, tal como dispersión de la luz, absorbancia, fluorescencia, etc. La utilización de enzimas como marcajes ha sido bien establecida en ensayos de inmunosorción ligada a enzima, también denominados ELISA, inmunoensayos enzimáticos o EIA. En el formato de ELISA, se fija una cantidad no conocida de antígeno en una superficie y después se lava un anticuerpo específico sobre la superficie de manera que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo se une a un enzima y en la etapa final se añade una sustancia que el enzima convierte en un producto que proporciona un cambio en una señal detectable. La formación de producto puede ser detectable, por ejemplo, debido a una diferencia respecto al sustrato, en una propiedad medible, tal como absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia, dispersión de la luz, etc. Determinados (aunque no todos) los procedimientos de medición que pueden utilizarse con los procedimientos de unión en fase sólida según la invención pueden beneficiarse o requerir de una etapa de lavado para eliminar los componentes no unidos (por ejemplo, marcajes) respecto de la fase sólida. De acuerdo con lo anterior, los procedimientos de la invención pueden comprender tal etapa de lavado.

En una forma de realización, el anticuerpo de detección incluye un marcaje detectable unido al mismo. Alternativamente, se utiliza un oligonucleótido de puente y el oligonucleótido de puente incluye un marcaje detectable. Tal como se muestra en las figuras 2(A)-(c), la interacción de unión deseada se detecta en el caso de que el oligonucleótido de puente se encuentre en posición entre el primer y segundo agentes de enlace y la secuencia de puente también porte el marcaje detectable.

En una forma de realización, puede medirse uno o más analitos de interés en la muestra utilizando formatos de ensayo basados en la electroquimioluminiscencia, por ejemplo, los inmunoensayos basados en la electroquimioluminiscencia (ECL). La elevada sensibilidad, amplio rango dinámico y selectividad de los ECL son factores importantes para el diagnóstico médico. Los instrumentos de ECL disponibles comercialmente han demostrado un rendimiento excepcional y se han vuelto ampliamente utilizados por motivos que incluyen su excelente sensibilidad, rango dinámico, precisión y tolerancia de matrices complejas de muestras. Se ha utilizado como marcajes de ECL, especies que pueden inducirse para emitir ECL (especies activas para ECL), por ejemplo, i) compuestos organometálicos en los que el metal es, por ejemplo, de los metales nobles del grupo VIII, incluyendo compuestos organometálicos que contienen Ru y que contiene Os, tales como la fracción trispiridil-rutenio (RuBpy) e ii) luminol y compuestos relacionados. Las especies que reaccionan con el marcaje de ECL en el procedimiento de ECL se denominan en la presente memoria correctivos de ECL. Entre los correctivos utilizados comúnmente se incluyen aminas terciarias (por ejemplo, ver la patente US nº 5.846.485),

oxalato y persulfato para la ECL de RuBpy y peróxido de hidrógeno para la ECL de luminol (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.240.863). La luz generada por los marcajes de ECL puede utilizarse como una señal informadora en procedimientos diagnósticos (Bard *et al.*, patente US nº 5.238.808). Por ejemplo, un marcaje de ECL puede acoplarse covalentemente con un agente de unión, tal como un anticuerpo, sonda de ácidos nucleicos, receptor o ligando; la participación del reactivo de unión en una interacción de unión puede monitorizarse mediante la medición de la ECL emitida por el marcaje de ECL. Alternativamente, la señal de ECL procedente de un compuesto activo para ECL puede ser indicativa del medio químico (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.641.623, que describe ensayos de ECL que monitorizan la formación o destrucción de correactivos de ECL). Para más antecedentes sobre la ECL, marcajes de ECL, ensayos de ECL e instrumentación para llevar a cabo ensayos de ECL, ver las patentes nº 5.093.268; 5.147.806; 5.324.457; 5.591.581; 5.597.910; 5.641.623; 5.643.713; 5.679.519; 5.705.402; 5.846.485; 5.866.434; 5.786.141; 5.731.147; 6.066.448; 6.136.268; 5.776.672; 5.308.754; 5.240.863; 6.207.369; 6.214.552 and 5.589.136 y publicaciones de patente PCT WO 99/63347, WO 00/03233, WO 99/58962, WO 99/32662, WO 99/14599, WO 98/12539, WO 97/36931 y WO 98/57154.

Los procedimientos de la invención pueden aplicarse a formatos singleplex o multiplex en los que se llevan a cabo múltiples mediciones de ensayo en una única muestra. Entre las mediciones multiplex que pueden utilizarse con la invención se incluyen, aunque sin limitación, mediciones multiplex i) que implican la utilización de múltiples sensores, ii) que utilizan dominios de ensayo discretos sobre una superficie (por ejemplo, una matriz) que son distinguibles basándose en la localización sobre la superficie, iii) que implican la utilización de reactivos recubiertos sobre partículas que son distinguibles basándose en una propiedad de las partículas, tal como tamaño, forma, color, etc., iv) que producen señales de ensayo que son distinguibles basándose en propiedades ópticas (por ejemplo, absorbancia o espectro de emisión), o v) que se basan en propiedades temporales de la señal de ensayo (por ejemplo, el tiempo, frecuencia o fase de una señal).

Una forma de realización de la presente invención utiliza un ensayo de unión específico, por ejemplo, un inmunoensayo, ensayo inmunocromatográfico u otro ensayo que utiliza un reactivo de unión. El inmunoensayo o ensayo de unión específica según una forma de realización de la invención puede implicar varios formatos disponibles en la técnica. Los reactivos de unión pueden marcarse con un marcaje o inmovilizarse sobre una superficie. De esta manera, en una forma de realización, el procedimiento de detección es un ensayo de unión, por ejemplo, un inmunoensayo, ensayo de unión de receptor-ligando o ensayo de hibridación, y la detección se lleva a cabo poniendo en contacto una composición de ensayo con una o más moléculas de detección capaces de unirse específicamente a uno o más analitos de interés en la muestra.

En una forma de realización, el ensayo utiliza un formato de ensayo de unión directa. Se une un analito a una pareja de unión del analito, que puede inmovilizarse sobre una fase sólida. El analito unido se mide mediante detección directa del analito o mediante un marcaje unido al analito (por ejemplo, mediante las mediciones indicadas anteriormente).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para llevar a cabo un ensayo de unión que comprende:

5 (a) poner en contacto una muestra que comprende un analito de interés con: (i) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se enlaza a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica, y (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se enlaza a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en el que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica; en el que dicha etapa de poner en contacto se lleva a cabo bajo condiciones en las que dichas primera y segunda regiones de unión se unen a dicho analito y dicha primera secuencia oligonucleotídica híbrida con dicha segunda secuencia oligonucleotídica, en el que dichos primer y segundo reactivos de unión se disponen en proximidad uno respecto a otro mediante dichos primer y segundo agentes de enlace, respectivamente, unidos a cada uno de los reactivos de unión, en el que una energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para fijar establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de las primera y segunda regiones de unión al analito; y

(b) medir la cantidad de dicho analito unido a dicho soporte sólido.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho soporte sólido es un electrodo y dicha etapa de medir comprende además aplicar una forma de onda de tensión a dicho electrodo para generar ECL.

3. Kit para la realización de un ensayo de unión que comprende:

30 (a) una superficie sólida que incluye un primer reactivo de unión inmovilizado en la misma que comprende una primera región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho primer reactivo de unión se enlaza a un primer agente de enlace que comprende una primera secuencia oligonucleotídica; y

35 (ii) un segundo reactivo de unión que comprende una segunda región de unión que se une a dicho analito de interés, en el que dicho segundo reactivo de unión se enlaza a un segundo agente de enlace que comprende una segunda secuencia oligonucleotídica, en el que dicha segunda secuencia oligonucleotídica comprende una secuencia complementaria a por lo menos una parte de dicha primera secuencia oligonucleotídica, en el que una energía de unión entre la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica es inferior a un nivel para fijar establemente la primera secuencia oligonucleotídica y la segunda secuencia oligonucleotídica entre sí en ausencia de unión simultánea de las primera y segunda regiones de unión al analito.

45 4. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia complementaria utilizada en el agente de enlace presenta una energía de unión insuficiente para fijar establemente el agente de enlace a cualquiera de los reactivos de unión solo en ausencia de unión simultánea de reactivos de unión al analito.

50 5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia oligonucleotídica de enlace es de una longitud de aproximadamente 5 a 20 bases, preferentemente de una longitud de 8 a 15 bases, más preferentemente de una longitud de aproximadamente 8 a 12 bases.

50 6. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que una longitud de tanto la primera secuencia oligonucleotídica como la segunda secuencia oligonucleotídica comprenden cada una una secuencia de unión complementaria de una longitud de aproximadamente 4 a 8 bases.

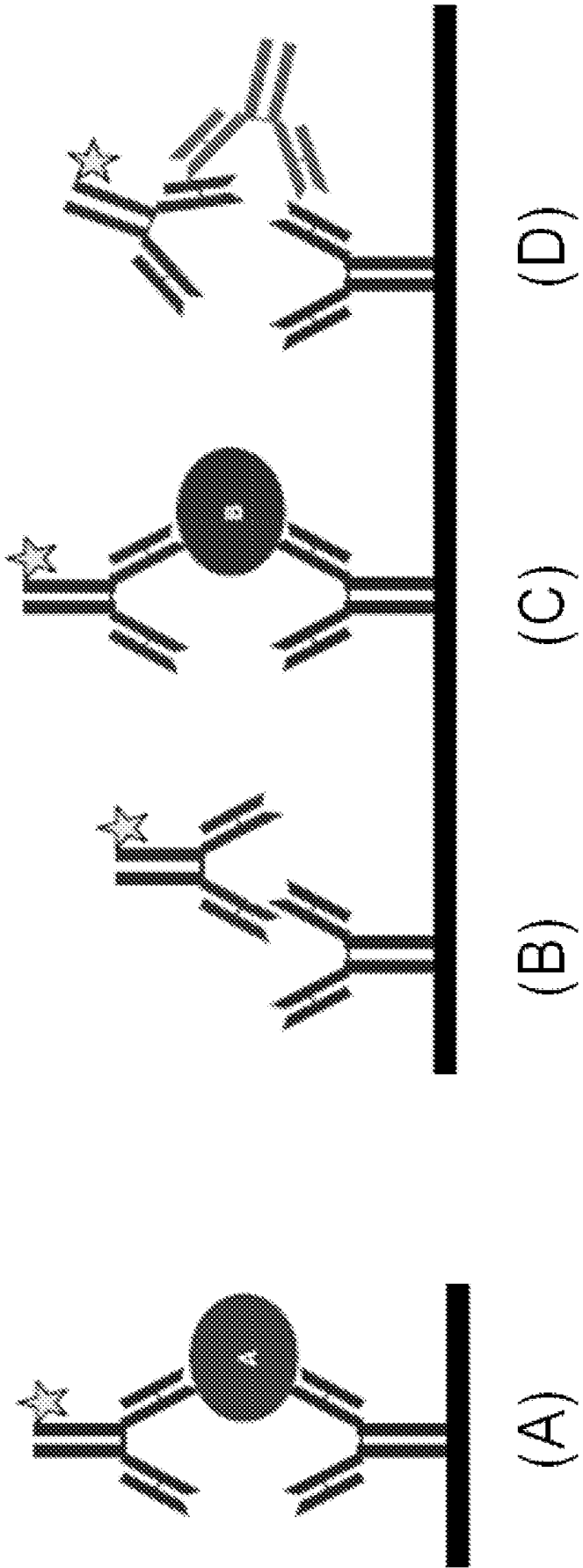
55 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha superficie sólida se selecciona de entre placas de ensayo, cartuchos y partículas.

60 8. Kit según la reivindicación 3, en el que la secuencia complementaria utilizada en el agente de enlace presenta una energía de unión insuficiente para fijar establemente el agente de enlace a cualquiera de los reactivos de unión solo en ausencia de unión simultánea de reactivos de unión al analito.

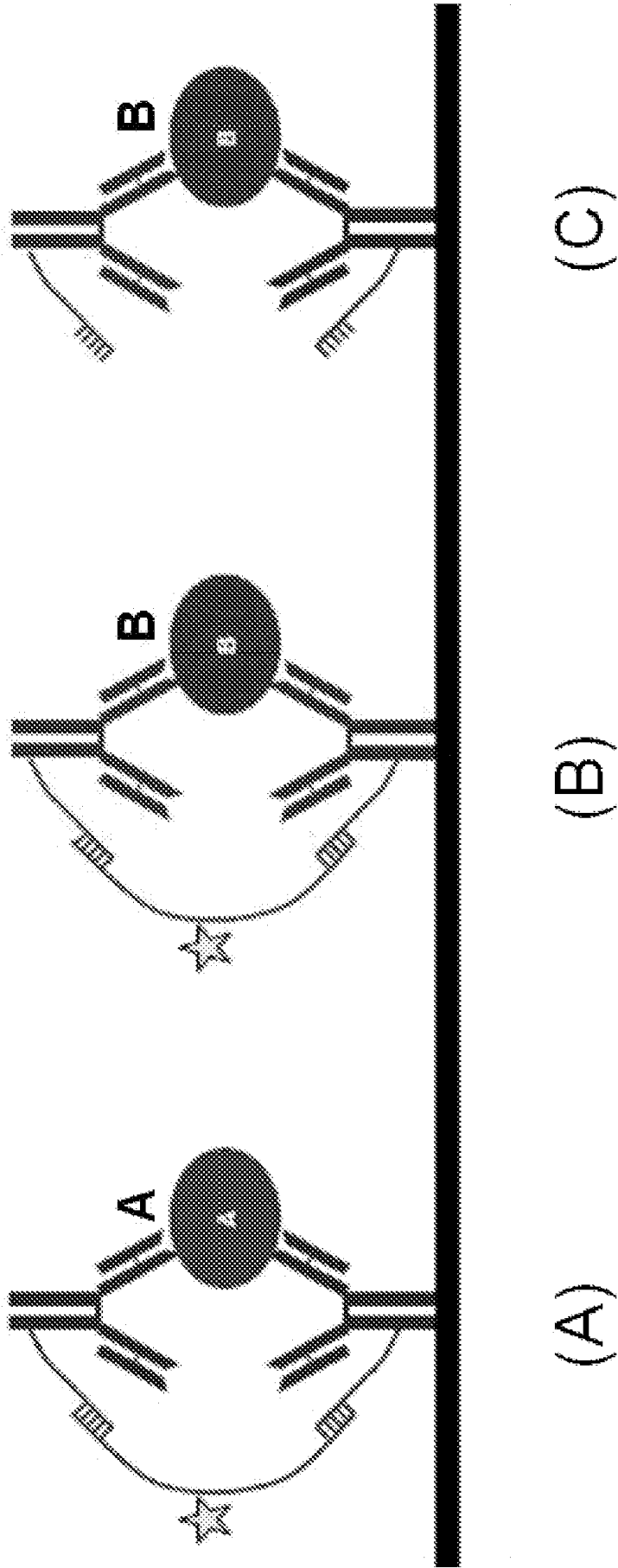
9. Kit según la reivindicación 3, en el que la secuencia oligonucleotídica de enlace es de una longitud de aproximadamente 5 a 20 bases, preferentemente de una longitud de 8 a 15 bases, más preferentemente de una longitud de aproximadamente 8 a 12 bases.

65 10. Kit según la reivindicación 3, en el que una longitud de tanto la primera secuencia oligonucleotídica como la segunda secuencia oligonucleotídica es de una longitud de 4 a 8 bases.

11. Kit según la reivindicación 3, en el que dicha superficie sólida se selecciona de entre placas de ensayo, cartuchos y partículas.



FIGS. 1A-D



FIGS. 2A-C