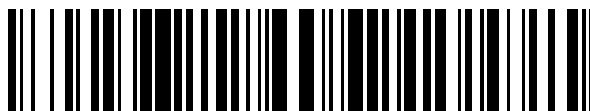


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 873**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2015 PCT/JP2015/004577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16047068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2015 E 15843546 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3199948**

54 Título: **Método para detectar molécula diana y kit para su uso en dicho método**

30 Prioridad:

**22.09.2014 JP 2014192311**

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

**12.11.2020**

73 Titular/es:

**JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY  
(100.0%)**

**1-8, Hon-cho 4-chome  
Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012, JP**

72 Inventor/es:

**NOJI, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 792 873 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método para detectar molécula diana y kit para su uso en dicho método

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para detectar una molécula diana y a un kit para su uso en el método. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para detectar una molécula diana basado en una reacción antígeno-anticuerpo entre una molécula diana en un vehículo y un anticuerpo.

10

**Estado de la técnica**

Para el diagnóstico de diversas enfermedades en etapas tempranas, se desea una tecnología de biodetección para detectar con sensibilidad muy alta marcadores de enfermedad (biomarcadores) presentes en concentraciones bajas en las muestras biológicas. Si se secretan 100 moléculas biomarcadoras en 5 L de sangre a partir de cada una del 1 millón de células cancerosas contenidas en un tumor con un volumen de 1 mm<sup>3</sup>, se asume que la concentración del biomarcador en sangre será aproximadamente 30 aM. Se ha deseado el desarrollo de una tecnología que posibilite la detección de dicha molécula diana en una concentración baja.

15

Un método para detectar una proteína mediante el uso de un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA, por sus siglas en inglés) de una sola molécula se describe en la Literatura distinta de patente 1. En este método, se captura una pequeña cantidad de proteína en microperlas recubiertas con un anticuerpo específico para la proteína; y los complejos formados entre las perlas y la proteína se etiquetan con fluorescencia. Las perlas que contienen los complejos se introducen en una cámara de reacción con la ayuda de fuerza centrífuga y se cuenta la cantidad de perlas que capturaron la proteína. De esta manera, la proteína se mide cuantitativamente.

20

La Literatura distinta de patente 2 describe una estrategia para mejorar la sensibilidad en un ELISA basado en anticuerpo monoclonal de una etapa para IgG humana mediante el uso de múltiples conjugados.

La Literatura de patente 1 describe un "dispositivo de recuento digital de una sola molécula", que es un dispositivo en matriz que posibilita la formación de microgotículas con una densidad extremadamente alta. Dado que el ELISA se lleva a cabo en una gotícula de volumen pequeño, una señal de una molécula diana se expresa mediante un valor binario y se somete a la medición (ELISA digital). Para describir el método más específicamente, en primer lugar, una molécula diana, perlas modificadas con un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección se hacen reaccionar para formar un complejo de "anticuerpo de captura-molécula diana-anticuerpo de detección" sobre la superficie de las perlas. Cuando la concentración de la molécula diana es baja, cada perla entra en una de dos categorías: se une a un solo complejo o no se une a ningún complejo. A continuación, las perlas se encierran una a una en una gran cantidad de microgotículas formadas en el dispositivo en matriz. Se cuenta la cantidad de microgotículas que emiten una señal derivada del anticuerpo de detección y se determina la cantidad de moléculas diana. De esta manera, las señales de las moléculas diana se expresan mediante un valor binario, ya sea 0 o 1, y hace que dicha detección y cuantificación de la molécula diana se pueda hacer con sensibilidad alta y precisión alta.

30

35

En relación con la presente invención, la Literatura de patente 2 describe un método para detectar una sustancia diana basado en un enzoinmunoanálisis. En este enzoinmunoanálisis, se usa una enzima de restricción como una etiqueta que se acopla a un anticuerpo que hace reacción con la sustancia diana; una cadena de ADN que tiene la secuencia nucleotídica que se va a escindir mediante la enzima de restricción se escinde mediante la enzima de restricción en un complejo; y los fragmentos de cadena de ADN escindidos se analizan (miden) para detectar la sustancia diana.

40

La Literatura de patente 3 describe biosensores moleculares que tienen uno o más aptámeros, que son útiles en varios métodos, incluida la identificación y cuantificación de moléculas diana.

45

La Literatura de patente 4 describe métodos para la detección de una molécula diana en una muestra, que comprenden incubar la muestra con dos o más sondas etiquetadas de manera detectable, dividir la muestra en múltiples divisiones y detectar la presencia de las dos o más sondas en la misma división.

50

La Literatura de patente 5 describe métodos para detectar moléculas truncadas.

La Literatura de patente 6 describe composiciones y métodos que son útiles en la identificación y cuantificación de cualquier polipéptido o complejo macromolecular mediante el uso de un conjunto de construcciones de coaptámero.

55

Lista de citas

Literatura de patentes

60

Literatura de patente 1: Publicación internacional n.º WO2012/121310

Literatura de patente 2: Patente japonesa abierta n.º H7-270418

Literatura de patente 3: US 2006/110739

Literatura de patente 4: US 2014/228239

Literatura de patente 5: WO 2009/097425

5 Literatura de patente 6: WO 2005/059509

Literatura distinta de patente

Literatura distinta de patente 1: David M Rissin et al., Nature Biotechnology: doi: 10.1038/nbt.1641

10 Literatura distinta de patente 2: Rowland, A. M. et al. Journal of Immunological Methods, 1992: doi: 10.1016/0022-1759(92)90106-4

### Objeto de la invención

15 Problema técnico

En el caso donde se mide una molécula diana sobre la base de un recuento digital de una sola molécula por ELISA, según se describió anteriormente, cuando se deriva ruido del anticuerpo de detección adsorbido de manera no específica en las perlas, no se puede cuantificar de manera binaria con precisión una señal de una molécula diana y esto hace que el rendimiento cuantitativo disminuya.

Por lo tanto, un objetivo primario de la presente invención es proporcionar una técnica para detectar una señal de una molécula diana con alta sensibilidad y alta precisión, mientras se elimina el ruido derivado de un anticuerpo de detección adsorbido de manera no específica.

25 Solución al problema

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones. Todo objeto que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos

30 Para alcanzar el objetivo mencionado anteriormente, la presente descripción proporciona los siguientes [1] a [8].

[1] Un método para detectar una molécula diana, que incluye una etapa de formación de complejo en la que se hacen reaccionar una molécula diana, un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana, están etiquetados con enzimas que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre el vehículo; y una etapa de detección en la que se hacen reaccionar dos o más sustratos que tienen sitios de escisión mediante las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado terminal de cada uno del sitio de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia, y el complejo para detectar la fluorescencia emitida por las sustancias fluorescentes.

[2] El método de detección según [1], que incluye una etapa de análisis en la que se procesan dos o más señales de detección de fluorescencia diferentes en longitud de onda como una señal de detección de la molécula diana.

[3] El método de detección según [1] o [2], que incluye, entre la etapa de formación de complejo y la etapa de detección, una etapa de encerrar los vehículos uno a uno en gotículas formadas sobre la placa base.

[4] El método de detección según uno cualquiera de [1] a [3], en el que el vehículo es una microperla.

[5] El método de detección según uno cualquiera de [1] a [4], en el que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítopos de la molécula diana.

[6] El método de detección según uno cualquiera de [1] a [5], que es ELISA digital.

[7] Un método para detectar una molécula diana, que incluye una etapa de formación de complejo en la que se hacen reaccionar una molécula diana, un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y se proporcionan con etiquetas mutuamente diferentes

para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre el vehículo;

una etapa de detección en la que se detectan las señales de las etiquetas; y

5 una etapa de análisis en la que se procesan dos o más señales diferentes de las etiquetas como una señal de detección de la molécula diana.

[8] Un kit de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), que contiene un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana, dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y están etiquetados con enzimas que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes, y dos o más sustratos que tienen sitios de escisión mediante las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado terminal de cada uno de los sitios de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia.

15 Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método para detectar una molécula diana basado en una reacción antígeno-anticuerpo entre la molécula diana en un vehículo y un anticuerpo. En el método, se proporciona una técnica para detectar una señal de la molécula diana con alta sensibilidad y alta precisión, mientras se elimina el ruido derivado de un anticuerpo de detección adsorbido de manera no específica en el vehículo.

### Descripción de las figuras

[Figura 1] La Figura 1 ilustra un complejo formado en una etapa de formación de complejo.

25 [Figura 2] La Figura 2 ilustra microperlas encerradas en microgotículas en una etapa de encerramiento.

[Figura 3] La Figura 3 ilustra la reacción entre un complejo y una sonda en una etapa de detección.

[Figura 4] La Figura 4 ilustra un complejo formado en una etapa de formación de complejo.

### Descripción detallada de la invención

30 Ahora, se describirá a continuación una realización preferida en referencia a los dibujos adjuntos.

El método para detectar una molécula diana según la presente descripción incluye las siguientes etapas. En la presente memoria, se describirá el caso donde el método para detectar una molécula diana según la presente descripción se aplica al recuento digital de una sola molécula por ELISA (ELISA digital) como una realización. Ahora, se describirán las etapas individuales de este.

(1) Una etapa de formación de complejo en la que se hacen reaccionar una molécula diana, un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana, están etiquetados con enzimas que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes, para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre el vehículo.

(2) Una etapa de encerramiento en la que se encierran los vehículos uno a uno en gotículas formadas sobre una placa base.

(3) Una etapa de detección en la que se hacen reaccionar dos o más sustratos que tienen sitios de escisión mediante las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado terminal de cada uno de los sitios de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia.

(4) Una etapa de análisis en la que se procesan dos o más señales de detección de fluorescencia diferentes en longitud de onda como la señal de detección de la molécula diana.

55 En el método de detección según la presente descripción, un objetivo de detección, es decir, una molécula diana, puede ser cualquier sustancia, siempre que la sustancia se una a un anticuerpo a través de una reacción antígeno-anticuerpo. Particularmente, la molécula diana se especifica como un microorganismo tal como una bacteria y un hongo y una biomolécula tal como un virus, una proteína, un ácido nucleico, un azúcar y un complejo de estos. La molécula diana (un objetivo de detección) no se limita a una. Se pueden detectar simultáneamente dos o más moléculas diana. Por ejemplo, si se usan cuatro anticuerpos: primer y segundo anticuerpos contra la proteína A y primer y segundo anticuerpos contra la proteína B, se pueden distinguir y detectar simultáneamente dos moléculas diana, es decir, la proteína A y la proteína B.

#### 1. Etapa de formación de complejo

65 En la etapa de formación de complejo, se hacen reaccionar una molécula diana, un vehículo modificado con un

5 primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y un segundo anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana y está etiquetado con una enzima que tienen una actividad de escisión de sustrato para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y el segundo anticuerpo sobre el vehículo. Como el segundo anticuerpo, se usan dos o más anticuerpos etiquetados con enzimas diferentes en la especificidad de sustrato.

10 La "enzima que tiene una actividad de escisión de sustrato" no está limitada particularmente, siempre que pueda escindir un sustrato y provocar la disociación de una sustancia fluorescente y un desactivador (descrito específicamente más adelante). Como la "enzima que tiene una actividad de escisión de sustrato", por ejemplo, se pueden usar transferasas clasificadas en EC2 (EC significa número de la Comisión Internacional de Enzimas) e hidrolasas clasificadas en EC3 y liasas clasificadas en EC4. Los nombres específicos de enzimas y sus sustratos (y sitios de escisión en los sustratos) para usar en combinación se indican a continuación.

[Tabla 1]

Enzima	Sustrato (sitio de escisión en sustrato)
Esterasa	Unión de éster o unión derivada de la unión de éster
Glucosidasa	Unión de glucósido o unión derivada de la unión de glucósido
Fosfatasa	Unión de fosfato o unión derivada de la unión de fosfato
ADNasa	ADN y derivados de este
ARNasa	ARN y derivados de este
Proteasa	Unión de péptido y unión derivada de la unión de péptido

15 La Figura 1 muestra un complejo formado en la etapa de formación de complejo. En esta etapa, en primer lugar, se preparan un vehículo 2 modificado con un primer anticuerpo 3 que se une específicamente a una molécula diana 1 y segundos anticuerpos 41, 42 que se unen específicamente a la molécula diana 1 y etiquetados con enzimas 51, 52.

20 El "anticuerpo que se une específicamente" significa que el anticuerpo se puede unir a un antígeno (en la presente memoria, la molécula diana 1) y no se une o se une débilmente a otras sustancias. Que "se une débilmente" significa que la afinidad de unión por otras sustancias es distintivamente baja en comparación con la afinidad de unión por el antígeno. La afinidad de unión por el antígeno se puede medir mediante un método conocido en la técnica, por ejemplo, resonancia de plasmones de superficie (SPR, por sus siglas en inglés).

25 El primer anticuerpo 3 tiene la función de capturar la molécula diana 1 en el vehículo 2. Los segundos anticuerpos 41, 42 tienen la función de posibilitar la detección óptica de la molécula diana 1 capturada en el vehículo 2. Es preferible que el primer anticuerpo 3 y los segundos anticuerpos 41, 42 se unan a diferentes epítomos de la molécula diana 1. En otras palabras, es preferible que los epítomos reconocidos por el primer anticuerpo 3, el segundo anticuerpo 41 y el segundo anticuerpo 42 sean todos diferentes. De aquí en adelante en la presente memoria, se hará referencia también al primer anticuerpo 3 como el "anticuerpo de captura 3" y a los segundos anticuerpos como los "anticuerpos de detección 41, 42".

30 Como el vehículo 2, se usan ampliamente las microperlas. De aquí en adelante en la presente memoria, se hará referencia también al "vehículo 2" como la "microperla 2". La "microperla", que se usa como sinónimo de una "partícula", es un término técnico usado comúnmente en la técnica. La forma de la microperla no está limitada particularmente, pero es habitualmente esférica. El material para la microperla no está limitado particularmente y puede ser, p. ej., vidrio, gel de sílice, poliestireno, polipropileno, membrana y un material magnético. Los ejemplos de materiales específicos incluyen celulosa, derivados de celulosa, resinas acrílicas, vidrio, gel de sílice, poliestireno, gelatina, polivinilpirrolidona, copolímeros de vinilo-acrilamida, poliestirenos reticulados con p. ej., divinilbenceno, poli(acrilamida), gel de látex, poliestireno dextrano, goma, silicio, plástico, nitrocelulosa, celulosa, esponja natural, gel de sílice, vidrio, metal plástico, celulosa, dextrano reticulado (Sephadex (marca comercial)) y gel de agarosa (Sephacrose (marca comercial)). La perla puede ser porosa. Las perlas tienen preferiblemente un diámetro de partícula promedio de 5 µm o menos, por ejemplo, aproximadamente 1 µm a 4 µm. Cabe señalar que, el diámetro de partícula promedio se puede medir, por ejemplo, mediante observación microscópica electrónica o un método de dispersión de luz dinámica.

35 Una microperla 2 se modifica con un anticuerpo de captura 3 al unir el anticuerpo de captura 3 a un grupo (grupo modificador) presente sobre la superficie de la microperla 2 a través de un enlazador. Por ejemplo, el anticuerpo de captura 3 se une covalentemente a un grupo amino presente sobre la superficie de una perla modificada con un grupo amino, a través de un agente de reticulación que tiene, p. ej., N-hidroxisuccinimida.

50 Las enzimas 51, 52 con las que se van a etiquetar los anticuerpos de detección 41, 42 se definen como enzimas que diferentes en la especificidad de sustrato. La "especificidad de sustrato" en la presente memoria significa que, en la

escisión del sustrato catalizada por una enzima, la enzima no cataliza la escisión de sustancias distintas al sustrato o su acción catalítica es completamente débil. Las "enzimas diferentes en especificidad de sustrato" significa que, si se usa esterasa como la enzima 51, se usa una enzima como glucosidasa y fosfatasa, que no escinden una unión de éster, como la enzima 52.

En el caso donde se emplea una combinación de una enzima de restricción y una cadena de ácido nucleico como una combinación de una enzima y un sustrato, se usan enzimas diferentes en la secuencia de reconocimiento (sitio de escisión) como las enzimas 51, 52 diferentes en especificidad de sustrato. Los ejemplos de la enzima de restricción incluyen Accl, Alul, Apal, BamHI, BglII, BssHII, BstEII, ClaI, Ddel, DraI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HincII, HindIII, HpaI, HpaII, KpnI, MluI, NarI, NcoI, NdeI, NheI, NotI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, Sail, Scal, SmaI, SpeI, SphI, SspI, StuI, XbaI y XhoI. Como las enzimas 51, 52, dos enzimas diferentes en la especificidad de sustrato se pueden seleccionar arbitrariamente de estas y usarlas en combinación. De aquí en adelante en la presente memoria, se describirá principalmente un caso donde se usan enzimas de restricción como las enzimas 51, 52. También se hará referencia a las enzimas 51, 52 como las "enzimas de restricción 51, 52".

Los anticuerpos de detección 41, 42 se pueden etiquetar con las enzimas de restricción 51, 52, respectivamente, al formar una estructura reticulada entre los anticuerpos de detección 41, 42 y las enzimas de restricción 51, 52, respectivamente, mediante el uso de un agente de reticulación (reactivo reticulador).

A continuación, en esta etapa, se hacen reaccionar la molécula diana 1, la microperla 2 modificada con el anticuerpo de captura 3 y los anticuerpos de detección 41, 42 etiquetados con las enzimas de restricción 51, 52. Como resultado de la reacción, se forma un complejo que consiste en el anticuerpo de captura 3, la molécula diana 1 y los anticuerpos de detección 41, 42 en la microperla 2 (ver, Figura 1A). La molécula diana 1, la microperla 2 y los anticuerpos de detección 41, 42 se pueden hacer reaccionar en una sola etapa o dos etapas. En otras palabras, la molécula diana 1, la microperla 2 y los anticuerpos de detección 41, 42 se pueden hacer reaccionar simultáneamente. Alternativamente, la molécula diana 1 se hace reaccionar con la microperla 2, y después la microperla 2 se lava para retirar la molécula diana 1 que no se unió al anticuerpo de captura 3, y a continuación, la microperla 2 se puede hacer reaccionar con los anticuerpos de detección 41, 42.

La molécula diana 1, la microperla 2 y los anticuerpos de detección 41, 42 se pueden hacer reaccionar en una disolución adecuada al ponerlos en contacto entre sí en las mismas condiciones que en un ensayo de inmunoabsorción enzimática convencional. Cuando la concentración de la molécula diana 1 es baja, cada microperla 2 después de la reacción entra en una de las categorías: tiene un solo complejo o no tiene ningún complejo.

En la etapa de detección (descrita más adelante), se deja que una microperla 2 que tiene el complejo (formado en esta etapa) sobre la superficie esté en contacto con sustratos que tienen cada uno una sustancia fluorescente unida a ellos. Los sustratos se escinden, respectivamente, mediante las enzimas de restricción 51, 52 proporcionadas como etiquetas en los anticuerpos de detección 41, 42. En consecuencia, se emite fluorescencia y se detecta. En este momento, si los anticuerpos de detección 41, 42 se adsorben de manera no específica en las microperlas 2, la fluorescencia también se emite desde las microperlas 2 que tienen los anticuerpos de detección 41, 42 adsorbidos de manera no específica sobre la superficie mediante escisión del sustrato.

En la presente memoria, el "anticuerpo se adsorbe de manera no específica" significa que un anticuerpo se adsorbe en una parte no antigénica de una sustancia que contiene un antígeno y en una sustancia que no contiene ningún antígeno, de manera resumida, se refiere a la absorción en una sustancia que no se produce a través de una reacción antígeno-anticuerpo.

Las Figuras 1B y C muestran la adsorción no específica de los anticuerpos de detección 41, 42 en las microperlas 2 que se produce en la etapa de formación de complejo. La Figura 1B muestra los estados donde el anticuerpo de detección 41 y el anticuerpo de detección 42 se adsorben de manera no específica por separado en las superficies de las microperlas 2. La Figura 1C muestra el caso donde tanto el anticuerpo de detección 41 como el anticuerpo de detección 42 se adsorben de manera no específica en la superficie de una microperla 2. En la etapa de formación de complejo, se puede producir la adsorción no específica de los anticuerpos de detección 41, 42, como se muestra en las Figuras 1B y C, además de la formación deseada de un complejo como se muestra en la Figura 1A.

La adsorción no específica de tanto el anticuerpo de detección 41 como el anticuerpo de detección 42 como se muestra en la Figura 1C se produce con una frecuencia suficientemente baja, en comparación con la adsorción no específica de cualquier uno de ellos, como se muestra en la Figura 1B y no produce sustancialmente ningún efecto sobre la precisión de la detección de la molécula diana 1. Por ejemplo, si se asume que la adsorción no específica del anticuerpo de detección 41 se produce en el 1 % de las microperlas 2 y la adsorción no específica del anticuerpo de detección 42 se produce en el 1 % de las microperlas 2, la frecuencia de la aparición de la adsorción no específica tanto del anticuerpo de detección 41 como el anticuerpo de detección 42 es solo del 0,01 %. En la etapa de análisis que se describe más adelante, dos o más señales de detección de fluorescencia diferentes en longitud de onda (de fluorescencia) se procesan como una señal de detección de la molécula diana 1. De este modo, se elimina el ruido derivado de una señal de detección de fluorescencia debido a la adsorción no específica, como se muestra en la Figura 1B.

## 2. Etapa de encerramiento

5 En la etapa de encerramiento, las microperlas 2 se encierran en gotículas formadas sobre una placa base. Esta etapa se lleva a cabo cuando el método para detectar una molécula diana según la presente descripción se aplica al ELISA digital y no es una etapa esencial para el método de detección según la presente descripción.

10 En esta etapa, las microperlas 2 se encierran una a una en gotículas que tienen cada una un volumen pequeño suficiente para contener una sola microperla 2, para expresar una señal a partir de la molécula diana 1 mediante un valor binario, es decir, 0 o 1, en la etapa de análisis. En la formación de las microgotículas y el encerramiento de las microperlas 2 en las microgotículas una a una, se puede usar de manera adecuada un dispositivo de recuento digital de una sola molécula descrito, por ejemplo, en la Literatura de patente 1. Según el dispositivo de recuento digital de una sola molécula, las microgotículas se forman de manera extremadamente densa sobre una placa base; al mismo tiempo, las microperlas 2 se pueden encerrar en las gotículas. Después de la etapa de formación de complejo, las microperlas 2 se lavan para retirar los anticuerpos de detección 41, 42 que no se unieron a la molécula diana 1, y después se resuspenden en un disolvente adecuado y se pueden someter a esta etapa.

20 Después de la etapa de formación de complejo, se obtiene una mezcla de microperlas que forman complejos (ver, Figura 1A) y microperlas que no forman complejos. En las microperlas que no forman complejos, se incluyen las microperlas a las que se adsorben los anticuerpos de detección 41, 42 de manera no específica (ver, la Figura 1B, C).

25 La Figura 2 muestra microperlas 2 encerradas en microgotículas. Las microperlas 2 se encierran una a una en gotículas D formadas sobre la placa base A. Durante la reacción en la etapa de formación de complejo, si la concentración de la molécula diana 1 es baja, cada microperla 2 entra en una de las categorías: tiene un solo complejo y no tiene ningún complejo. En la figura, las microperlas en cuya superficie se ha formado un complejo se indican con el número de referencia 21; mientras que las microperlas que no tienen ningún complejo formado sobre ellas se indican con el número de referencia 22. El estado de la microperla 21 se muestra en la Figura 1A y el estado de la microperla 22 se muestra en la Figura 1B o C. De aquí en adelante en la presente memoria, se hará referencia a la microperla 2 que tiene un complejo formado en ella como "microperla 21"; mientras que, se hará referencia a la microperla 2 que no tienen ningún complejo formado en ella como la "microperla 22".

## 3. Etapa de detección

35 En la etapa de detección, los sustratos (de aquí en adelante en la presente memoria también denominados "sondas"), donde cada uno tiene una secuencia de reconocimiento por la enzima de restricción 51, 52, una sustancia fluorescente unida a un lado terminal de la secuencia de reconocimiento (es decir, un sitio de escisión) y un desactivador unido al otro lado terminal de esta, hacen reacción con los complejos formados sobre las superficies de las microperlas 2 en la etapa de formación de complejos y después se detecta la fluorescencia emitida desde las sustancias fluorescentes.

40 La Figura 3 muestra la reacción entre una sonda y un complejo en esta etapa. En la reacción, se usan dos o más sondas, a las cuales se unen por separado sustancias fluorescentes que tienen diferentes longitudes de onda de fluorescencia. Más específicamente, una sonda indicada con el número de referencia 61 en la figura tiene un sitio de escisión 71 por una enzima de restricción 51, que se proporciona como una etiqueta de un anticuerpo de detección 41. A una de las regiones que emparedan el sitio de escisión 71, se une una sustancia fluorescente 81; y un desactivador 91 se une a la otra región. La sonda indicada con el número de referencia 62 en la figura tiene un sitio de escisión 72 por una enzima de restricción 52, que se proporciona como una etiqueta de un anticuerpo de detección 42. A una de las regiones que emparedan el sitio de escisión 72, se une una sustancia fluorescente 82; y un desactivador 92 se une a la otra región.

45 Dado que las enzimas de restricción 51, 52 tienen diferente especificidad de sustrato, las secuencias nucleotídicas de los sitios de escisión 71, 72 son mutuamente diferentes. Como sustancias fluorescentes 81, 82 para las sondas 71, 72, se usan sustancias fluorescentes diferentes en la longitud de onda de fluorescencia que se detectan ópticamente de manera distintiva.

50 En la presente memoria, cuando se emplea una combinación distinta de una combinación de una enzima de restricción y una cadena de ácido nucleico como la combinación de una enzima y un sustrato, por ejemplo, se usa esterasa como una enzima 51 y se usa glucosidasa como una enzima 52, se usa una sonda que contiene un sitio de escisión 71 (unión de éster) por esterasa proporcionada como una etiqueta en un anticuerpo de detección 41, una sustancia fluorescente 81 unida a una de las regiones que emparedan el sitio de escisión 71 y un desactivador 91 unido a la otra región como la sonda 61; y se usa una sonda que contiene un sitio de escisión 72 (unión de glucósido) por glucosidasa proporcionada como una etiqueta en un anticuerpo de detección 42, una sustancia fluorescente 82 unida a una de las regiones que emparedan el sitio de escisión 72 y un desactivador 92 unido a la otra región como la sonda 62.

Los desactivadores 91, 92 están presentes a una cierta distancia de las sustancias fluorescentes 81, 82, de manera que se pueda transferir energía entre ellos y evitar (desactivar) la emisión de luz desde las sustancias fluorescentes 81, 82. Como las sustancias fluorescentes 81, 82 y los desactivadores 91, 92, se pueden usar una sustancia fluorescente y un desactivador usados comúnmente en la tecnología de detección óptica para ácidos nucleicos, tal como PCR cuantitativa en tiempo real. Como una combinación de una sustancia fluorescente y un desactivador, se pueden mencionar, por ejemplo, una combinación de una sustancia fluorescente seleccionada del grupo que consiste en Alexa Fluor (marca comercial registrada) 488 (fabricada por Invitrogen), ATTO 488 (fabricada por ATTO-TEC GmbH), Alexa Fluor (marca comercial registrada) 594 (fabricada por Invitrogen) y ROX (Carboxi-X-rodamina), y un BHQ (marca comercial registrada, desactivador Black hole)-1 o BHQ (marca comercial registrada)-2. Además, p. ej., se puede mencionar una combinación de fluoresceína y DABCYL. Las combinaciones de una sustancia fluorescente y un desactivador usadas comúnmente se muestran en la siguiente tabla.

[Tabla 2]

Sustancia fluorescente	Longitud de onda de excitación máxima (nm)	Longitud de onda de fluorescencia máxima (nm)	Desactivador
6-FAM™	494	515	BHQ-1, DABCYL
Fluoresceína	495	520	BHQ-1, DABCYL
JOE™	520	548	BHQ-1, DABCYL
TET™	521	536	BHQ-1, DABCYL
HEX™	353	555	BHQ-1, DABCYL
Cianina 3	550	570	BHQ-2, DABCYL
ROX™	573	602	BHQ-2, DABCYL
Texas RED (marca comercial registrada)	583	603	BHQ-2, DABCYL
Cianina 5	651	674	BHQ-3, DABCYL
Cianina 5.5	675	694	BHQ-3, DABCYL

La reacción se lleva a cabo al poner en contacto las sondas 61, 62 con las microperlas 2 encerradas en microgotículas D. Más específicamente, después de la etapa de formación de complejo, las microperlas 2 se lavan y se resuspenden en una disolución que contiene las sondas 61, 62. De este modo, se posibilita que entre en contacto entre sí. La reacción se lleva a cabo preferiblemente un tampón que tiene una composición adecuada de acuerdo con los tipos de enzimas de restricción 51, 52. Las microgotículas se forman preferiblemente de dicho tampón anteriormente en la etapa de encerramiento. Cabe señalar que los tampones optimizados para las enzimas de restricción se ponen en combinación con las enzimas de restricción y están disponibles comercialmente.

En el caso donde una microperla 21 se encierra en una microgotícula D, el sitio de escisión 71 de una sonda 61 se escinde mediante una enzima de restricción 51 proporcionada como una etiqueta en un anticuerpo de detección 41 y se forma un complejo. Cuando el sitio de escisión 71 se escinde, la sonda 61 se corta en un fragmento 61a y un fragmento 61b y en consecuencia una sustancia fluorescente 81 se disocia de un desactivador 91 y entra en el estado en el que se puede emitir luz. De manera similar, cuando el sitio de escisión 72 de una sonda 62 se escinde mediante una enzima de restricción 52 proporcionada como una etiqueta en un anticuerpo de detección 42 y se forma un complejo, una sustancia fluorescente 82 se disocia de un desactivador 92 y entra en el estado en el que se puede emitir luz.

La fluorescencia emitida a partir de microgotículas individuales que encierran microperlas 2 se detecta mediante el uso de, p. ej., un microscopio de fluorescencia y un sensor de imágenes.



En esta etapa, es preferible detectar si una microperla 2 está contenida o no en una microgotícula. La presencia o ausencia de una microperla 2 se puede verificar por la observación de una microperla, por ejemplo, mediante un microscopio y también al emplear, p. ej., un método para detectar luz difundida por una microperla 2, o un posible método de medición mediante un transistor de efecto de campo (FET, por sus siglas en inglés).

5

#### 4. Etapa de análisis

En la etapa de análisis, dos o más señales de detección de fluorescencia que tienen diferentes en longitudes de onda de fluorescencia se procesan como la señal de detección de una molécula diana 1. Se cuenta la cantidad de microgotículas D que emiten la señal de detección de una molécula diana 1 y se especifica como la cantidad de moléculas diana.

10

En el momento de una reacción en la etapa de formación de complejo, cuando la concentración de la molécula diana 1 es baja, cada una de las microperlas 2 encerradas en microgotículas D es una microperla 21 que tiene un único complejo solo o una microperla 22 que no tiene ningún complejo. Por lo tanto, la cantidad de microgotículas D que envían la señal de detección de la molécula diana 1 se puede considerar como la cantidad de moléculas diana 1. Sobre la base de la cantidad de microgotículas D que encierran microperlas 21 y microperlas 22 y la cantidad de microgotícula D que encierran microperlas 21, se puede calcular la relación de microperlas 2 que capturan la molécula diana 1 con respecto a la cantidad total de microperlas 2. De este modo, se puede cuantificar la concentración de la molécula diana.

15

20

Según se describió anteriormente, si una microperla 21 se encierra en una microgotícula D, se detectan la fluorescencia de una sustancia fluorescente 81 y la fluorescencia de una sustancia fluorescente 92 mutuamente diferentes en longitud de onda. Como se muestra en la Figura 1B, en el caso de una microperla 22, que tiene un anticuerpo de detección 41 o un anticuerpo de detección 42 apenas adsorbido de manera no específica en la superficie y no forma ningún complejo, la fluorescencia solo se detecta de una de la sustancia fluorescente 81 y la sustancia fluorescente 92. Por consiguiente, si se procesan las señales de detección de fluorescencia de la sustancia fluorescente 81 y la sustancia fluorescente 92 como la señal de detección de la molécula diana 1, se puede reducir significativamente el ruido derivado de la señal de detección de fluorescencia derivado de una microperla 22 que no forma complejo. De este modo, se puede cuantificar de manera binaria la señal de detección de la molécula diana 1 con alta precisión y se puede mejorar la cuantificación de la molécula diana 1.

25

30

Cabe señalar que, en el caso donde un anticuerpo de detección 41 y un anticuerpo de detección 42 se adsorben de manera no específica sobre la superficie de una microperla 2, como se muestra en la Figura 1C, la fluorescencia se emite desde la sustancia fluorescente 81 y la sustancia fluorescente 92; sin embargo, como ya se describió, dado que la frecuencia de la aparición de la adsorción no específica por el anticuerpo de detección 41 y el anticuerpo de detección 42 es suficientemente baja, la fluorescencia tiene poca influencia sobre la cuantificación de la molécula diana 1.

35

Las microperlas 2 y anticuerpos de detección 41, 42 (ver, Figura 1) y sondas 71, 72 (ver, Figura 3) usados en la realización se presentan en un kit y preferiblemente se usan para llevar a cabo el método para detectar una molécula diana según la presente descripción. Más específicamente, según un aspecto de la presente descripción, también se proporciona un kit de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), que contiene

40

45

(i) un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana,

(ii) dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y están etiquetados con enzimas que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes, y

50

(iii) dos o más sustratos que tienen sitios de escisión mediante las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado terminal de cada uno de los sitios de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia.

En el kit, para la microperla 2, se puede emplear una microperla modificada con un anticuerpo 3 (primer anticuerpo) por adelantado o se puede acoplar un anticuerpo a un grupo modificador presente sobre la superficie de las perlas a través de un enlazador, cuando se usa. Los anticuerpos de detección 41, 42 (segundo anticuerpo) se pueden proporcionar con enzimas como etiqueta por adelantado o una enzima se puede acoplar al anticuerpo mediante el uso de un agente de reticulación, cuando se usa.

55

El kit según la presente descripción contiene, además, p. ej., reactivos tales como un agente de reticulación para usar en la modificación con microperlas 2 con un anticuerpo de captura 3 o acoplar una enzima como una etiqueta al anticuerpo de detección 41, 42, tampones usados en la etapa de formación de complejo y una placa base A (ver, Figura 2) usada en la etapa de encerramiento.

60

En la realización descrita anteriormente, se usan dos anticuerpos de detección y dos sondas correspondientes a estos; y el ruido derivado de la adsorción no específica de un anticuerpo(s) de detección se reduce mediante el

65

procesamiento de dos señales de detección de fluorescencia diferente en longitud de onda como una señal de detección de una molécula diana. En el método para detectar una molécula diana según la presente descripción, se pueden usar tres o más pares de anticuerpos de detección y sondas. En este caso, tres o más señales de detección de fluorescencia diferente en longitud de onda se pueden procesar como una señal de detección de una molécula diana. A medida que la cantidad de anticuerpos de detección y sondas aumenta, se puede potenciar un efecto de reducción del ruido derivado de la adsorción no específica de un anticuerpo(s) de detección.

En la realización descrita anteriormente, un anticuerpo de detección etiquetado con una enzima que tiene una actividad de escisión de sustrato se usa como el segundo anticuerpo; y la fluorescencia se emite al cortar un sitio de escisión de una sonda con la enzima. En el método para detectar una molécula diana según la presente descripción, un anticuerpo de detección etiquetado con una enzima usada convencionalmente en el desarrollo de color químico y un anticuerpo de detección etiquetado con un tinte fluorescente, se puede usar como el segundo anticuerpo.

Más específicamente, la presente descripción también abarca un método para detectar una molécula diana que incluye las siguientes etapas, como una segunda realización.

(A) una etapa de formación de complejo en la que se hacen reaccionar una molécula diana, un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y se proporcionan con etiquetas mutuamente diferentes para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre el vehículo.

(B) una etapa de detección en la que se detectan las señales de las etiquetas.

(C) una etapa de análisis en la que se procesan las señales de dos o más etiquetas diferentes como una señal de detección de la molécula diana.

En la etapa (C) en la presente memoria, las "señales de etiquetas" incluyen señales emitidas directamente e indirectamente desde las etiquetas. Más específicamente, en el caso donde los anticuerpos de detección etiquetados con tintes fluorescentes se usan como los segundos anticuerpos, las "señales de etiquetas" se refieren a la fluorescencia emitida a partir de los tintes fluorescentes (ver, Figura 4B). Además, en el caso donde se usan anticuerpos de detección etiquetados con enzimas para usar en el desarrollo de color químico como los segundos anticuerpos, las "señales de etiquetas" se refieren al desarrollo de color químico por la acción catalítica de las enzimas (ver, Figura 4A).

La etapa (A) se puede llevar a cabo de la misma manera que en la etapa (1) de la realización mencionada anteriormente (primera realización), excepto que los anticuerpos de detección que están etiquetados con enzimas, tales como fosfatasa alcalina y galactosidasa, usados convencionalmente en el desarrollo de color químico o con sustancias fluorescentes, se usan como los segundos anticuerpos. Si la realización se aplica a ELISA digital, se puede incluir la etapa de encerramiento descrita como la etapa (2) en la primera realización. Un anticuerpo de detección se puede etiquetar con una enzima o un tinte fluorescente según el método mencionado anteriormente conocido en la técnica. Alternativamente, se puede usar un anticuerpos disponibles comercialmente etiquetados con enzimas o tintes fluorescentes.

En la etapa (B), se detectan las señales de las etiquetas acopladas a los anticuerpos de detección que forman un complejo sobre la superficie de un vehículo. La Figura 4A muestra un complejo que consiste en el "anticuerpo de captura 3-sustancia diana 1-segundos anticuerpos 41, 42" formado sobre la microperla 2 en el caso donde se usan un anticuerpo etiquetado con fosfatasa alcalina y un anticuerpo etiquetado con galactosidasa como los anticuerpos de detección 41, 42. Cuando se usa un anticuerpo de detección etiquetado con una enzima, se puede detectar una señal mediante el desarrollo de un color al usar un sustrato de la enzima. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo de detección etiquetado con fosfatasa alcalina, la detección se puede hacer al hacer reaccionar un complejo con: BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) o NBT (cloruro de 4-mitro azul tetrazolio), que es un sustrato cromógeno para la fosfatasa alcalina en lugar de la sonda usada en la primera realización. En el caso de un anticuerpo de detección etiquetado con galactosidasa, se usa un sustrato cromógeno tal como X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido). Como el anticuerpo de detección, se usan dos o más anticuerpos etiquetados con enzimas mutuamente diferentes. Como el sustrato cromógeno, se usan dos o más compuestos dependiendo de las enzimas proporcionadas como etiqueta en los anticuerpos individuales. Las señales derivadas de las enzimas individuales se pueden detectar al medir el color emitido desde cada uno de los sustratos cromógenos mediante un espectrómetro de absorción.

Cuando se usa un anticuerpo de detección etiquetado con una sustancia fluorescente, la fluorescencia emitida desde una sustancia fluorescente se detecta mediante el uso de un microscopio de fluorescencia o un sensor de imágenes. La Figura 4B muestra un complejo que consiste en el "anticuerpo de captura 3-sustancia diana 1-segundos anticuerpos 41, 42" formado sobre la microperla 2 en el caso donde se usan un anticuerpo etiquetado con FITC y un anticuerpo etiquetado con Texas RED (marca comercial registrada) como los anticuerpos de detección 41, 42. Como el anticuerpo de detección, se usan dos o más anticuerpos etiquetados con sustancias fluorescentes que

tienen longitudes de onda de fluorescencia mutuamente diferentes y se pueden detectar las señales derivadas de las sustancias fluorescentes individuales al especificar las zonas de longitud de onda de la fluorescencia de las sustancias fluorescentes.

- 5 En la etapa (C), se procesan las señales de dos o más etiquetas diferentes (fosfatasa alcalina y galactosidasa o FITC y Texas Red en los casos mencionados anteriormente) como la señal de detección de una molécula diana. Según se describió anteriormente, en el caso donde los anticuerpos de detección solo se adsorben de manera no específica sobre la superficie de un vehículo y no forman un complejo, solo se detecta una cualquiera de las señales de dos o más etiquetas (ver, Figura 1). Por consiguiente, si se procesan las señales de dos o más etiquetas diferentes como la señal de detección de una molécula diana, el ruido derivado de un anticuerpo(s) de detección adsorbido(s) de manera no específica en un vehículo se puede reducir significativamente. De este modo, se puede mejorar la precisión de la detección de una molécula diana, así como la cuantificación.
- 10

Lista de signos de referencia:

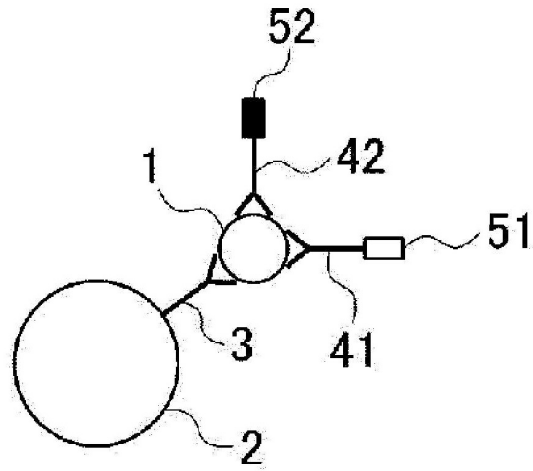
- 15 1: Molécula diana, 2: Microperlas (vehículo), 3: Anticuerpo de captura (primer anticuerpo), 41, 42: anticuerpo de detección (segundo anticuerpo), 51, 52: Enzima de restricción, 61,62: Sonda, 71,72: Sitio de escisión, 81,82: Sustancia fluorescente, 91,92: Desactivador

## REIVINDICACIONES

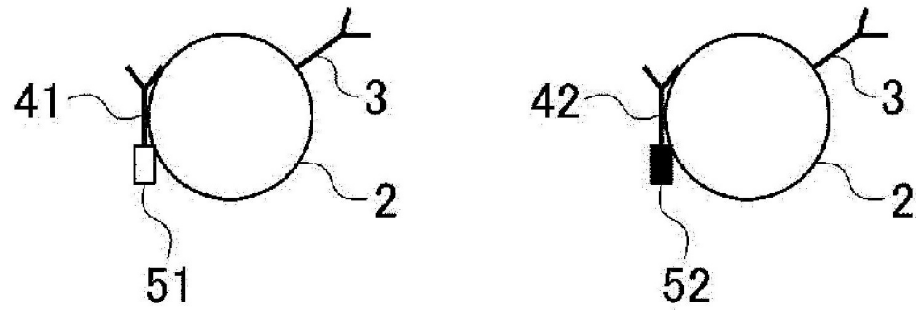
1. Un método para detectar una molécula diana, que comprende una etapa de formación de complejo en la que se hacen reaccionar  
5 una molécula diana,  
un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y  
dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y están etiquetados con enzimas  
que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes  
10 para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre el  
vehículo,  
en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítomos de la molécula diana;  
una etapa de detección en la que se hacen reaccionar  
dos o más sustratos que tienen sitios de escisión por las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado  
15 terminal de cada uno de los sitios de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las  
sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia, y  
el complejo  
para detectar la fluorescencia emitida por las sustancias fluorescentes; y  
una etapa de análisis en la que se procesan dos o más señales de detección de fluorescencia diferentes en longitud  
20 de onda como una señal de detección de la molécula diana.
2. El método de detección según la reivindicación 1, en donde el vehículo es una microperla.
3. El método de detección según las reivindicaciones 1 o 2, que es ELISA digital.
- 25 4. El método de detección según la reivindicación 3, que comprende, entre la etapa de formación de complejo y la  
etapa de detección, una etapa de encerramiento para encerrar los vehículos uno a uno en gotículas formadas sobre  
una placa base.
5. Un método para detectar una molécula diana, que comprende una etapa de formación de complejo en la que se  
30 hacen reaccionar  
una molécula diana,  
una partícula modificada con un primer anticuerpo que se une específicamente a la molécula diana, y  
dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y se proporcionan con etiquetas  
mutuamente diferentes  
35 para formar un complejo que consiste en el primer anticuerpo, la molécula diana y los segundos anticuerpos sobre la  
partícula,  
en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítomos de la molécula diana;  
una etapa de detección en la que se detectan las señales de las etiquetas; y una etapa de análisis en la que se  
40 procesan dos o más señales diferentes de las etiquetas como una señal de detección de la molécula diana.
6. El método de detección según la reivindicación 5, que es ELISA digital.
7. El método de detección según la reivindicación 6, que comprende, entre la etapa de formación de complejo y la  
45 etapa de detección, una etapa de encerramiento para encerrar las partículas una a una en gotículas formadas sobre  
una placa base.
8. Un kit de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), que comprende  
un vehículo modificado con un primer anticuerpo que se une específicamente a una molécula diana,  
50 dos o más segundos anticuerpos que se unen específicamente a la molécula diana y están etiquetados con enzimas  
que tienen una actividad de escisión de sustrato y especificidades de sustrato mutuamente diferentes, en donde el  
primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a diferentes epítomos de la molécula diana, y  
dos o más sustratos que tienen sitios de escisión mediante las enzimas, una sustancia fluorescente unida a un lado  
terminal de cada uno de los sitios de escisión y un desactivador unido a otro lado terminal de estos, en donde las  
55 sustancias fluorescentes son mutuamente diferentes en la longitud de onda de fluorescencia.

FIG.1

(A)



(B)



(C)

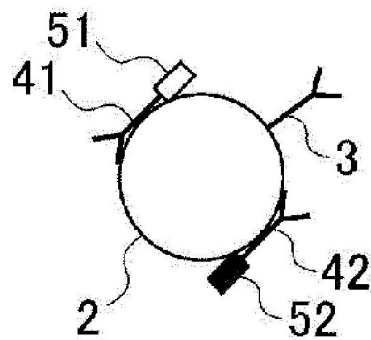


FIG.2

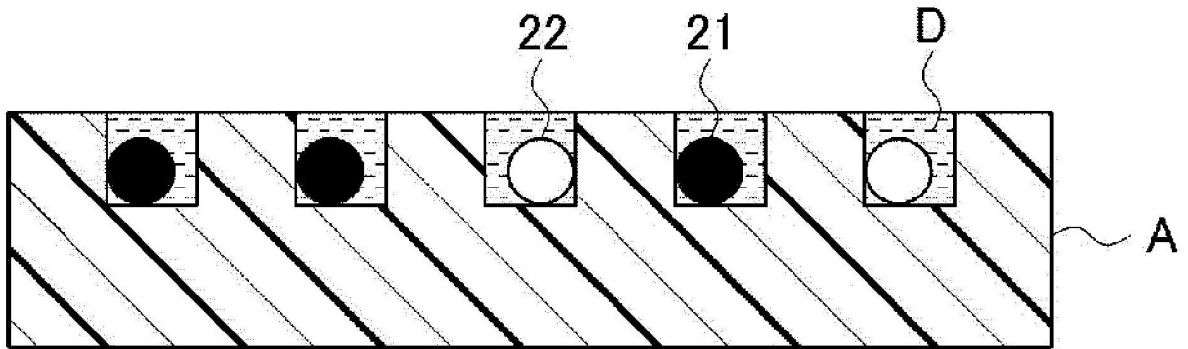


FIG.3

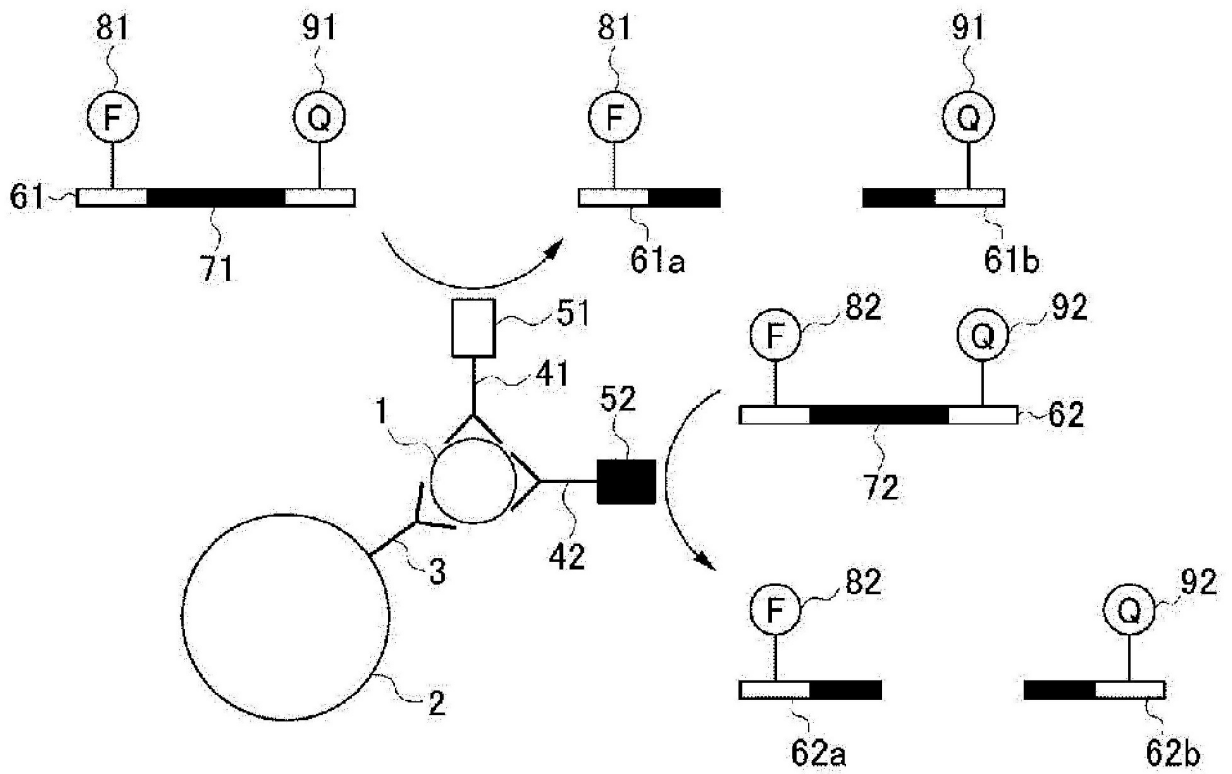


FIG.4

