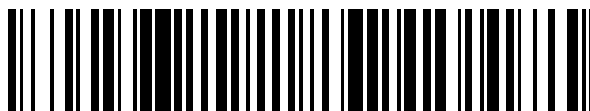


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 033**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2012 PCT/US2012/066108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13078227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2012 E 12852350 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2783216**

54 Título: **Amplificación de la señal en inmunoensayos**

30 Prioridad:

21.11.2011 US 201161562302 P

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

27.02.2019

73 Titular/es:

**ABAXIS, INC. (100.0%)
3240 Whipple Road
Union City, CA 94587, US**

72 Inventor/es:

**CUESICO, CRISTINA;
WALKER, JEREMY;
MEHRA, RAJESH K.;
ARON, KENNETH P. y
BLEILE, DENNIS M.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 033 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

Amplificación de la señal en inmunoensayos

Antecedentes de la invención

5 Los inmunoensayos se utilizan frecuentemente para identificar agentes infecciosos, entre otros usos. Ciertos
 10 inmunoensayos se basan en las respuestas inmunológicas contra un agente infeccioso determinado, por ejemplo,
 ensayando la presencia de anticuerpos del huésped que se unen específicamente a uno o más antígenos únicos de
 ese agente infeccioso. Están disponibles numerosos tipos de sistemas de inmunoensayos con fines diagnósticos,
 incluyendo los grandes sistemas automáticos de laboratorios centrales y los ensayos relativamente simples de
 15 mostrador. Estos inmunoensayos utilizan un amplio intervalo de formatos de ensayo, tales como ensayos de
 aglutinación, ensayos de precipitación, inmunoensayos ligados a enzimas, ensayos de fluorescencia directa,
 ensayos inmunohistoquímicos, ensayos de fijación de complemento, ensayos serológicos, ensayos
 inmunolectroforéticos, y ensayos de flujo lateral y flujo directo (es decir, ensayos rápidos de "tira") Los
 inmunoensayos pueden proporcionar un diagnóstico rápido, simple y eficaz para una variedad de afecciones. Sin
 embargo, sigue existiendo la necesidad en la técnica de inmunoensayos mejorados que tengan una sensibilidad
 aumentada.

El documento 2011/063235 desvela péptidos, dispositivos y procedimientos para la detección de anticuerpos de
Ehrlichia.

El documento WO 2011/063003 (un miembro de la familia de US2011136155) desvela péptidos y procedimientos
 para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Lyme.

20 Hong W. y col., J. of Microbiological Methods, Vol. 83, n.º 2, noviembre 2010, p.133-140 es sobre el desarrollo de un
 ensayo de flujo lateral de 10 canales basado en una tecnología de conversión de fósforo para la elaboración de un
 perfil de anticuerpos contra *Yersinia pestis*.

Fan Chao-ming y col., Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, Vol. 34, n.º 5, mayo de 2011, p.356-
 358 [en chino, véase el Medline Abstract NLM21729624 en inglés] desvela un estudio de inmunocromatografía con
 25 oro coloidal con sándwich de antígeno doble para la detección rápida de anticuerpos de *Mycobacterium tuberculosis*.

El documento WO 2013/067524 (técnica anterior conforme al Art. 54(3) EPC y un miembro de la familia de
 US2013115634) desvela péptidos y procedimientos para la detección de anticuerpos contra la enfermedad de Lyme.

El documento WO 2014/059274 (técnica anterior conforme al Art. 54(3) EPC) desvela péptidos, dispositivos y
 procedimientos para la detección de anticuerpos contra *Ehrlichia*.

30 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la adición de moléculas de unión a Fc
 detectables (por ejemplo, conjugados con Proteína A, conjugados con Proteína G, conjugados con anticuerpo
 secundario) se puede utilizar para la detección de anticuerpos en inmunoensayos, por ejemplo, una captura basada
 35 en antígenos o ensayos tipo sándwich. Estas moléculas de unión a Fc detectables se pueden utilizar solas o en
 combinación con otras entidades detectables para la detección de anticuerpos en los inmunoensayos. Por ejemplo,
 estas moléculas de unión a Fc se pueden utilizar para detectar anticuerpos una vez que los anticuerpos se detecten
 y capturen por entidades de unión específica a anticuerpos, por ejemplo, antígenos. En otro ejemplo, estas
 moléculas de unión a Fc se pueden utilizar como fuente secundaria de señales detectables, por ejemplo, en
 combinación con otra entidad de unión al anticuerpo marcado o detectable tal como un antígeno.

40 Este descubrimiento se puede aplicar a una variedad de ensayos tipo captura, procedimientos relacionados,
 composiciones y kits, como se ha descrito en el presente documento.

Ciertas realizaciones por lo tanto, incluye procedimientos para la detección de un anticuerpo en una muestra de
 ensayo que comprende: (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un primer detector para formar un primera
 45 complejo que comprende el primer detector y el anticuerpo, en el que el primer detector comprende una molécula de
 unión a FC conjugada con una primera entidad detectable; (b) poner en contacto el primer complejo con una entidad
 de captura inmovilizada en una región de ensayo de una superficie, en el que la entidad de captura es capaz de
 unirse específicamente al anticuerpo; y (c) detectar la presencia de una señal de la primera entidad detectable en la
 región de ensayo, en el que la presencia de la señal es indicativa de la presencia del anticuerpo en la muestra de
 50 ensayo. En ciertas realizaciones, el primer detector se inmoviliza en una región de conjugado de la superficie, en el
 que la región de conjugado no se solapa con la región de ensayo de la superficie. En realizaciones específicas,
 la molécula de unión a Fc es la proteína A, la proteína G, o ambas. En ciertas realizaciones, el primer detector
 comprende una proteína A y proteína G conjugadas cada una a la entidad detectable. En dichas realizaciones, la
 relación de proteína A respecto a proteína G se puede ajustar para optimizar el nivel de amplificación de la señal
 dependiendo del tipo de inmunoglobulina que se va a detectar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la Proteína A
 55 y la proteína G están presentes en una relación de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, más

preferentemente aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5.

5 En ciertas realizaciones, la entidad de captura es un antígeno o péptido antigénico. En realizaciones particulares, dicho antígeno o péptido antigénico es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusanos del corazón por ejemplo, gusano del corazón canino, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, virus de leucemia felina, parvovirus, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.

10 En ciertas realizaciones, la primera entidad detectable es una nanopartícula metálica, una nanocubierta metálica, un fluoróforo, una partícula de látex coloreada. En algunas realizaciones, la nanopartícula metálica o nanocubierta metálica se selecciona de entre el grupo que consiste en partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas huecas de oro, nanocubiertas de sílice revestidas de oro, y cubiertas de oro revestidas de sílice.

15 Ciertos procedimientos que se proporcionan en el presente documento comprenden poner en contacto la muestra de ensayo con un segundo detector, en el que el segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo dicho antígeno o péptido antigénico capaz de unirse específicamente al anticuerpo. En algunas realizaciones, el primer y segundo detector se inmovilizan en una región de conjugado, en el que la región de conjugado no se solapa con la región de ensayo de la superficie. En ciertas realizaciones, la región de conjugado comprende adicionalmente un detector de control. El nivel de amplificación de señal se puede seleccionar ajustando la relación del primer detector con respecto al segundo detector. En ciertas realizaciones, la relación del primer detector con respecto al segundo detector es aproximadamente 20:1 a 1:20, más preferentemente de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1.

20 En realizaciones específicas, la primera y segunda entidades detectables son las mismas. En realizaciones más específicas, la primera y segunda entidades detectables ambas son nanopartículas de oro. En otras realizaciones, la primera y segunda entidades detectables son diferentes.

25 En ciertas realizaciones, la superficie es una vía de flujo en un dispositivo de ensayo de flujo lateral, una superficie de una placa de microtitulación o una vía de flujo en un rotor analítico.

30 Como se ha señalado anteriormente, ciertas realizaciones emplean un segundo detector que se conjuga con una entidad detectable, en el que el segundo detector es un antígeno o péptido antigénico. En algunas de estas relaciones y otras relacionadas, el antígeno o péptido antigénico es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusanos del corazón por ejemplo, gusano del corazón canino, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, virus de leucemia felina, parvovirus, por ejemplo, parvovirus canino, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.

35 En algunas realizaciones, la superficie es una vía de flujo en un dispositivo de ensayo de flujo lateral o una vía de flujo en un rotor analítico. En realizaciones particulares, la muestra de ensayo es sangre, suero o plasma.

40 También se incluyen dispositivos de detección de anticuerpo, que comprende una región de carga de muestra; una región de conjugado, en el que dicha región de conjugado comprende un primer detector movilizable que incluye una molécula de unión a Fc conjugada con una primera entidad detectable; y una región de ensayo, en el que dicha región de ensayo comprende una entidad de captura inmovilizada capaz de unirse específicamente al anticuerpo; en el que la región de carga de la muestra, la región del conjugado y la región de ensayo se configuran de manera que en la operación de una muestra líquida cuando se carga en la región de carga de muestra, está en comunicación fluida con la región de conjugado y la región de ensayo. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a Fc es la Proteína A y/o la proteína G.

45 En algunas realizaciones, la entidad de captura es un antígeno o péptido antigénico. En realizaciones particulares, el antígeno o péptido antigénico es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusanos del corazón por ejemplo, gusano del corazón canino, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, virus de leucemia felina, parvovirus, por ejemplo, parvovirus canino, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.

50 En realizaciones particulares, la primera entidad detectable es una nanopartícula, una nanocubierta metálica, fluoróforo, o partícula de látex coloreado. En realizaciones la nanopartícula metálica o nanocubierta metálica se selecciona de entre el grupo de partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas huecas de oro, nanocubiertas de sílice revestidas de oro, y cubiertas de oro revestidas de sílice.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende adicionalmente una región de control en comunicación fluida con

una muestra líquida cuando se carga en la región de carga de muestra. En ciertas realizaciones, la región de control comprende un equivalente de unión inmovilizado capaz de unirse específicamente a un detector de control.

En realizaciones particulares, el primer detector comprende la proteína A o proteína G conjugada con una primera entidad detectable y dicho equivalente de unión inmovilizado es un anticuerpo anti-proteína A o anti-proteína G.

5 Algunos dispositivos comprenden adicionalmente una placa adsorbente posicionada corriente abajo de la región de ensayo. En ciertos dispositivos, la región de conjugado se posiciona corriente arriba de la región de carga de la muestra. En algunas realizaciones, la región del conjugado se posiciona corriente abajo de la región de carga de la muestra. En algunas realizaciones, la región de carga de la muestra comprende un material separador de sangre. En ciertos casos la región del conjugado comprende adicionalmente un segundo detector movilizable, en el que el
10 segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo dicho antígeno o péptido antigénico capaz de unirse específicamente al anticuerpo. La relación del primer detector (por ejemplo, una molécula de unión a Fc, tal como una proteína A y/o proteína G, conjugada a una primera entidad detectable) al segundo detector (antígeno/péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable) se puede ajustar para seleccionar un nivel deseado de amplificación de señal. En algunas realizaciones,
15 la relación del primer detector respecto al segundo detector es aproximadamente de 20:1 a aproximadamente 1:20. En otras realizaciones, la relación del primer detector respecto al segundo detector es de aproximadamente 20:1 a 1:1.

En realizaciones particulares, la primera y segunda entidades detectables son la misma. En realizaciones específicas, la primera y segunda entidades detectables son nanopartículas de oro. En otras realizaciones, la
20 primera y segunda entidades detectables son diferentes.

En realizaciones particulares, por ejemplo, para la detección de anticuerpos antimicrobianos, el antígeno o péptido antigénico es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusano del corazón canino, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, virus de leucemia felina, parvovirus, por ejemplo, parvovirus canino, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.
25

También se incluyen kits que comprenden uno o más dispositivos y sistemas de detección descritos en el presente documento, e instrucciones para la utilización del dispositivo o sistema para detectar un anticuerpo en una muestra de ensayo. Ciertos kits comprenden adicionalmente un segundo detector y las instrucciones para la combinación del
30 segundo detector con la muestra de ensayo antes de la aplicación en la región de carga de la muestra del sistema de detección, en el que dicho segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo capaz dicho antígeno o péptido antigénico de unirse específicamente al anticuerpo. En algunas realizaciones, las instrucciones proporcionan la combinación del segundo detector con la muestra de ensayo de manera que el segundo detector estará presente en una relación particular con el primer
35 detector para conseguir un nivel deseado de amplificación de señal.

También se incluyen procedimientos de detección de un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende la aplicación de la muestra de ensayo en la región de carga de la muestra de uno o más de los dispositivos y sistemas de detección descritos en el presente documento, y la detección de la presencia o ausencia de una señal de la
40 primera entidad detectable de la región de ensayo. Algunos procedimientos comprenden adicionalmente la combinación de un segundo detector con la muestra de ensayo antes de la aplicación en la región de carga de la muestra del sistema de detección, en el que dicho segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo capaz dicho antígeno o péptido antigénico de unirse específicamente al anticuerpo.

Ciertas realizaciones se refieren a uno o más complejos de captura que comprenden una entidad de captura, un
45 anticuerpo en una muestra de ensayo, y un primer detector, en el que la entidad de captura se une al anticuerpo y en el que el primer detector comprende una molécula de unión a Fc conjugado con una primera entidad detectable y se une a la región Fc del anticuerpo. Ciertas de estas realizaciones relacionadas comprenden adicionalmente un segundo detector, en el que el segundo detector se une específicamente a la región variable del anticuerpo. En algunas realizaciones, el complejo de captura se inmoviliza en una región de ensayo sobre una superficie.

50 La invención se define por las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra un ejemplo de un complejo de captura de la invención, estando un anticuerpo de interés capturado por una entidad de captura (por ejemplo, un antígeno conjugado con BSA específico de anticuerpo) inmovilizado en una superficie de ensayo (por ejemplo, nitrocelulosa), un conjugado molécula de unión-Fc detectable (por ejemplo, un conjugado de proteína A o proteína G con oro coloidal) unido a la región Fc de un anticuerpo diana, y opcionalmente un segundo conjugado detectable (por ejemplo, un conjugado de antígeno con oro coloidal) unido a la región variable del anticuerpo de interés.
55

La **Figura 2** ilustra un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral, y el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Los péptidos antigénicos específicos de un anticuerpo de interés se unen al vehículo proteico de seroalbúmina bovina (BSA) y los conjugados BSA-péptido resultantes se utilizan como captura en nitrocelulosa. Este mismo péptido antigénico se conjuga adicionalmente con oro coloidal, que sirve como marcador en este ensayo ejemplar. La señal producida se amplifica entonces adicionalmente por adición del conjugado Proteína A/G-oro a la mezcla de conjugados.

La **Figura 3** ilustra el flujo de la muestra con el tiempo de un ensayo de flujo lateral específico de la enfermedad de Lyme, utilizando el dispositivo de flujo lateral que se muestra en la Figura 2. En este ensayo ejemplar, una gota de sangre, suero, o plasma (aproximadamente 15-20 µl mediante una pipeta de transferencia) se mezcla con cuatro gotas de solución de conjugado de oro coloidal (aproximadamente 30 µl de un frasco cuentagotas) en un tubo de reacción. Una gota de la mezcla de reacción resultante se transfiere al puerto de muestra del casete de ensayo que se coloca sobre una superficie plana. La placa de separación de sangre filtra las células sanguíneas de la sangre completa (véase la Figura 2). El plasma (o suero) y los complejos de conjugado con anticuerpo de *B. burgdorferi* migran hacia la membrana de nitrocelulosa que contiene las regiones de ensayo y de control. La aplicación de tres (3) gotas (aproximadamente 60 µl de un frasco cuentagotas) de tampón de caza (un minuto después de la aplicación de la muestra) mueve la mezcla completa a través de la nitrocelulosa hacia la placa absorbente superior que se mantiene empujando el líquido. Los anticuerpos específicos de *B. burgdorferi* presentes en una muestra positiva ya han formado un complejo con el conjugado de antígeno marcado con oro. El complejo anticuerpo-antígeno marcado se mueve hacia la línea de ensayo donde el antígeno inmovilizado captura los complejos de anticuerpo-antígeno marcado mediante el segundo sitio de unión en el anticuerpo. El conjugado Proteína A/G-oro presente en la mezcla de conjugado se une a la región Fc del anticuerpo diana y amplifica la señal de ensayo. El antígeno marcado libre y el resto de la mezcla de reacción pasa a través de la línea de control en la que el conjugado de Proteína A-oro es capturado por la captura de control que comprende un anticuerpo de pollo anti-Proteína A. En este caso, el dispositivo se lee a aproximadamente 8 minutos. La aparición de una línea roja en la zona de ensayo y una segunda línea roja en la zona de control indica la presencia de anticuerpo contra *B. burgdorferi*. La aparición de una línea solo en la línea de control indica la ausencia de anticuerpos contra *B. burgdorferi*. El ensayo se considera inválido si (a) la línea de ensayo aparece, pero no se forma la línea de control o (b) no se forman ni la línea de control ni la de ensayo.

Descripción detallada

Como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

Los artículos “un” y “una” se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

“Aproximadamente” significa una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos de que el contexto requiera otra cosa, las palabras “comprender”, “comprende” y “que comprende” se entenderá que implica la inclusión de una etapa o elemento establecido o un grupo de etapas o elementos por no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

“Que consiste en” significa que incluye, y se limita a, cualquiera de lo que sigue a la frase “que consiste en”. Por lo tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados se necesitan o son obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. “Que consiste esencialmente en” significa que se incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren o contribuyen en la actividad de acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan materialmente o no la actividad o acción de los elementos enumerados.

Los términos “péptido” y “polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos y de origen natural de los mismos. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos no de origen natural, tal como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural y derivados químicos de origen natural de los mismos.

Una cantidad “aumentada” o “incrementada” es opcionalmente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un aumento que sea aproximadamente de 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (incluyendo todos los números enteros, intervalos y decimales entre ellos y por encima de 1, por ejemplo 2,5, 3,6, 3,7, 3,8, etc.) la cantidad o valor (por ejemplo, la señal o valor tal como una puntuación de reactividad) relativos, por ejemplo, para un anticuerpo de ensayo llevado a cabo sin una molécula de unión a Fc

detectable. Un valor o cantidad “incrementados” o “aumentados” también puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más de aumento en la cantidad o valor relativo, por ejemplo, frente a un anticuerpo de ensayo llevado a cabo sin una molécula de unión a Fc detectable.

Procedimientos

En un aspecto, la presente invención incluye procedimientos para la detección de un anticuerpo en una muestra de ensayo. En ciertas realizaciones, estos procedimientos se refieren, en una parte pertinente, a poner en contacto la muestra de ensayo con una molécula de unión a Fc conjugado con una primera entidad detectable (es decir, un conjugado de molécula de unión-Fc detectable) para formar un primer complejo, poner en contacto el primer complejo con una entidad de captura inmovilizado en una región de ensayo de una superficie, en el que la entidad de captura es capaz de unirse específicamente al anticuerpo, y detectar la presencia de una señal del conjugado molécula de unión-Fc detectable en la región de ensayo. Aquí, la presencia de la señal es indicativa de la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo.

Los reactivos de estos procedimientos se pueden poner en contacto en cualquier orden o secuencia. Por ejemplo, la muestra de ensayo se puede mezclar con un conjugado de molécula de unión-Fc detectable antes de la aplicación en la superficie, o estos dos reactivos se pueden aplicar por separado en la superficie, secuencialmente o al mismo tiempo, en el mismo o diferente sitio sobre la superficie. Cuando se añaden por separado, los reactivos se pondrán en contacto entre ellos según se esparcen o fluyen a través de la superficie de ensayo., por ejemplo, por capilaridad u otra acción. En realizaciones particulares, el conjugado de molécula de unión-Fc detectable se inmoviliza de antemano a una región de conjugado de la superficie, que no se solapa con la región de ensayo de la superficie. En ciertas de estas realizaciones, la muestra de ensayo se puede aplicar en la superficie, en la que fluye mediante capilaridad u otra acción a través de la región de conjugado y la región de ensayo, y de esta manera pone en contacto la molécula de unión-Fc y la entidad de captura. Si está presente el anticuerpo de interés en la muestra, entonces formará un complejo detectable con la molécula de unión al Fc detectable y la entidad de captura. En realizaciones específicas, la molécula de unión a Fc es proteína A, proteína G, proteína A/G, proteína L o cualquier combinación de las mismas, por ejemplo, como una mezcla o una proteína de fusión de las mismas.

Ciertos procedimientos que se proporcionan en el presente documento comprenden adicionalmente poner en contacto la muestra de ensayo con una segunda molécula detectora. En estas realizaciones, el segundo detector puede ser cualquier entidad de unión al anticuerpo adecuada, por ejemplo, un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable y capaz de unirse específicamente al anticuerpo. La combinación, por ejemplo, a veces se hace referencia al conjugado del segundo detector y la segunda entidad detectable como un “conjugado de antígeno específico de anticuerpo detectable” o un “conjugado de antígeno detectable”, que incluye péptidos antigénicos y antígenos no peptídicos. En algunas realizaciones, la primera y segunda entidades detectables son la misma, es decir, el conjugado de molécula de unión a Fc y el conjugado de antígeno detectable se conjugan con el mismo tipo de entidad detectable, tal como una partícula de oro. En otras realizaciones, la primera y segunda entidades detectables son diferentes. En realizaciones específicas, la primera y segunda entidades detectables son ambas nanopartículas de oro, para crear conjugados de oro coloidal (CGC). En estas realizaciones y relacionadas, se puede hacer referencia a la molécula de unión a Fc detectable como una “molécula de unión a Fc-CGC”, ejemplos específicos incluyen Proteína A-CGC, Proteína G-CGC, Proteína A/G-CGC, y proteína L-CGC. En algunas realizaciones, la molécula de unión a FC es un anticuerpo secundario o un fragmento del mismo capaz de unirse a la región Fc del anticuerpo de la muestra de ensayo mientras que el segundo detector puede ser cualquier entidad de unión al anticuerpo adecuada, por ejemplo, un antígeno o antígeno peptídico, etc.

Al igual que anteriormente, los reactivos en estos procedimientos pueden ponerse en contacto en cualquier orden o secuencia. Como un ejemplo, una muestra de ensayo se puede mezclar con el conjugado de molécula de unión-Fc detectable, el conjugado de antígeno detectable, o ambos, antes de la aplicación en la superficie, o estos tres reactivos se pueden aplicar por separado en la superficie, secuencialmente o al mismo tiempo, en el mismo o diferente lugar de la superficie. Cuando se añaden por separado, los reactivos se pondrán en contacto entre ellos según se esparcen o fluyen a través de la superficie de ensayo, por ejemplo, por capilaridad u otra acción.

En algunas realizaciones, el conjugado de molécula de unión-Fc se inmoviliza en una región de conjugado de la superficie, que no se solapa con la región de ensayo, y la muestra de ensayo y el conjugado de antígeno detectable se aplican por separado o juntos en la superficie. En otras realizaciones, el conjugado de antígeno detectable se inmoviliza en una región de conjugado de la superficie, que no se solapa con la región de ensayo, y la muestra de ensayo y el conjugado de molécula de unión-Fc detectable se aplican por separado o juntos en la superficie. En ciertas realizaciones, el conjugado de molécula de unión a Fc detectable y el conjugado de antígeno detectable se inmovilizan en una región de conjugado de la superficie, que no se solapa con la región de ensayo de la superficie, y la muestra de ensayo se aplica en la superficie de ensayo. Después de la aplicación en la superficie, la muestra de ensayo (sola o en combinación con los otros reactivos), puede fluir o esparcirse a través de la superficie mediante capilaridad u otra acción, a través de la región de conjugado (si está presente) y la región de ensayo, y poniendo en contacto de esta manera el conjugado de molécula de ensayo-Fc detectable, el conjugado de antígeno detectable, y la entidad de captura. Si está presente el anticuerpo de interés en la muestra, se formarán uno o más complejos

detectables con estos reactivos, y de esta manera se indica la presencia del anticuerpo en la muestra. Los expertos en la técnica se darán cuenta que estas combinaciones ejemplares son no limitantes, y que son posibles otras posibilidades.

5 En ciertas realizaciones, la región de conjugado comprende adicionalmente un detector de control, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a la molécula de unión al Fc. Otros tipos de regiones de control serán evidentes para los expertos en la técnica.

Una muestra de ensayo es habitualmente una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene o se sospecha que tenga un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo que es específico de un agente infeccioso. Una muestra biológica es preferentemente que sea fácil de obtener y puede incluir sangre, suero o plasma derivados de una muestra de sangre venosa o incluso de un pinchazo en el dedo. El tejido de otras partes del cuerpo u otros fluidos corporales, tales como el líquido cefalorraquídeo (LCR), saliva, secreciones gástricas, mucus, orina, heces, etc., que se sabe que contienen anticuerpos y pueden utilizarse como fuente de una muestra de ensayo. En otras realizaciones, la muestra es un tejido (por ejemplo, un homogenado de tejido), extracto de un órgano corporal, o un lisado celular. En ciertas realizaciones, el sujeto es un animal silvestre (por ejemplo, un ciervo o roedor, tal como un ratón, ardilla listada, ardilla, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal de laboratorio (por ejemplo, un ratón, rata, cobaya, conejo, mono, primate, etc.). En otras realizaciones, el sujeto es un animal domesticado o salvaje (por ejemplo, un perro, un gato, un caballo). En otras realizaciones más, el sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo, al que también se hace referencia como inmunoglobulina, es una proteína en forma de Y del sistema inmunitario que identifica objetos ajenos o antígenos, tal como los componentes de bacterias, levaduras, parásitos y virus. Cada brazo de la 'Y' de un anticuerpo contiene un sitio de unión al antígeno que es específico para un epítipo particular de un antígeno, permitiendo que estas dos estructuras se unan entre ellas con precisión. La producción de un anticuerpo determinado aumenta al exponerse a un antígeno (por ejemplo, un antígeno microbiano) que interactúa específicamente con ese anticuerpo. Por lo tanto, la detección de anticuerpos específicos de antígeno en una muestra de un sujeto puede informar de si ese sujeto está actualmente expuesto, o se había expuesto anteriormente a un microbio determinado, tal como un virus, bacteria, hongo, o parásito.

El fragmento de la región cristizable (región Fc) es la región de la cola de un anticuerpo que interactúa con la superficie de los receptores Fc y ciertas proteínas del sistema de complemento. En los isotipos de anticuerpo IgG, IgA, e IgD, la región Fc está compuesta por dos fragmentos proteicos idénticos, derivados del segundo y tercer dominio constante de las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Las regiones Fc de IgM e IgE contienen tres dominios constantes de cadena pesada (dominios CH 2-4) en cada cadena polipeptídica. Las regiones Fc de los anticuerpos IgG tienen un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Los N-glicanos unidos a este sitio son estructuras diantennarias fucosiladas predominantemente centrales. Además, pequeñas cantidades de estos N-glicanos también albergan GlcNAc bisectantes y restos de ácido siálico unidos α -2,6. La región Fab de un anticuerpo contiene secciones variables que define la especificidad a la diana el anticuerpo, y, por el contrario, la región Fc de los anticuerpos de una clase es la misma para cada especie; es más bien constante que variable.

Un "sitio de unión al antígeno" o "parte de unión" de un anticuerpo se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por restos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del extremo N de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Se hace referencia a tres tramos altamente divergentes de las regiones V de cadenas pesada y ligera como "regiones hipervariables" que se interponen entre los tramos más conservados que las flanquean conocidos como "regiones marco conservadas", o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre regiones hipervariables adyacentes en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen unas respecto a las otras en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria de la superficie tridimensional de un antígeno unido, y se hace referencia a las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera como "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR".

Un anticuerpo comprende normalmente toda o una parte de una región Fc, para facilitar la detección mediante una molécula de unión a Fc, y también puede comprender uno o más sitios de unión al antígeno, para facilitar la detección por un agente de unión específico de anticuerpo, tal como un antígeno o péptido antigénico. Los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, del tipo IgG, IgE, IgM, o IgA. En general, los anticuerpos IgM y/o IgA se detectan, por ejemplo, por detección en estadios tempranos de la infección.

Una molécula de unión a Fc incluye cualquier agente de unión que se una específicamente a la región Fc de un anticuerpo o cualquier región que esté fuera de la región variable de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, una molécula de unión a Fc no es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. En otras realizaciones, la molécula de unión a Fc es un anticuerpo secundario específico de Fc, por ejemplo, un anticuerpo de conejo anti-perro, un anticuerpo de cabra anti-perro. En ciertas realizaciones, una molécula de unión a Fc es un anticuerpo secundario contra el anticuerpo que se va a detectar en una muestra de ensayo. Ejemplos generales de moléculas de unión a Fc incluyen polipéptidos, receptores solubles, adnectinas, péptidos pequeños miméticos de péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros, etc., que se unen específicamente a la región Fc de una inmunoglobulina.

Ejemplos específicos de moléculas de unión a Fc incluyen, Proteína A, Proteína G, proteínas de fusión Proteína A/G, Proteína L, y fragmentos y variantes de las mismas que mantengan la capacidad para unirse específicamente a la región Fc de un anticuerpo.

5 La proteína A es una proteína de superficie de los MSCRAMM (componentes de la superficie microbiana que reconoce moléculas de la matriz adhesiva) de 40-60 kDa que se encuentra en la pared celular de *Staphylococcus aureus*, y se codifica por el gen spa. La Proteína A de tipo silvestre está compuesta por cinco dominios de unión a la Ig que se pliegan en tres protuberancias helicoidales, y que se pueden unir individualmente a las regiones Fc de un anticuerpo. La Proteína A se une con alta afinidad a la IgG1 e IgG2 humanas y con afinidad moderada a IgM, IgA e IgE humanas.

10 La proteína G es una proteína de unión a inmunoglobulinas que se expresa en bacterias estreptocócicas del grupo C y G (véase, por ejemplo, Sjobring y col., *J Biol Chem.* 266: 399-405, 1991). La estructura de solución NMR (véase Lian y col., *Journal of Mol. Biol.* 228:1219-1234, 1992) y la estructura cristalina (véase Derrick y Wigley, *Journal of Mol. Biol.* 243:906-918, 1994) se han resuelto a 1 Angstrom. La Proteína A y la Proteína G se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado en una variedad de formas conjugadas y no conjugadas.

15 También se incluyen las variantes y fragmentos funcionales de las versiones de longitud completa o tipo silvestre de la Proteína A y la Proteína G. En ciertas realizaciones, una variante polipeptídica incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más de identidad o similitud con la secuencia de Proteína A y/o Proteína G de tipo silvestre. Un fragmento funcional puede ser un fragmento polipeptídico que tenga, por ejemplo, 20 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 450, 500 o más restos contiguos o no contiguos de la Proteína A y/o Proteína G de tipo silvestre. Las variantes y fragmentos de la Proteína A y la Proteína G normalmente mantienen la unión específica para la región Fc de uno o más isotipos de inmunoglobulina.

25 El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y hay varios procedimientos para medir la identidad en ter dos secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas. Véase, por ejemplo, Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin y Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); y Gribskov y Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991). Los procedimientos para alinear polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas de computadora 30 incluyendo el paquete de programas GCG (Devereux y col., *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul y col., *J Molec. Biol.* 215:403 (1990)), y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711) que utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. App. Math.*, 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, 35 se puede utilizar el programa de computadora ALIGN que emplea el algoritmo FASTA, con una búsqueda de huecos afín con penalización abierta de huecos de -12 y una penalización de extensión de huecos de -2.

También se contemplan las proteínas de fusión que comprenden polipéptidos de unión a Fc, incluyendo las fusiones de Proteína A y las fusiones de Proteína G. Las moléculas de unión a Fc se pueden utilizar para fusionarse con toda 40 o una parte de otra molécula de unión a Fc, o a uno o más polipéptidos heterólogos. Un ejemplo de una fusión de Proteína A/G combina cuatro dominios de unión a Fc de la Proteína A con dos de la Proteína G (véase, por ejemplo, Sikkema, J.W.D., *Amer. Biotech. Lab.* 7:42, 1989; y Eliasson y col., *J. Biol. Chem.* 263, 4323-4327, 1988); sin embargo, se pueden utilizar otras combinaciones. Las parejas de fusión (por ejemplo, un péptido u otro resto) se pueden utilizar para mejorar la purificación, mejorar la solubilidad, aumentar la expresión del polipéptido en una 45 célula huésped, ayudar a la detección y estabilizar el polipéptido, etc. Ejemplos de parejas de fusión incluyen vehículos proteicos (por ejemplo, seroalbúmina, tal como la seroalbúmina bovina), beta-galactosidasa, glutatión-S-transferasa, marcadores de histidina, etc.

Una entidad de captura puede ser cualquier agente de unión que se una específicamente a un anticuerpo de interés, es decir, un anticuerpo diana, tal como un anticuerpo específico de un microbio, que se va a detectar por los 50 procedimientos y dispositivos descritos en el presente documento. Normalmente, la entidad de captura se une específicamente a la región variable de un anticuerpo, y, por lo tanto, contiene uno o más epítomos que son específicos para del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, una entidad de captura no es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En realizaciones particulares, una entidad de captura es un antígeno o un péptido antigénico que se une específicamente a un anticuerpo de interés. Se describen 55 posteriormente antígenos y péptidos antigénicos ejemplares. También se incluyen receptores solubles, adnectinas, miméticos de péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros, etc., que se unen específicamente a un anticuerpo de interés, es decir, un anticuerpo que se va a detectar de acuerdo con los procedimientos que se proporcionan en el presente documento.

60 Como se ha señalado anteriormente, una entidad de captura se une o se inmoviliza en una superficie de ensayo o sustrato, tal como un soporte sólido o semisólido. La unión puede ser covalente o no covalente, y se puede facilitar

mediante un resto asociado con la entidad de captura que hace posible el enlace covalente o no covalente, tal como un resto que tenga una alta afinidad a un componente unido al vehículo, soporte o superficie. Por ejemplo, una entidad de captura se puede asociar con un ligando, tal como la biotina, y el componente asociado con la superficie puede ser un receptor del ligando correspondiente, tal como la avidina. De manera alternativa, una entidad de
 5 captura se puede asociar con un receptor del ligando, tal como la avidina, y el componente asociado con la superficie puede ser un ligando correspondiente tal como la biotina. La entidad de captura se puede unir o inmovilizar en la superficie o sustrato de ensayo antes o después de la adición de una muestra que contenga el anticuerpo durante un inmunoensayo.

En realizaciones particulares, la superficie de ensayo es una perla, una transferencia puntual, una vía de flujo en un dispositivo de ensayo de flujo lateral, o una vía de flujo en un rotor analítico. Por ejemplo, la entidad de captura se
 10 puede unir o inmovilizar en una membrana porosa, tal como una membrana de PVDF (por ejemplo, una membrana Immobilon™), una membrana de nitrocelulosa, membrana de polietileno, membrana de nilón, o un tipo de membrana similar. En otras realizaciones, la superficie o sustrato de ensayo es un tubo o un pocillo, tal como un pocillo en una placa (por ejemplo, una placa de microtitulación) adecuada para su uso en un ELISA u otro ensayo
 15 tipo sándwich. En algunas realizaciones, la superficie o sustrato de ensayo es un sensor tal como un sensor electroquímico, óptico, u optoelectrónico.

Dichas superficies o sustratos de ensayo pueden comprender cristal, materiales basados en celulosa, polímeros termoplásticos, tales como polietileno, polipropileno, o poliéster, estructuras sinterizadas compuestas de materiales
 20 particulados (por ejemplo, vidrio o distintos polímeros termoplásticos), o una película de membrana fundida compuesta de nitrocelulosa, nilón, polisulfona, o similares. Una superficie o sustrato de ensayo puede ser sinterizado, de partículas finas de polietileno, que se conoce comúnmente como polietileno poroso, por ejemplo, polietileno poroso de 0,2-15 micrómetros de Chromex Corporation (Albuquerque, NM), Porex™, etc. Todos estos materiales de superficie o sustrato de ensayo se pueden utilizar con formas adecuadas, tales como películas,
 25 láminas o placas, o se pueden revestir o unir o laminar a vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico o cerámicos.

Los procedimientos adecuados para inmovilizar las entidades de captura tales como péptidos en una fase sólida incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. La unión específica o semi-específica a un
 30 vehículo, soporte o superficie sólidos o semi-sólidos, se puede conseguir por la entidad de captura que tiene, asociado con ella, un resto que hace posible su unión covalente o no covalente con el vehículo, soporte o superficie sólidos o semisólidos. Por ejemplo, el resto puede tener afinidad a un componente unido al vehículo, soporte o superficie. En este caso, el resto puede ser, por ejemplo, una biotina o grupo biotínico o un análogo de los mismos que se une a un grupo aminoácido del péptido, tal como un ácido 6-aminohexanoico, y el componente es entonces
 35 avidina, estreptavidina, neutravidina, o un análogo de los mismos. Una alternativa es la situación en la que el resto tiene una secuencia de seis restos de histidina consecutivos (por ejemplo, un marcador 6-His) y el vehículo comprende un derivado del ácido nitriloacético (NTA) cargado con iones Ni²⁺ o Co²⁺. Adicionalmente a lo anterior, los vehículos, soportes y superficies adecuados incluyen, pero no se limitan a, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, partículas coloidales o nanopartículas, tales como de oro coloidal, o nanopartículas que comprenden sílice, látex, poliestireno, policarbonato, o PDVF), látex o copolímeros tales como estireno-divinil benceno, estireno
 40 hidroxilatado-divinil benceno, poliestireno, poliestireno carboxilado, perlas de carbono negro, cristal activado, o no activado o poliestireno o cloruro de polivinilo, cristal magnético poroso activado-epoxi, partículas de gelatina o polisacáridos u otras partículas proteicas.

Como se ha señalado anteriormente, los antígenos o péptidos antigénicos se pueden utilizar como entidades de
 45 captura y/o como detectores específicos de anticuerpos. Un antígeno o péptido antigénico seleccionado es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo, más a menudo mediante uno o ambos sitios de unión al antígeno del anticuerpo. Por lo tanto, el término "antígeno" como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula capaz de unirse específicamente a un anticuerpo mediante al menos un sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Un antígeno puede comprender uno o más epítomos, la región contigua(s) o no contigua(s) particular del antígeno que se une al sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Un epítomo puede ser un epítomo lineal, epítomo secuencial, o un epítomo conformacional.

Un antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido o una forma modificada del mismo, o un antígeno no peptídico tal
 50 como una molécula pequeña. Como se ha señalado anteriormente, los antígenos pueden incluir también receptores solubles, adnectinas, miméticos de péptidos, moléculas pequeñas, aptámeros, etc., que se unen específicamente a un anticuerpo de interés.

Cuando se utilizan como entidades de captura, o "antígenos de captura". Los antígenos o péptidos antigénicos están
 55 habitualmente sin marcar y se inmovilizan o se adhieren de otra manera a una superficie de ensayo. Para ciertas realizaciones, los antígenos de captura se pueden fusionar o conjugar o formar complejos con una o más proteínas heterólogas, tales como albúmina sérica bovina o péptidos antigénicos múltiples (MAPS), para facilitar la unión a la superficie de ensayo u otro fin.

Para su uso como detectores específicos de anticuerpo, los antígenos o péptidos antigénicos habitualmente se
 60 conjugan con una entidad detectable y forman de esta manera un "conjugado de antígeno detectable". En ciertas

realizaciones, estos conjugados de antígeno detectables también se fusionan o conjugan o forman complejos con una o más proteínas heterólogas tales como la seroalbúmina bovina o MAPS. Los conjugados de antígeno detectables se pueden diseñar para la detección directa o indirecta, como se describe posteriormente.

5 También se contemplan las proteínas de fusión que comprenden péptidos antigénicos. Los péptidos antigénicos se pueden fusionar a todo o una parte de uno o más péptidos antigénicos que tengan la misma o diferente especificidad de unión (por ejemplo, que tengan uno o más del mismo o diferentes epítomos), o a uno o más polipéptidos heterólogos. Las parejas de fusión (por ejemplo, un péptido u otro resto) se pueden utilizar para mejorar la purificación, mejorar la solubilidad, aumentar la expresión del péptido en una célula huésped, ayudan a la detección, estabilizan el péptido antigénico, facilita la inmovilización en una superficie de ensayo, etc. Los ejemplos de parejas
10 de fusión incluyen vehículos proteicos (por ejemplo, albúmina sérica, tal como albumina sérica bovina), beta-galactosidasa, glutatión-S-transferasa, marcadores de histidina, etc.

Los antígenos y péptidos antigénicos y otros agentes de unión específicos de un anticuerpo se pueden derivar de una variedad de fuentes. Realizaciones particulares incluyen los que se derivan de fuentes microbianas, incluyendo virus, bacterias, hongos y parásitos. Ejemplos específicos incluyen antígenos que son de uno cualquiera o más de
15 gusanos del corazón por ejemplo, gusano del corazón canino, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, virus de leucemia felina, parvovirus, por ejemplo, parvovirus canino, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), *Legionella*, adenovirus, *Streptococcus* Grupo A, virus de inmunodeficiencia felina (VIF), rotavirus, etc. Ejemplos de antígenos de *Borrelia* para la detección de anticuerpos de la enfermedad de Lyme se pueden encontrar en el
20 documento US2013115634, Publicación de Patente de EE. UU. N.º US 2011/0136155, y documento WO 2011/063003.

Los péptidos antigénicos para su uso de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento se pueden preparar por síntesis química (es decir, un “péptido sintético”). En otras realizaciones, los péptidos antigénicos se pueden producir biológicamente (es decir, por la maquinaria celular, tal como un ribosoma). En
25 ciertas realizaciones, los péptidos antigénicos se aíslan. Como se utiliza en el presente documento, un péptido aislado es un péptido que se ha producido sea sintética o biológicamente y entonces se purifica, al menos parcialmente, a partir de química y/o la maquinaria celular utilizada para producir el péptido. En ciertas realizaciones, un péptido aislado se purifica sustancialmente. La expresión “sustancialmente purificado”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula, tal como un péptido, que está sustancialmente libre de material celular (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc.), medio de cultivo, precursores químicos, productos
30 químicos utilizados en la síntesis del péptido, o combinaciones de los mismos. Un péptido que está sustancialmente purificado tiene menos de aproximadamente un 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 % o menos de material celular, medio de cultivo, otros péptidos, precursores químicos, y/o químicos utilizados en la síntesis del péptido. En consecuencia, una molécula sustancialmente pura, tal como un péptido, puede ser de al menos
35 aproximadamente un 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 %, por peso seco, de la molécula de interés. Un péptido aislado puede ser en agua, un tampón o en forma seca en espera de reconstitución, por ejemplo, como parte de un kit. Un péptido aislado puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ácidos y bases adecuados que son capaces de formar sales condichos péptidos son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen ácidos y bases orgánicos e inorgánicos.

40 Un anticuerpo de interés, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se dice que se “une específicamente”, se “une inmunológicamente”, y/o es “inmunológicamente activo” contra una entidad de captura o detector específico de anticuerpo (por ejemplo, antígeno o péptido antigénico) si reaccione en un nivel detectable (en, por ejemplo, un ensayo de flujo lateral, transferencia de Western, o ELISA) con la entidad o detector, y no reacciona detectablemente de una manera estadísticamente significativa con polipéptidos o agentes no relacionados en
45 condiciones similares. La expresión “se une específicamente” también puede significar que la entidad de captura o detector específico de anticuerpo tiene una afinidad mayor (por ejemplo, un mayor grado de selectividad) por un anticuerpo de interés que por otros anticuerpos de la muestra.

La unión inmunológica, como se utiliza en este contexto, se refiere en general a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula e inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es
50 específica. La fuerza, o afinidad de unión tal como las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en el que una K_d menor representa una mayor afinidad. Las propiedades de la unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Davies y col., Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990). En ciertas realizaciones ilustrativas, un anticuerpo tiene una afinidad por una entidad de captura o un detector
55 específico de anticuerpo (por ejemplo, un antígeno o péptido antigénico) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, o 50 nM. Como otro ejemplo, una entidad de captura o detector específico de anticuerpo puede tener una afinidad por el anticuerpo de al menos 1,5 veces, 2 veces, 2,5 veces, 3 veces, o más que por otros anticuerpos en la muestra.

60 De manera similar, se dice que una molécula de unión a Fc se “une específicamente” a una región Fc de una inmunoglobulina a un nivel detectable con la región FC, y no reacciona detectablemente de manera

estadísticamente significativa con polipéptidos o agentes no relacionados en condiciones similares. En algunas realizaciones ilustrativas, aproximadamente de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, o 50 nM. Ciertas moléculas de unión a Fc tienen una afinidad más fuerte o más débil por uno o más isotipos de globulina con respecto a otros.

- 5 Dicha afinidad o grado de especificidad se puede determinar mediante una variedad de procedimientos de rutina incluyendo, por ejemplo, estudios de unión competitiva. En un ensayo ELISA, se define una respuesta positiva como un valor que es 2 o 3 desviaciones típicas mayor que el valor medio de un control o grupo de controles.

Como se ha señalado anteriormente, ciertas moléculas detectoras tales como moléculas de unión al Fc, antígenos, y/o péptidos antigénicos se conjugan con una entidad detectable. La conjugación se consigue normalmente por unión covalente. Las entidades detectables incluyen "entidades detectables directamente", tal como las nanopartículas metálicas, nanocubiertas metálicas, partículas de látex coloreadas, radioisótopos, y fluoróforos, y "entidades detectables indirectamente", que a menudo se basa en interacciones ligando-receptor para conseguir la señalización. En el primer caso, la molécula detectora (por ejemplo, péptido antigénico, molécula de unión al Fc tal como una Proteína A/G) se conjuga con la entidad detectable directamente. En el último caso, la molécula detectora se conjuga con un ligando, que entonces interactúa con su ligando-receptor, estando el último conjugado con una entidad detectable directamente – o viceversa. Ejemplos de ligandos incluyen biotina (por ejemplo, mediante un resto de cisteína o lisina), moléculas lipídicas (por ejemplo, mediante un resto de cisteína), y vehículos proteicos (por ejemplo, seroalbúmina). La unión a los ligandos, tales como biotina, pueden ser útiles para la asociación del detector con receptores de ligando, tal como avidina, estreptavidina o neutravidina. La avidina, estreptavidina, neutravidina, a su vez, se pueden unir a una entidad detectable directamente (por ejemplo, un resto de señalización que se puede visualizar, tal como oro coloidal, resto fluorescente, o una enzima tal como peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina). De manera alternativa, las moléculas detectoras se pueden fusionar o unir a un receptor de ligando tal como avidina, estreptavidina, o neutravidina, facilitando de esta manera una asociación con el ligando correspondiente que, a su vez, se une a una entidad detectable directamente. Ejemplos de otros pares ligando-receptor son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar de manera similar.

Ejemplos de entidades detectables directamente (o restos de señalización) incluyen radioisótopos, fluoróforos, colorantes, enzimas, nanopartículas, partículas de látex coloreados, marcadores quimioluminiscentes, colorantes emisores de luz, y otros que se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

Ejemplos de radioisótopos que se pueden utilizar como entidades detectables directamente incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H , y ^{125}I . Estos radioisótopos tienen diferentes semividas, tipos de desintegración, y niveles de energía que se pueden ajustar para cumplir las necesidades de un protocolo particular. Por ejemplo, el ^3H es un emisor de baja energía que da como resultado bajos niveles de fondo, sin embargo, esta baja energía también da como resultado largos periodos de tiempo para la autorradiografía y otras mediciones.

Ejemplos de fluoróforos o fluorocromos que se pueden utilizar como entidades detectables directamente incluyen fluoresceína, tetrametilrodamina, Rojo Texas, y varios otros (por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes – 9^a Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies – 10^a Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA). También se incluyen colorantes emisores de luz o detectables de otra manera. La luz emitida por los colorantes puede ser luz visible o luz invisible, tal como luz ultravioleta o luz infrarroja. En realizaciones ejemplares, el colorante puede ser un colorante de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET); un colorante de xanteno, tal como fluoresceína y rodamina; un colorante que tiene un grupo amina en la posición alfa o beta (tal como colorante de naftilamina, 5-sulfonato de 1-dimetilamionaftilo, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno y sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno; un colorante que tenga 2-fenil-7-isocianato de cumarina; una acridina, tal como 9-isotiocianato de acridina y naranja acridina; un pireno, un benzoxadiazol y estilbeno, un colorante que tiene 3-(ϵ -carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CYA); 6-carboxi fluoresceína (FAM); 5&6-carboxirrodamina-110 (R110); 6-carboxirrodamina-6G (R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Rojo Texas y Rojo Rodamina; 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; y Cy7.5; IR800CW, ICG, Alexa Flúor 350; Alexa Flúor 488; Alexa Flúor 532; Alexa Flúor 546; Alexa Flúor 568; Alexa Flúor 594; Alexa Flúor 647; Alexa Flúor 680, o Alexa Flúor 750.

Las partículas muy pequeñas, llamadas nanopartículas, también se pueden utilizar como entidades detectables directamente. Estas partículas, habitualmente varían de 1-1000 nm de tamaño e incluyen diversas estructuras químicas tal como partículas de oro y plata y puntos cuánticos. Cuando se irradian con una luz blanca con incidencia angular, las nanopartículas de plata u oro que varían de aproximadamente 4-120 nm dispersarán una luz monocromática con alta intensidad, la longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. Cuatro a cinco partículas diferentes en estrecha proximidad dispersarán cada una luz monocromática, que cuando se superponen darán un color específico único. Las nanopartículas derivadas tales como las partículas de plata u oro se pueden unir en una matriz amplia de moléculas que incluyen, proteínas, anticuerpos, moléculas pequeñas, receptores de ligando, y ácidos nucleicos. Ejemplos específicos de nanopartículas incluyen nanopartículas metálicas y nano cubiertas metálicas tales como las partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de

platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas huecas de oro, nanocubiertas de sílice revestidas de oro, y cubiertas de oro revestidas de sílice. También se incluyen sílice, látex, poliestireno, policarbonato, poliacrílico, nanopartículas PVDF, y partículas coloreadas de cualquiera de estos materiales.

5 Los puntos cuánticos también se pueden utilizar como entidades detectables directamente. Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes de 1-5 nm de diámetro que son excitables por la luz sobre un gran intervalo de longitudes de onda. Al excitarse con la luz que tiene una longitud de onda apropiada estos cristales emiten luz, tal como una luz monocromática con una longitud de onda que depende de su composición química y tamaño. Los puntos cuánticos tales como CdSe, ZnSe, InP, o InAs poseen propiedades ópticas únicas; estos y puntos cuánticos similares están disponibles en varias fuentes comerciales (por ejemplo, NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR; Nanoco Technologies, Manchester, RU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

10 La detección de la presencia de una señal puede conseguirse por cualquier medio apropiado para el marcador o entidad detectable que se emplee en el ensayo. Por ejemplo, la etapa de detección puede incluir la inspección visible del complejo de captura en cuanto a un cambio de color, o la inspección del complejo de captura en cuanto a un cambio fisicoquímico. Los cambios fisicoquímicos pueden producirse por reacciones de oxidación u otras reacciones químicas. Se pueden detectar a simple vista, utilizando un espectrofotómetro, o similares.

15 Una señal es normalmente indicativa de la presencia de un anticuerpo de interés cuando es más fuerte que la señal del control negativo; sin embargo, no todos los ensayos necesitan un control negativo. En algunos casos, pero no necesariamente, la fuerza de una señal positiva se puede cuantificar numéricamente y es indicativa de la presencia del anticuerpo cuando esa fuerza es estadísticamente significativa con respecto a un control. En algunos casos, el conocimiento de rutina y la experiencia en un tipo de ensayo en particular establece cuándo una señal es positiva o negativa, y de esta manera indica la presencia o ausencia de un anticuerpo de interés.

20 Como un ejemplo, la señal de ciertos dispositivos de ensayo de flujo lateral se puede medir de acuerdo a la puntuación de Reactividad, una puntuación de 0 a-5 (incluyendo los decimales entre ellas) en el que la señal más positiva y más fuerte da una puntuación con un número más alto. Un control negativo tendrá normalmente una puntuación que es cercana a cero, por ejemplo, aproximadamente de 0,25 o menos.

25 La detección de la señal se puede optimizar, por ejemplo, ajustando la realización de los reactivos individuales. Un ejemplo incluye ajustar la relación de (i) el conjugado de molécula de unión-Fc detectable y (ii) el conjugado de antígeno/péptido antigénico detectable de la siguiente manera: una relación (por ejemplo, una relación molar) de (i):(ii) de aproximadamente 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, o 200:1, que incluye todas las relaciones e intervalos de relaciones entre ellas. En algunas realizaciones, la relación del conjugado de molécula de unión-Fc detectable respecto a un conjugado antígeno/péptido antigénico detectable es desde aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, preferentemente de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, y más preferentemente desde aproximadamente 16:1 a aproximadamente 2:1. En ciertas realizaciones, la molécula de unión a Fc en el conjugado detectable es la Proteína A, Proteína G, las proteínas de fusión Proteína A/G, Proteína L, o fragmentos y variantes de las mismas que mantengan la capacidad para unirse específicamente a la región Fc de un anticuerpo.

30 En algunas realizaciones, se utiliza una mezcla de Proteína A y proteína G como los conjugados de molécula de unión a Fc, en el que cada proteína A y proteína G se conjugan con una entidad detectable. En dichas realizaciones cuando la proteína A y la proteína G se utilizan ambas como el conjugado de molécula de unión a Fc detectable, la detección de la señal se puede optimizar alterando la relación de proteína A respecto a proteína G dependiendo del tipo de clase de inmunoglobulina que se va a detectar. Como se ha explicado *supra*, la proteína A y la proteína G tienen diferentes afinidades de unión por las regiones Fc de diferentes clases de inmunoglobulinas (por ejemplo, de IgG, IgE, IgD, IgM o IgA). En consecuencia, la relación de proteína respecto a proteína G se puede ajustar basándose en la clase de inmunoglobulina que se desee detectar. A modo de ejemplo, si se desea detectar predominantemente inmunoglobulinas IgM, se puede utilizar una relación menor de proteína A con respecto a proteína G (es decir, una cantidad mayor de conjugado con proteína A con respecto al conjugado con proteína G). Relaciones ejemplares (por ejemplo, relaciones molares) de conjugados con proteína A respecto a proteína G incluyen, pero no se limitan a, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, y 20:1. En algunas realizaciones, la relación de conjugado con proteína A respecto a conjugado con proteína G es desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, y más preferentemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2. En una realización, la relación de conjugado con proteína A respecto a conjugado con proteína G es aproximadamente de 1:1.

55 En ciertas realizaciones, la detección de la señal puede optimizarse adicionalmente ajustando las relaciones de proteína respecto a proteína G en relación con la cantidad de conjugados con antígenos/péptidos antigénicos detectables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación (por ejemplo, relación molar) de conjugado con proteína A respecto a conjugado con proteína G con respecto al conjugado con antígeno/péptido antigénico detectable puede ser desde aproximadamente 20:20:1 a aproximadamente 1:1:20, desde aproximadamente 10:10:1

a aproximadamente 2:2:1, o desde aproximadamente 4:2:1 a aproximadamente 1:2:1.

Los protocolos para los inmunoensayos que utilizan antígenos para la detección de anticuerpos específicos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo sándwich convencional, o se puede utilizar un formato de ensayo competitivo convencional. Para una exposición de algunos tipos de ensayo adecuados, véase

5 Current Protocols in Immunology (Coligan y col., editores, John Wiley & Sons, Inc). En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende llevar a cabo un inmunoensayo de flujo lateral. En ciertas realizaciones la etapa de detección comprende llevar a cabo un ensayo ELISA. En otras realizaciones, la etapa de detección comprende centrifugar la muestra en un rotor analítico. En otras realizaciones más, la etapa de detección comprende el análisis de la muestra con un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico.

10 Un formato de ensayo particularmente útil es un formato de inmunoensayo de flujo lateral. Como un ejemplo no limitante, las moléculas indicadoras o detectoras que incluyen una molécula de unión a Fc (por ejemplo, Proteína A y/o G) y opcionalmente un antígeno específico de anticuerpo se marcan con una entidad detectable (por ejemplo, oro coloidal) y entonces se secan y se colocan en una placa de fibra de vidrio (la placa de aplicación de la muestra o placa de conjugado). El antígeno o péptido antigénico no marcado (es decir, la entidad de captura) se inmoviliza en

15 una membrana, tal como una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (fluoruro de polivinilideno) (por ejemplo, la membrana Immobilon™. Cuando una solución de muestra (de sangre, suero, etc.) se aplica en la placa de aplicación de la muestra (o fluye a través de la placa de conjugado), disuelve los detectores marcados, que se unen entonces a los anticuerpos en la muestra, si están presentes. Los complejos resultantes se transportan entonces a la membrana próxima (de PVDF o nitrocelulosa que contiene la entidad de captura) mediante acción capilar. Si los

20 anticuerpos contra la entidad de captura están presentes, forman un complejo con el detector y la entidad de captura diagnóstica sobre la membrana, generando de esta manera una señal (por ejemplo, una banda que se puede ver o visualizar).

Como otro ejemplo no limitante, la placa de muestra no tiene las moléculas detectoras (es decir, moléculas de unión a Fc detectables, conjugados de antígeno detectables) como rayas, es decir, la placa de muestra no contiene una

25 región de conjugado de moléculas detectoras pre-inmovilizadas. Todos los demás componentes son esencialmente los mismos que se han descrito anteriormente, en los que el antígeno o péptido antigénico sin marcar (es decir, la entidad de captura) está inmovilizado en una membrana, tal como una membrana de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilideno) (por ejemplo, una membrana Immobilon™). La muestra de ensayo (sangre, suero, etc.). Se premezcla con una o ambas moléculas detectoras, y entonces se aplican en la placa de muestra. De manera

30 alternativa, la muestra de ensayo y las moléculas detectoras se aplican a la placa de muestra por separado, en el mismo momento o secuencialmente. Otras combinaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Independientemente del orden en el que se mezclan o aplican, los complejos de anticuerpos resultantes en la muestra y las moléculas detectoras se transportan entonces a la membrana próxima (de PVDF o nitrocelulosa que contiene la entidad de captura) por acción capilar. Si están presentes los anticuerpos contra la entidad de captura,

35 entonces forman un complejo con los detectores y la entidad de captura diagnóstica sobre la membrana, generando de esta manera una señal (por ejemplo, una banda que se puede ver o visualizar).

En realizaciones específicas, los procedimientos incluyen poner en contacto la muestra de ensayo con un conjugado de Proteína A y/o Proteína G-oro coloidal (CGC) para formar un primer complejo, poner en contacto el primer

40 complejo con un péptido antigénico inmovilizado en una región de ensayo de una membrana de nitrocelulosa o PVDF, en el que el péptido antigénico se deriva de una fuente microbiana y específicamente se une a un anticuerpo de interés (por ejemplo, un anticuerpo antibacteriano, antivírico, antiparasitario, antifúngico). El péptido antigénico se puede conjugar con BSA o se sintetiza como un MAPS. La presencia de una señal de la Proteína A-CGC y/o Proteína G-CGC en la región de ensayo es indicativa de la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo.

Ciertos procedimientos incluyen adicionalmente poner en contacto la muestra de ensayo con un conjugado de péptido antigénico-CGC, que comprende el mismo péptido antigénico que se ha descrito anteriormente. En ciertas

45 realizaciones, la Proteína A/G-CGC o el anticuerpo secundario-CGC o una combinación de los mismos y el péptido antigénico CGC, se inmovilizan en una región de conjugado de la membrana (o una membrana separada pero conectada) de manera que no se solape con la región de ensayo. En otras realizaciones, la Proteína A/G-CGC o el anticuerpo secundario-CGC o una combinación del mismo y el péptido antigénico-CGC no están inmovilizado en la

50 membrana, sino que más bien se aplican a la superficie junto con la muestra de ensayo, al mismo tiempo o secuencialmente. La señal combinada de la Proteína A/G-CGC y/o el anticuerpo secundario-CGC y el péptido antigénico-CGC indica la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo, y es normalmente más fuerte que la señal de un ensayo que se lleva a cabo con el péptido antigénico-CGC solo, es decir, sin la Proteína A-CGC, Proteína G-CGC, o el anticuerpo secundario-CGC. En realizaciones específicas, el péptido antigénico es un

55 antígeno de *Borrelia* (de origen natural o sintético, por ejemplo, idéntico o mimético del antígeno de origen natural), y la muestra de ensayo es de un sujeto sospechoso de tener una enfermedad de Lyme. Una señal positiva identifica la presencia de anticuerpos específicos de enfermedad de Lyme en la muestra. En otras realizaciones, el péptido antigénico es un antígeno de *Ehrlichia* (de origen natural o sintético, por ejemplo, idéntico o mimético del antígeno de origen natural), y el sujeto es sospechoso de tener Ehrlichiosis, una infección bacteriana transmitida por garrapatas

60 producida por bacterias de la familia Anaplasmataceae, géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*.

Otro ensayo para la exploración de productos sanguíneos u otros fluidos fisiológicos o biológicos es un ensayo

inmunoabsorbente ligado a enzimas, es decir, un ELISA. Normalmente, en un ELISA, las entidades de captura (por ejemplo, los antígenos específicos de anticuerpo) se adsorben a la superficie de un pocillo de microtitulación directamente o mediante una matriz de captura (por ejemplo, un anticuerpo). El resto de los sitios de unión a proteínas no específicas de la superficie se bloquean entonces con un agente apropiado, tal como seroalbúmina bovina (BSA), suero de cabra normal inactivado por calor (NGS), o BLOTTO (una solución tampón de leche en polvo sin grasa que también contiene conservantes, sales y un agente antiespumante). El pocillo se incuba entonces con una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo de interés. La muestra se puede aplicar en bruto, o más a menudo se puede diluir, habitualmente en una solución tampón que contiene una pequeña cantidad (de un 0,1-5,0 % por peso) de proteína, tal como BSA, NGS, o BLOTTO. Después de la incubación durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que se produzca la unión específica, el pocillo se lava para retirar la proteína no unida y entonces se incuba con una o más moléculas detectoras, incluyendo una molécula de unión a Fc (por ejemplo, Proteína A y/o Proteína G) y opcionalmente otro antígeno específico de anticuerpo (normalmente el mismo que la entidad de captura) que están conjugados con una enzima u otro marcador por procedimientos convencionales y se disuelve en tampón de bloqueo. El marcador se puede escoger de entre una variedad de enzimas, que incluyen peroxidasa de rábano rústico (HRP), beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, etc. Se permite el tiempo suficiente para que se produzca la unión específica de nuevo, entonces se lava el pocillo de nuevo para retirar el conjugado no unido y se añade un sustrato adecuado para la enzima. Se deja que se desarrolle el color y se determina la densidad óptica de los contenidos del pocillo visualmente o mediante un instrumento (medido a una longitud de onda apropiada). El valor de corte de la DO se puede definir como la media de DO + 3 desviaciones típicas (SD) de al menos 50 muestras de suero recolectadas de individuos de un área en la que la enfermedad de Lyme no sea endémica, o por otra de dichas definiciones convencionales. En el caso de un ensayo muy específico, se puede utilizar un valor de corte de DO+2 SD. Las condiciones para llevar a cabo los ensayos ELISA son bien conocidos en la técnica.

Se debería entender por el experto en la técnica que puede diseñarse cualquier número de formatos de ensayos proteicos convencionales, particularmente formatos de inmunoensayos, para utilizar las distintas realizaciones descritas en el presente documento. La presente invención no está limitada por la selección del formato de ensayo particular y se cree que engloba formatos de ensayo que son conocidos por los expertos en la técnica.

Las frases tales como "muestra que contienen un anticuerpo" o "detección de un anticuerpo en una muestra" no significa que se excluyen las muestras o determinaciones (por ejemplo, intentos de detección) en las que no esté contenido o se detecte el anticuerpo. En un sentido general, la presente invención implica los ensayos para determinar si un anticuerpo producido en respuesta a una infección por un microbio infeccioso está presente en una muestra, independientemente de si se detecta o no.

Las condiciones para la reacción de antígenos/péptidos antigénicos y anticuerpos de manera que reaccionen específicamente son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology (Coligan y col., editores, John Wiley & Sons, Inc).

Dispositivos y composiciones

En otro aspecto, la presente divulgación incluye dispositivos para la detección de un anticuerpo en una muestra. Ciertas realizaciones incluyen dispositivos de detección de anticuerpos o sistemas de detección de anticuerpos, que comprenden una región de carga de la muestra, una región de conjugado, y una región de ensayo. La región de conjugado normalmente no se solapa con la región de ensayo; sin embargo, la región de muestra y estas dos regiones se configuran de manera que, en la operación, cuando se carga una muestra líquida en la región de carga de la muestra, están en comunicación fluida con la región de conjugado y la región de ensayo. Habitualmente la muestra de ensayo fluye a través o se comunica con las regiones de conjugado y de ensayo mediante una acción de capilaridad. La región de conjugado comprende una molécula de unión a Fc que se puede movilizar conjugada con una primera entidad detectable (es decir, un conjugado de molécula de unión a Fc detectable, tal como un conjugado de Proteína A y/o Proteína G, o un conjugado con anticuerpo secundario específico de Fc), y la región de ensayo comprende una entidad de captura inmovilizada capaz de unirse específicamente al anticuerpo. Cada una de estas características se describe en otro sitio del presente documento.

En algunas realizaciones, el dispositivo comprende adicionalmente una región de control en comunicación fluida con una muestra de líquido cuando se carga en la región de carga de la muestra. De nuevo, la muestra líquida puede fluir a través o comunicarse con la región de control mediante acción de capilaridad. En ciertas realizaciones, la región de control comprende una pareja de unión inmovilizada capaz de unirse específicamente a un detector de control. Como ejemplo, la región de control comprende un anticuerpo anti-proteína A, un anticuerpo anti-proteína G, o cualquiera de las IgG de mamífero que reaccionan contra la Proteína A o la Proteína G.

Algunos dispositivos comprenden adicionalmente una placa absorbente posicionada corriente abajo de la región de ensayo. En ciertos dispositivos, la región de conjugado se posiciona corriente arriba de la región de carga de la muestra. En algunas realizaciones, la región de conjugado se posiciona corriente abajo de la región de carga de la muestra. En algunas realizaciones, la región de carga de la muestra comprende un material separador de sangre.

En ciertos casos, la región de conjugado comprende adicionalmente un segundo detector que se puede movilizar, en

el que el segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo capaz dicho antígeno o péptido antigénico de unirse específicamente al anticuerpo. En ciertas realizaciones, el primer (por ejemplo, la molécula de unión a Fc detectable) y el segundo (por ejemplo, el conjugado de antígeno detectable) detectores tienen el mismo tipo de entidad detectable. En otras realizaciones, el primer y segundo detectores tienen diferentes tipos de entidades detectables. En realizaciones particulares, la relación (por ejemplo, la relación molar) del primer detector respecto al segundo detector se ajusta para conseguir un nivel deseado de amplificación de la señal. Por ejemplo, la relación del primer detector (por ejemplo, la molécula de unión a Fc detectable, tal como la proteína A/proteína G) respecto al segundo detector (por ejemplo, el conjugado de antígeno detectable) puede ser de aproximadamente 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, o 200:1, incluyendo todas las relaciones e intervalos de relaciones entre ellas. En algunas realizaciones, la relación del conjugado de moléculas de unión a Fc detectables con relación al conjugado de antígeno/péptido antigénico detectable es desde aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:20, preferentemente desde aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, y más preferentemente desde aproximadamente 16:1 a aproximadamente 2:1. En realizaciones en las que tanto los conjugados de proteína A como de proteína G se utilizan como moléculas de unión a Fc detectables, la relación de conjugado de proteína A respecto a conjugado de proteína G se puede ajustar para optimizar la señal de detección basándose en la clase de inmunoglobulina que se va a detectar como se ha descrito anteriormente. Las relaciones adecuadas (por ejemplo, relaciones molares) de conjugado de proteína A respecto a conjugado de proteína G incluyen, pero no se limita a, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, y 20:1. En algunas realizaciones, la relación de conjugado de proteína A con respecto a conjugado de proteína G es desde aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, preferentemente desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, y más preferentemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2. En una realización, la relación de conjugado de proteína A respecto a conjugado de proteína G es aproximadamente de 1:1.

Los dispositivos para llevar a cabo los ensayos de unión específica, especialmente inmunoensayos, se conocen y se pueden adaptar fácilmente para su uso en los presentes procedimientos. Los ensayos en fase sólida en general son más fáciles de llevar a cabo que los procedimientos de ensayo heterogéneo que necesitan una etapa de separación, tal como precipitación, centrifugación, filtración, cromatografía, o magnetismo, debido a que la separación de reactivos es más rápida y más simple. Los dispositivos de ensayo en fase sólida incluyen placas de microtitulación, dispositivos de ensayo de flujo directo (por ejemplo, dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral), bastoncillo, y dispositivos de inmunoensayo de inmunocapilaridad o inmunocromatografía.

En algunas realizaciones, el dispositivo es un inmunoensayo de flujo lateral. En ciertas realizaciones, el dispositivo es una placa de microtitulación adecuada para un ensayo ELISA. En otras realizaciones, el dispositivo es adecuado para su uso en un rotor analítico. En otras realizaciones más, el dispositivo comprende un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico.

En algunas realizaciones, se construye un dispositivo de flujo lateral utilizando una placa de separación de muestra/sangre, una membrana de nitrocelulosa y una mecha superior en una carcasa (véase, por ejemplo, la Figura 2). La membrana de nitrocelulosa está rayada con una línea de ensayo o región que comprende una entidad de captura, que es un antígeno específico de anticuerpo, sin marcar (por ejemplo, un péptido antigénico o antígeno no peptídico), y opcionalmente una línea de control o región que contiene un anticuerpo que es reactivo con la molécula de unión a Fc (indicado debajo). Una muestra sospechosa de contener un anticuerpo de interés se puede premezclar con un conjugado de molécula de unión a Fc detectable, y entonces se aplica a un dispositivo de ensayo de flujo lateral. O, más que premezclarla, la muestra y la molécula de unión al Fc se pueden aplicar al mismo tiempo o secuencialmente en el dispositivo de ensayo, en cualquier orden.

De manera alternativa, la membrana de nitrocelulosa se prepara como anteriormente, y adicionalmente se raya con una línea o región de conjugado que comprende un conjugado de molécula de unión a Fc detectable, en la que las regiones de conjugado y de ensayo no se solapan. En algunas realizaciones, una muestra sospechosa de contener un anticuerpo de interés se puede aplicar entonces al dispositivo de ensayo de flujo lateral. En otras realizaciones, una muestra sospechosa de contener un anticuerpo de interés se puede premezclar con un conjugado de antígeno detectable, que se une específicamente al anticuerpo (normalmente que tenga la misma especificidad de unión que la entidad de captura), y entonces se aplica en el dispositivo de ensayo de flujo lateral. De manera similar que anteriormente, más que pre-mezclarlos, la muestra y el conjugado de antígeno detectable se pueden aplicar al mismo tiempo o secuencialmente al dispositivo de ensayo, en cualquier orden.

En algunas realizaciones, se construye un dispositivo de flujo lateral utilizando una placa de separación de muestra/sangre, membrana de nitrocelulosa, y una mecha superior colocadas en una carcasa (véase, por ejemplo, la Figura 2). La membrana de nitrocelulosa se raya con una línea o región de ensayo que comprende una entidad de captura, tal como un antígeno específico del anticuerpo, sin marcar (por ejemplo, un péptido antigénico o un antígeno no peptídico), opcionalmente una línea o región de control que contiene un anticuerpo que reacciona contra la molécula de unión a Fc (que se indican debajo), y una línea o región de conjugado que comprende un conjugado de antígeno detectable, que se une específicamente al anticuerpo (normalmente que tienen la misma especificidad

de unión que la entidad de captura). Las regiones de conjugado y de ensayo habitualmente no se solapan. Una muestra sospechosa de contener un anticuerpo de interés puede pre-mezclarse con un conjugado de molécula de unión a Fc detectable, y luego se aplica al dispositivo de ensayo de flujo lateral. También, más que pre-mezclarlas, la muestra y la molécula de unión al Fc se pueden aplicar al mismo tiempo o secuencialmente en el dispositivo de ensayo, en cualquier orden. En una realización ejemplar, se pueden utilizar también dispositivos de dos puertos que se utilizan para la aplicación secuencial de una muestra de ensayo, conjugado y un tampón de caza.

En ciertos dispositivos de flujo lateral, la membrana de nitrocelulosa está rayada con una línea o región de ensayo que comprende una entidad de captura, tal como un antígeno específico de anticuerpo, no marcado (por ejemplo, un péptido antigénico o un antígeno no peptídico), opcionalmente una línea o región de control que contiene un anticuerpo que reacciona contra una molécula de unión a Fc (indicada debajo), y una línea o región de conjugado que comprende una molécula de unión a Fc detectable y un conjugado de antígeno detectable, que se une específicamente al anticuerpo (normalmente que tiene la misma especificidad de unión que la entidad de captura). Una muestra sospechosa de contener un anticuerpo de interés se aplica entonces en el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

En un dispositivo ejemplar para la detección de anticuerpos específicos de Lyme, se construye un dispositivo de flujo lateral utilizando una placa de separación de muestra/sangre, una membrana de nitrocelulosa, y una mecha superior colocadas en una carcasa (véase, por ejemplo, la Figura 2). La membrana de nitrocelulosa está rayada con una línea o región de ensayo que comprende una mezcla de péptidos que imitan o simulan antígenos de *Borrelia* (véase, por ejemplo, el documento US2011136155) y una línea o región de control que comprende cualquier inmunoglobulina que reacciona contra la proteína A o la proteína G (por ejemplo, IgG anti-proteína A de ratón, humana u otra IgG reactiva contra Proteína A, etc.). Una muestra sospechosa de contener anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* se puede mezclar con cualquiera de conjugados de oro coloidal de Proteína A y/o G (Proteína A/G-CGC), o (ii) una mezcla de Proteína A/G-CGC y conjugados de oro coloidal de antígenos de *Borrelia* (antígeno de *Borrelia*-CGC). Esta mezcla de conjugado de muestra se puede aplicar entonces en el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

De manera alternativa, se construye un dispositivo de flujo lateral como anteriormente, pero en el que la placa de nitrocelulosa se raya con una o más regiones de conjugado, separadas de la región de ensayo. Las regiones de conjugado pueden incluir, por ejemplo, (i) Proteína A/G-CGC sola, (ii) antígeno de *Borrelia*-CGC solo, o (iii) una combinación de proteína A/G-CGC y antígeno de *Borrelia*-CGC. Como se utiliza en aquí o en cualquier otro sitio de la presente solicitud, el antígeno de *Borrelia*, el antígeno de *Ehrlichia*, o cualquier antígeno o péptido antigénico incluye una mezcla de péptidos sintéticos que imitan o simulan el antígeno de *Borrelia* natural, el antígeno de *Ehrlichia* natural, o cualquier antígeno natural, respectivamente. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en (i) o (iii), la muestra de ensayo se aplica tal cual en el dispositivo de flujo lateral sin ninguna pre-mezcla. En otras realizaciones, por ejemplo, en (i), la muestra se puede premezclar con antígeno de *Borrelia*-CGC y luego aplicarse en el dispositivo de flujo lateral. En algunas realizaciones, por ejemplo, en (ii), la muestra se puede pre-mezclar con Proteína A/G-CGC y luego se aplica en el dispositivo de flujo lateral. Sin embargo, estas combinaciones ejemplares no son limitantes, y otras posibilidades serán evidentes para los expertos en la técnica.

Los complejos de captura que comprenden la Proteína A/G-CGC, el anticuerpo en la muestra, y el antígeno de *Borrelia*-CGC opcional, se forman durante el transporte a través de la placa de separación muestra/sangre y la migración a través de la línea(s) de conjugado opcional y la línea(s) de ensayo. Dependiendo de las circunstancias (por ejemplo, el uso de antígeno de *Borrelia*-CGC opcional), se forma un complejo o sándwich de antígeno de *Borrelia* no marcado e inmovilizado, el anticuerpo, y la Proteína A/G-CGC marcada. En presencia de antígeno de *Borrelia*-CGC, se forma un complejo o sándwich de antígeno de *Borrelia* sin marcar, el anticuerpo, antígeno de *Borrelia*-CGC marcado, y proteína A/G-CGC marcada. La adición de Proteína A/G-CGC al último complejo amplifica adicionalmente la señal del antígeno de *Borrelia*-CGC. En ciertas realizaciones, un aumento de la amplificación se puede conseguir ajustando las relaciones de todos los reactivos, como se describe en el presente documento y se sabe en la técnica.

En un dispositivo ejemplar para la detección de anticuerpos específicos de Ehrlichiosis, se construye un dispositivo de flujo lateral utilizando una placa de separación muestra/sangre, una membrana de nitrocelulosa, y una mecha superior colocadas en una carcasa. La membrana de nitrocelulosa se raya con una línea o región de ensayo que comprende un antígeno de *Ehrlichia* y una línea o región de control que comprende cualquier inmunoglobulina que reacciona contra Proteína A o Proteína G (por ejemplo, una IgG anti-Proteína A). Una muestra sospechosa de contener los anticuerpos contra *Ehrlichia* (por ejemplo, *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*) se puede mezclar con conjugados de oro coloidal con Proteína A y/o G (Proteína A/G-CGC) o (ii) una mezcla de Proteína A/G-CGC y conjugados de oro coloidal con antígeno de *Ehrlichia* (antígeno de *Ehrlichia*-CGC). Esta mezcla de conjugado de muestra se puede aplicar entonces al dispositivo de ensayo de flujo lateral.

De manera alternativa, se construye un dispositivo de flujo lateral como anteriormente, pero en el que la placa de nitrocelulosa se raya con una o más regiones de conjugado, separadas de la región de ensayo. Las regiones de conjugado pueden incluir, por ejemplo, (i) Proteína A/G-CGC sola, (ii) antígeno de *Ehrlichia*-CGC solo, o (iii) una combinación de proteína A/G-CGC y antígeno de *Ehrlichia*-CGC. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en (i) o (iii), la muestra de ensayo se aplica tal cual en el dispositivo de flujo lateral sin ninguna pre-mezcla. En otras

realizaciones, por ejemplo, en (i), la muestra se puede premezclar con antígeno de *Ehrlichia*-CGC y luego aplicarse en el dispositivo de flujo lateral. En algunas realizaciones, por ejemplo, en (ii), la muestra se puede pre-mezclar con Proteína A/G-CGC y luego se aplica en el dispositivo de flujo lateral. Sin embargo, estas combinaciones ejemplares no son limitantes, y otras posibilidades serán evidentes para los expertos en la técnica.

- 5 Los complejos de captura que comprenden la Proteína A/G-CGC, el anticuerpo en la muestra, y el antígeno de *Ehrlichia*-CGC opcional, se forman durante el transporte a través de la placa de separación muestra/sangre y la migración a través de la línea(s) de conjugado opcional y la línea(s) de ensayo. Dependiendo de las circunstancias (por ejemplo, el uso de antígeno de *Ehrlichia*-CGC opcional), se forma un complejo o sándwich de antígeno de *Ehrlichia* no marcado e inmovilizado, el anticuerpo, y la Proteína A/G-CGC marcada. En presencia de antígeno de *Ehrlichia*-CGC, se forma un complejo o sándwich de antígeno de *Ehrlichia* sin marcar, el anticuerpo, antígeno de *Ehrlichia*-CGC marcado, y proteína A/G-CGC marcada. La adición de Proteína A/G-CGC al último complejo amplifica adicionalmente la señal del antígeno de *Ehrlichia*-CGC. En ciertas realizaciones, un aumento de la amplificación se puede conseguir ajustando las relaciones de todos los reactivos, como se describe en el presente documento y se sabe en la técnica.
- 10
- 15 En una realización de una placa de microtitulación adecuada para ELISA, se inmoviliza una entidad de captura sobre una superficie, tal como una placa de ELISA de noventa y seis pocillos o fase sólida equivalente que está recubierta con estreptavidina o un compuesto de unión a biotina equivalente, tales como avidina o neutravidina, a una concentración óptima en un tampón de revestimiento alcalino e incubado a 4 °C durante una noche. Después de un número adecuado de lavados con tampones de lavado convencionales, se aplica en cada pocillo, una concentración óptima de formas biotiniladas de una molécula de unión a Fc y opcionalmente el mismo antígeno utilizado como entidad de captura que se disuelve en un tampón de bloqueo convencional. Una muestra se añade entonces, y el ensayo procede como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica.
- 20

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones relacionadas con la detección de un anticuerpo en una muestra. Ciertas realizaciones se refieren a uno o más complejos de captura que comprende una entidad de captura, un anticuerpo en una muestra de ensayo, y un primer detector, en el que la entidad de captura se une al anticuerpo y en el que el primer detector comprende una molécula de unión a Fc conjugada con una primera entidad detectable y se une a la región Fc del anticuerpo. Ciertas realizaciones comprenden adicionalmente un segundo detector, en el que el segundo detector se une específicamente a la región variable del anticuerpo. En algunas realizaciones, el complejo de captura se inmoviliza en una región de ensayo de una superficie, tal como un soporte sólido o semisólido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el soporte sólido es una perla (por ejemplo, una partícula coloidal o una nanopartícula), una vía de flujo en un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, una vía de flujo en un rotor analítico, o un tubo o un pocillo (por ejemplo, de una placa). Véase la Figura 1 para una ilustración de estas y realizaciones relacionadas, incluyendo el conjugado de segundo detector opcional y la superficie de ensayo opcional.

25

30

35 En realizaciones particulares, el complejo comprende un anticuerpo de interés (por ejemplo, un anticuerpo antimicrobiano, tal como un anticuerpo antivírico, antibacteriano, antifúngico, o antiparasitario), un conjugado de Proteína A y/o Proteína G, un antígeno específico de anticuerpo, inmovilizado, y opcionalmente un conjugado de antígeno. En ciertas realizaciones, el conjugado de Proteína A y/o Proteína G comprende una nanopartícula de oro (por ejemplo, una Proteína A-CGC o Proteína G-CGC – “conjugado de oro coloidal”), y el conjugado de antígeno comprende una nanopartícula de oro (por ejemplo, un antígeno-CGC). En algunas realizaciones, el conjugado de antígeno o antígeno-CGC comprende un antígeno microbiano, tal como un antígeno vírico, bacteriano, fúngico o parasitario, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. En realizaciones específicas, el conjugado de antígeno, o antígeno-CGC incluye un antígeno específico de la enfermedad de Lyme, tal como un antígeno de *Borrelia* (véase *supra*). En otras realizaciones, el conjugado de antígeno o antígeno-CGC incluye un antígeno específico de la enfermedad Ehrlichiosis, tal como un antígeno de *Ehrlichia*.

40

45

Kits

En otro aspecto más, la descripción proporciona kits. En ciertas realizaciones, los kits comprenden un dispositivo o sistema como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, los kits comprenden dos, tres, cuatro, o más dispositivos o sistemas como se describe en el presente documento.

50 Los reactivos para los tipos particulares de ensayos también pueden proporcionarse en los kits desvelados en el presente documento. Por lo tanto, los kits pueden incluir una población de nanopartículas, perlas (por ejemplo, adecuadas para un ensayo de aglutinación o un ensayo de flujo lateral), o una placa (por ejemplo, una placa adecuada para un ensayo ELISA). En otras realizaciones, los kits comprenden un dispositivo, tal como un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral, un rotor analítico, o un sensor electroquímico, óptico u optoelectrónico. La población de nanopartículas, perlas, la placa, y los dispositivos son útiles llevando a cabo un inmunoensayo. Por ejemplo, pueden ser útiles para detección de la formación de un complejo péptido-anticuerpo que comprende un anticuerpo de una muestra, un péptido antigénico (marcado y/o no marcado), y una molécula de unión a Fc.

55

En ciertas realizaciones, se conjuga un antígeno (o una mezcla de diferentes antígenos) con una entidad detectable tal como una nanopartícula de oro, ese mismo antígeno (o mezcla de antígenos) también se unen o se inmovilizan

en una placa, una superficie de ensayo de nitrocelulosa, u otra superficie de ensayo o dispositivo, y una molécula de unión a Fc se conjuga con una entidad detectable tal como una nanopartícula de oro. En kits específicos, se conjuga un péptido antigénico con una nanopartícula de oro y se conjuga opcionalmente con BSA, ese mismo antígeno (sin la partícula de oro, pero opcionalmente conjugado con BSA) se inmoviliza en una región de ensayo definida o tira de una superficie de nitrocelulosa, y la Proteína A y/o Proteína G se conjuga con una nanopartícula de oro, opcionalmente como parte de un kit que contiene un dispositivo de ensayo de flujo lateral. En algunas realizaciones, el conjugado de Proteína A y/o Proteína G con la partícula de oro se inmoviliza en una región separada de la superficie de nitrocelulosa, es decir, una región de conjugado, que no se solapa con la región de ensayo.

Además, los kits pueden incluir distintos diluyentes y tampones, conjugados marcados u otros agentes para la detección de antígenos o anticuerpo unidos específicamente, y otros reactivos generadores de señal, tal como sustratos enzimáticos, cofactores y cromógenos. Otros componentes de un kit se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. Dichos componentes pueden incluir reactivos de revestimiento, anticuerpos de captura monoclonales o policlonales específicos para una molécula de unión a Fc tal como Proteína A y/o Proteína G, o un coctel de dos o más de los anticuerpos, extractos purificados o semi-purificados de antígenos o anticuerpos como referencias, anticuerpos detectores de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo anti-ratón, anti-perro, anti-pollo o anti-humano con una molécula indicadora conjugada a estos, cartas indicadoras para las comparaciones colorimétricas, guantes desechables, instrucciones de descontaminación, bastones aplicadores o envases, una copa de preparación de muestras, etc. En una realización, un kit comprende tampones u otros reactivos apropiados para la constitución de un medio de reacción que permita la formación de un complejo péptido-anticuerpo.

Dichos kits proporcionan una manera conveniente, eficaz para un laboratorio clínico para el diagnóstico de una infección por un agente microbiano, especialmente agentes microbianos patógenos, como se describe en otra parte del presente documento y conocidos en la técnica. Dichos kits también pueden proporcionar una manera conveniente, eficaz para un laboratorio clínico para el diagnóstico de otras afecciones relacionadas con la presencia de cualquier anticuerpo de interés. Por ejemplo, ciertos trastornos autoinmunitarios se pueden asociar con ciertos tipos de anticuerpos. Por lo tanto, hasta el punto en que las combinaciones anticuerpo/antígeno relacionadas con esa enfermedad se conozcan, dichos kits pueden proporcionar diagnósticos sensibles y precisos de dichas enfermedades. Los kits específicos proporcionan la detección de *Borrelia*, tal como una *B. burgdorferi*, y por lo tanto ayuda al diagnóstico de enfermedad de Lyme.

En ciertas realizaciones, los kits comprenden adicionalmente unas instrucciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los kits comprenden unas instrucciones indicando cómo utilizar el kit para detectar un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra un antígeno microbiano (por ejemplo, un antígeno de *Borrelia*, un antígeno de *Ehrlichia*), o para diagnosticar una enfermedad tal como una enfermedad relacionada con microbios (por ejemplo, enfermedad de Lyme, Ehrlichiosis). En ciertas realizaciones, los kits comprenden unas instrucciones que indican cómo utilizar una población de perlas, una placa, o un dispositivo (por ejemplo, un dispositivo de flujo lateral) para detectar un anticuerpo contra un antígeno microbiano tal como un antígeno de *Borrelia* o *Ehrlichia*, o para diagnosticar una enfermedad relacionada con un microbio tal como la enfermedad de Lyme (Borreliosis) o Ehrlichiosis. En ciertas realizaciones, los kits proporcionan instrucciones para la combinación de la molécula de unión a Fc detectable, el conjugado de antígeno o conjugado de péptido antigénico detectable, específico de anticuerpo, y la muestra de ensayo en cualquier orden antes de la aplicación en la región de carga de la muestra del sistema de detección (por ejemplo, un dispositivo de ensayo de flujo lateral, placa de microtitulación, rotor analítico). En algunas realizaciones, los kits incluyen instrucciones para combinar el conjugado de antígeno o conjugado de péptido antigénico detectable con la muestra de ensayo de manera que el conjugado de antígeno o conjugado de péptido antigénico detectables estarán presentes en una relación particular con la molécula de unión a Fc detectable para conseguir el nivel deseado de amplificación de señal. Los kits también pueden proporcionar instrucciones para la optimización de los tampones, optimización de las relaciones de distintos componentes (por ejemplo, molécula de unión a Fc, antígeno, péptido antigénico, muestra de ensayo), y optimización del orden de la mezcla y etapas de aplicación (por ejemplo, mezclando todos los componentes antes de la aplicación, mezclando solo ciertos componentes y aplicando los otros por separado).

Los péptidos, composiciones y dispositivos que comprende los péptidos, kits y procedimientos desvelados en el presente documento ofrecen varias ventajas. Por ejemplo, permiten una detección barata, rápida, sensible y precisa de los anticuerpos de interés, y el diagnóstico de afecciones relacionadas, sin señales de falsos positivos o fondo significativos. Esto permite un diagnóstico preciso y sensible, incluso de muestras que contengan niveles de anticuerpos muy bajos, e incluso indetectables de otra manera.

Ejemplos

Ejemplo 1: La Proteína A aumenta la detección específica de anticuerpo en un ensayo de flujo lateral específico de la enfermedad de Lyme

Los ensayos se llevaron a cabo para determinar el impacto de añadir Proteína A-CGC (conjugado de oro coloidal) a un ensayo de flujo lateral específico de la enfermedad de Lyme, mientras que se ensaya una muestra negativa, una muestra positiva a Lyme, y una muestra positiva a Lyme de bajo nivel. El fin era observar y clasificar el efecto de la Proteína A-CGC sobre señales falsas potenciales mientras se mantiene una sensibilidad adecuada del ensayo. Se

ensayaron distintas concentraciones de Proteína A-CGC en relación a un control negativo de Proteína A-CGC. El ensayo de flujo lateral que se llevó a cabo en este ensayo es similar al que se ilustra en las Figuras 2 y 3. Los resultados se muestran en la Tabla 1 posterior, como se indica por la puntuación de reactividad (escala de 0-5 donde un número mayor indica un resultado positivo).

5 **Tabla 1: Sumario de los resultados del ensayo (Puntuación de Reactividad)**

Condiciones del ensayo:	Pos Bajo SC Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25	Pos Bajo SC Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25	Pos claro SC Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25	Pos claro SC Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25	Neg_345 Plasma Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25	Neg_345 Plasma Dilución 1:8 Pre-Mezcla CB25
Control: SIN proteína A	0	0,25	1,5	1,5	0,25	0,25
1x proteína A	3,5	3,5	3,5	3,5	0,5	0,5
Dilución 1:2 Proteína A	3,5	3,5	3,75	3,75	0,25	0,25
Dilución 1:4 Proteína A	1,25	1,25	2,25	2,25	0,25	0,25
Dilución 1:8 Proteína A	0,5	0,75	2	2	0,25	0,25

10 Como se muestra en la Tabla 1, la adición de una Proteína A-CGC amplificaba la señal de todas las muestras positivas a Lyme ensayadas, y especialmente hace posible la detección de muestras positivas 'bajas'. Sin la Proteína A-CGC las muestras positivas bajas eran indetectables, presentando una puntuación de Reactividad comparable a las muestras negativas (~0,25 o menos). Por el contrario, la adición de Proteína A-CGC a la concentración de 1x y dilución 1:2 amplificaba la señal significativamente, presentando una puntuación de Reactividad de aproximadamente 3,5. La Proteína A, por lo tanto, mejora significativamente la detección de anticuerpos diana en este ensayo de flujo lateral específico de la enfermedad de Lyme.

15 **Ejemplo 2: La Proteína A aumenta la detección específica de anticuerpos en un ensayo de flujo lateral llevado a cabo en una muestra biológica estresada**

20 Se llevaron a cabo ensayos para determinar el impacto de añadir Proteína A-CGC (conjugado de oro coloidal) a una mezcla de conjugado 48BSA (albúmina sérica bovina)/IgG DAG estresado previamente. La mezcla de conjugado se pre-estresó durante 15 días en una incubadora a 35 °C. Este experimento ensayaba ambas muestras, estresada y no estresada en presencia o ausencia de Proteína A-CGC. El ensayo de flujo lateral que se llevó a cabo en este experimento es similar al que se ilustra en las Figuras 2 y 3. Los resultados se muestran en la Tabla 2 posterior, como se indica por la puntuación de Reactividad (escala de 0-5 donde un número mayor indica un resultado positivo). Los resultados se muestran en la Tabla 2 posterior.

Tabla 2: Sumario de los resultados para las muestras estresadas frente a no estresadas

Muestra	Pos_11-0483	Pos_11-0483	Neg_SCA30 - 2235HI	Neg_SCA30 - 2235HI
Temperatura	2-8 °C	35 °C	2-8 °C	35 °C
Día 1	2,25	2,0	0	0
Día 15	2,5	0,75	0	0
Día 15 + PA	2,75	1,25	0	0

25 Como se muestra en la Tabla 2 anterior, la adición de Proteína A-CGC a la muestra del ensayo de flujo lateral amplificaba la señal de la muestra biológica estresada 15 días (35 °C) con respecto a la ausencia de Proteína A-CGC, como se muestra por el aumento de la puntuación de Reactividad desde 0,75 a 1,75. El día 15 la muestra no estresada (2-8 °C) estaba también afectada ligeramente por la adición de Proteína A-CGC, como se muestra por el aumento de la puntuación de Reactividad de 2,25 a 2,75. También las muestras negativas no se alteraban por la adición de Proteína A-CGC.

30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de la presencia de un anticuerpo en una muestra de ensayo que comprende:
 - (a) poner en contacto la muestra de ensayo con un primer detector y un segundo detector para formar un primer complejo que comprende el primer detector, el segundo detector, y el anticuerpo, en el que el primer detector comprende una molécula de unión a Fc conjugada con una primera entidad detectable, siendo capaz dicha molécula de unión a Fc de unirse específicamente a la región Fc del anticuerpo, y en el que el segundo detector comprende un antígeno o péptido antigénico conjugado con una segunda entidad detectable, siendo capaz dicho antígeno o péptido antigénico de unirse específicamente a una región variable del anticuerpo;
 - (b) poner en contacto el primer complejo con una entidad de captura inmovilizada en una región de ensayo de una superficie, en el que la entidad de captura se une al anticuerpo, en el que el anticuerpo forma un complejo de captura con el primer detector, segundo detector, y entidad de captura, inmovilizando de esta manera el complejo de captura de la región de ensayo; y
 - (c) detectar la presencia de una señal de la primera entidad detectable en la región de ensayo, en el que la presencia de la señal es indicativa de la presencia del anticuerpo en la muestra de ensayo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer detector está inmovilizado en una región de conjugado en la superficie y en el que la región de conjugado no se solapa con la región de ensayo de la superficie.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la molécula de unión a Fc es la Proteína A y/o la Proteína G.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la entidad de captura es un antígeno o péptido antigénico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho antígeno o péptido antigénico es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusanos del corazón, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, virus de leucemia felina, parvovirus, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera entidad detectable es una nanopartícula metálica, una nanocubierta metálica, un fluoróforo, o una partícula de látex coloreada.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la nanopartícula metálica o nanocubierta metálica se selecciona de entre el grupo que consiste en partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas de oro huecas, nanocubiertas de sílice revestidas de oro, y cubiertas de oro revestidas de sílice.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer y segundo detector están inmovilizados en una región de conjugado y en el que la región de conjugado no se solapa con la región de ensayo de la superficie.
9. El procedimiento de la reivindicación 2 u 8, en el que la región de conjugado comprende adicionalmente un detector de control.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la primera y segunda entidades detectables son la misma, opcionalmente, en el que la primera y segunda entidades detectables son nanopartículas de oro.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho antígeno o péptido antigénico del segundo detector es de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en gusanos del corazón, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, virus de leucemia felina, parvovirus, gripe cepa A, gripe cepa B, virus de gripe aviar, virus sincitial respiratorio, *Legionella*, adenovirus, rotavirus, virus de inmunodeficiencia felina, virus de inmunodeficiencia humana y *Streptococcus* Grupo A.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer detector y el segundo detector están presentes en una relación de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el primer detector comprende una molécula de unión a Fc conjugado con una primera entidad detectable, y en el que la molécula de unión a Fc es proteína A y/o proteína G.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la superficie es una vía de flujo en un dispositivo de ensayo de flujo lateral o una vía de flujo en un rotor analítico, o en el que la muestra de ensayo es un fluido corporal, un extracto de un órgano del cuerpo, sangre, suero, o plasma.
15. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la muestra de ensayo se mezcla con el segundo detector y el primer detector en cualquier orden o secuencia.

16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el segundo detector es un péptido antigénico de *Ehrlichia* o una mezcla del mismo conjugado con una segunda entidad detectable.

17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer detector y el segundo detector están presentes en la mezcla en una relación de aproximadamente 16:1 a aproximadamente 2:1, opcionalmente aproximadamente 4:1.

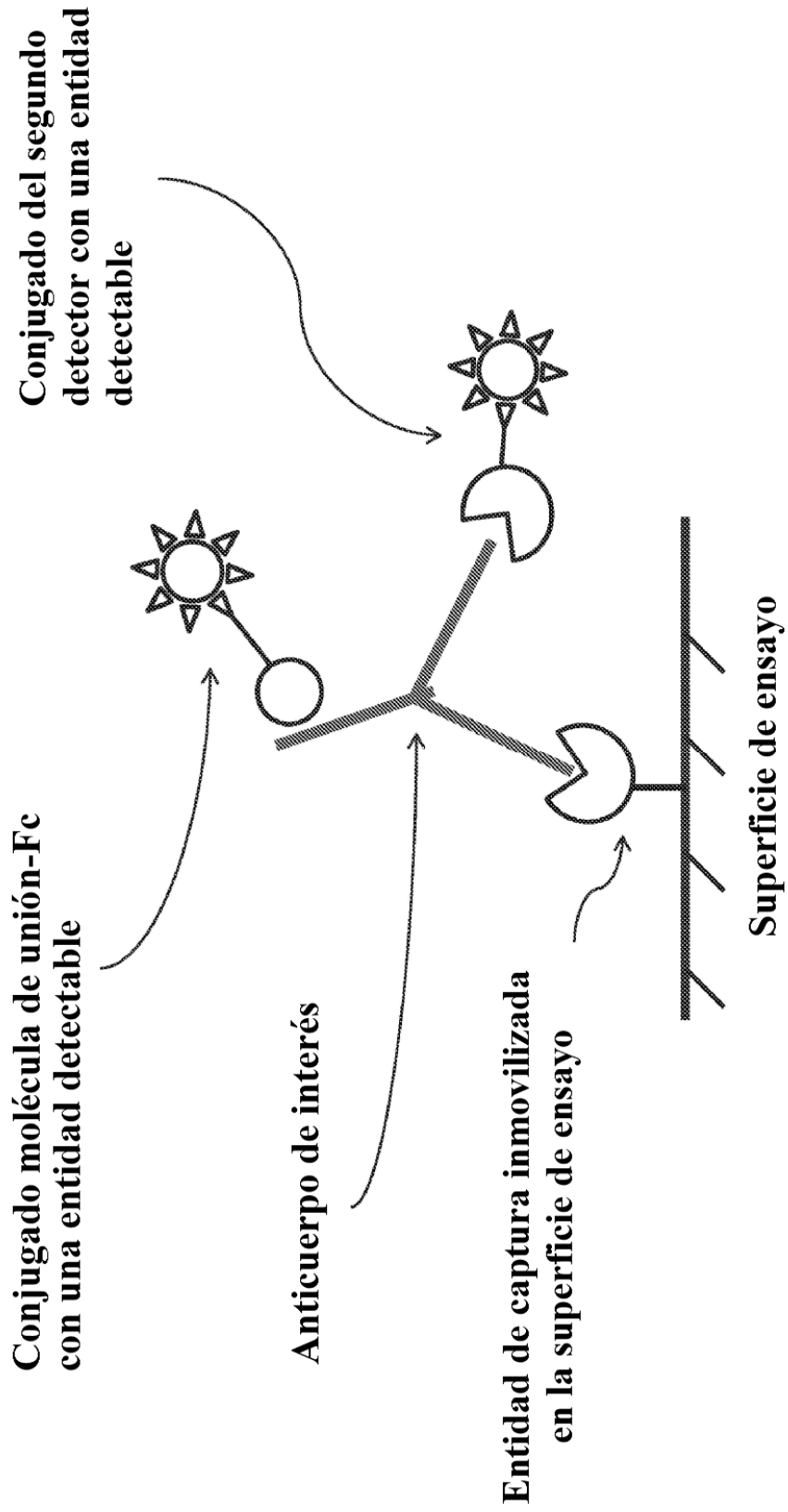


Figura 1

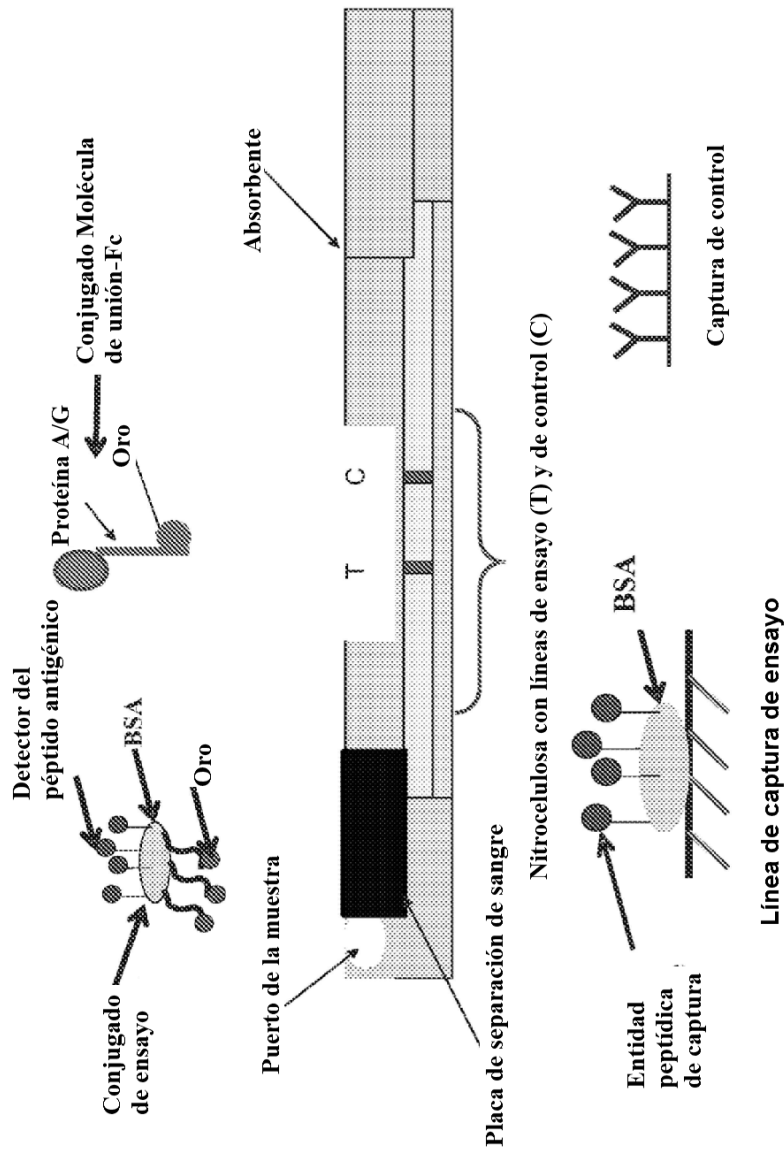


Figura 2

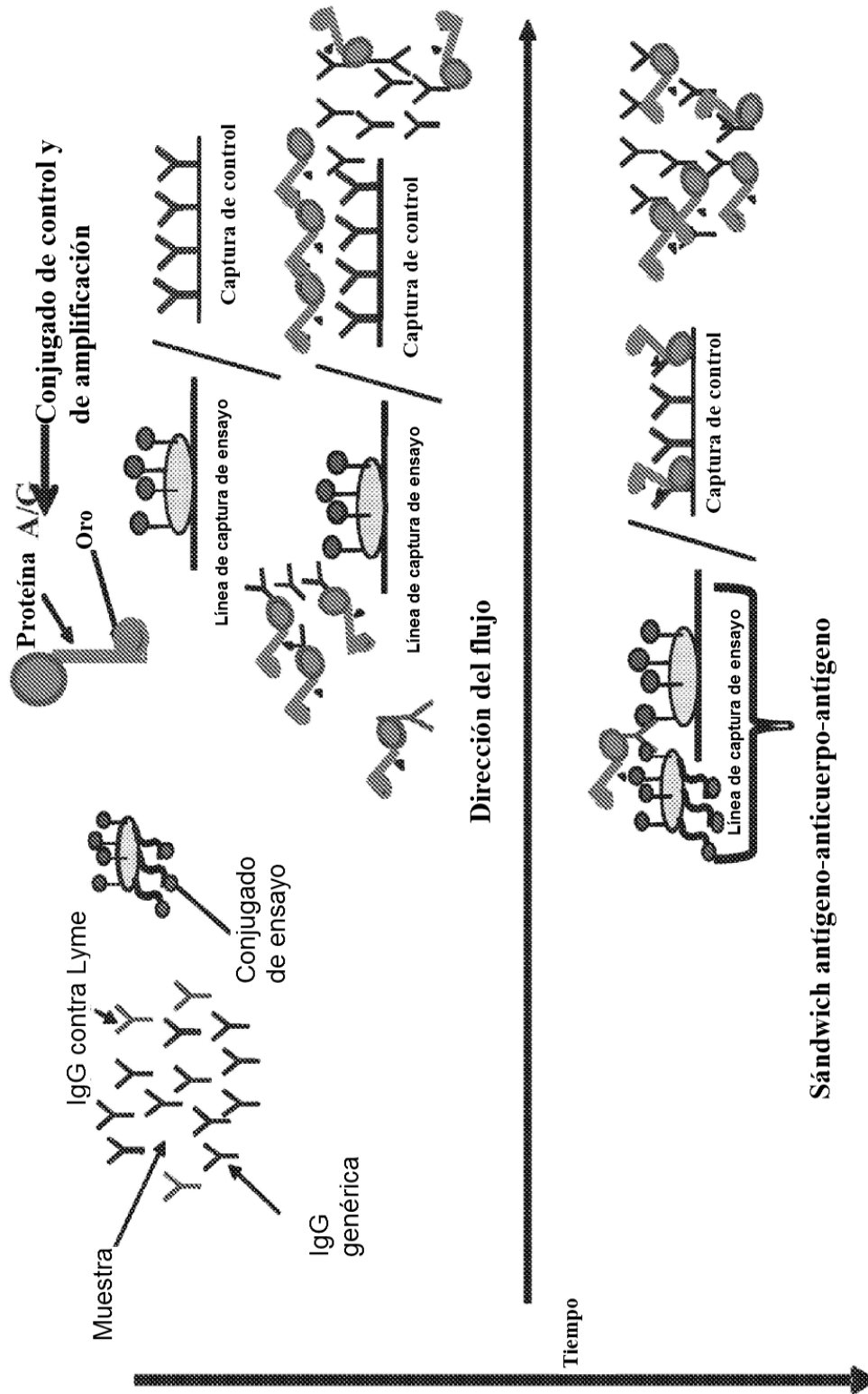


Figura 3