

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 089**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2017 PCT/JP2017/014943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17179611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2017 E 17782424 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2022 EP 3444612**

54 Título: **Inmunoensayo que emplea polisacárido sulfatado**

30 Prioridad:

13.04.2016 JP 2016080660

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

11.05.2022

73 Titular/es:

**LSI MEDIENCE CORPORATION (100.0%)
13-4, Uchikanda 1-chome Chiyoda-ku
Tokyo 101-8517, JP**

72 Inventor/es:

**SHIMIZU, RYUHEI;
SHOJI, KEIICHI y
ZHANG, XU**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 910 089 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

Inmunoensayo que emplea polisacárido sulfatado

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de medición inmunológica y el uso de un kit capaz de inhibir una diferencia en los valores de medición entre diferentes muestras de prueba, utilizando un polisacárido sulfatado.

10 **Antecedentes técnicos**

En un método de medición inmunológica en el que un analito se mide ópticamente mediante una reacción antígeno-anticuerpo, se confirma un fenómeno en el que los valores medidos son diferentes, por ejemplo, entre una muestra de prueba de suero y una muestra de prueba de plasma, debido a la diferencia de tubos de recogida de sangre usados, y, a veces, esto se convierte en un problema. La causa de la diferencia varía según los elementos a medir y, como uno de los hallazgos conocidos, se puede mencionar la influencia de la insolubilización del fibrinógeno contenido en el plasma en el valor de medición de una muestra de prueba de plasma. Se sabe que la influencia se evita añadiendo un agente quelante con un número de coordinación de 3 o menos a un sistema de reacción que contiene un tensoactivo (Bibliografía de patentes 1).

Asimismo, una muestra de sangre (suero, plasma, o sangre total) se usa generalmente para evaluar, por ejemplo, diversas troponinas cardíacas. Sin embargo, esta selección está limitada dependiendo del método utilizado, por ejemplo, porque se sabe que un suero es una muestra biológica inapropiada para el método de evaluación rápida de la troponina cardíaca, y que la sangre total dificulta la realización de un ensayo cuantitativo. En una medición inmunológica utilizando plasma heparinizado o sangre total heparinizada, incluso cuando el rendimiento del método utilizado es muy alto, a menudo se obtienen resultados poco fiables. En general, si la concentración de troponina cardíaca en plasma no es muy alta, ocurre dicho problema (Bibliografía no de patentes 1). De hecho, se sabe que la presencia de heparina en una muestra de sangre interfiere durante las diferentes mediciones inmunológicas y afecta a los resultados de la medición y como resultado, el diagnóstico clínico del médico puede verse modificado.

Hasta ahora, con respecto a un método para evitar la influencia de sustancias interferentes contenidas en un espécimen en un ensayo de troponina cardíaca, se divulga un método de medición inmunológica caracterizado porque se realiza contra una muestra biológica que contiene heparina en presencia de bromuro de hexadimetrina (polibreno) (Bibliografía de patentes 2).

Sin embargo, era insuficiente para medir de manera estable los especímenes clínicos.

Listado de citas

40 **Bibliografía de patentes**

- [Bibliografía de patentes 1] Patente japonesa N.º 5189067
- [Bibliografía de patentes 2] Publicación no examinada de patente japonesa (Kohyo) N.º 2010-107363

45 **Bibliografía no de patentes**

[Bibliografía no de patentes 1] P.O. Collison *et al.*, Ann. Cli. Biochem., (1995), 32, pp. 454-458 US 2015/0369799 A1 describe la detección precisa y específica de una sustancia objetivo mediante la supresión de la acción de una sustancia inhibidora del inmunoensayo contenida en una muestra de prueba mediante el uso de un sulfato de dextrano. Este documento no hace referencia a la reducción de las diferencias de los valores de analitos medidos entre las muestras de sangre heparinizada y suero.

El documento WO 02/063302 A1 describe el uso de sulfato de protamina para reducir las interferencias anticoagulantes de la heparina en inmunoensayos.

El documento EP3373005 (Art.54(3) documento EPC) divulga que la diferencia en los valores medidos inmunológicamente de la troponina I entre muestras de plasma (que están anticoaguladas con heparina) y muestras de suero se reduce con sulfato de dextrano sódico (= un polisacárido sulfatado).

60 **Sumario de la invención**

Problema técnico

Tal como se describe en detalle en los ejemplos más adelante, los presentes inventores intentaron medir un receptor de interleucina-2 soluble (en lo sucesivo, abreviado algunas veces como sIL-2R) en muestras biológicas (un suero y plasma heparinizado), y observaron una diferencia en los valores medidos, causada por los diferentes tipos de

muestras de prueba para la medición (en lo sucesivo denominados especímenes) preparadas a partir de las muestras biológicas.

5 El objeto de la presente invención es, independientemente del tipo de muestras de prueba, tal como un suero o plasma heparinizado que contenga diferentes anticoagulantes, que se utilizan amplia y generalmente, cuando se detecta inmunológicamente una sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) en una muestra biológica, proporcionar un método de medición y el uso de un kit capaz de obtener mediciones de manera estable con alta precisión, sin verse afectado por las sustancias interferentes en la muestra de prueba.

10 Solución al problema

En estas circunstancias, los presentes inventores han realizado arduos estudios y han observado que, en un método de medición inmunológica de sIL-2R en un suero y plasma heparinizado, independientemente del tipo de muestras de prueba, era posible obtener valores de medición estables con alta precisión, sin verse afectados por las sustancias interferentes en las muestras de prueba, midiendo sIL-2R en condiciones en las que se añadía un polisacárido sulfatado a una solución de reacción, y se completó la presente invención. En particular, hubo resultados inesperados en el sentido de que dichos efectos no se podían obtener con la coexistencia de un polisacárido sin un grupo sulfato y un compuesto sin un polisacárido pero que tenía un grupo sulfato, pero sí se podían obtener en presencia del polisacárido sulfatado. Asimismo, aunque se llevó a cabo la separación B/F, cuando no coexistía el polisacárido sulfatado, la medición se veía afectada por las sustancias interferentes contenidas en la muestra de prueba. Se consideró a partir de los resultados que las sustancias interferentes no eran la insolubilización del fibrinógeno, la influencia de la hemoglobina o similares, que previamente se conocían.

La presente invención se puede ilustrar como sigue:

- 25 [1] Un método para reducir una diferencia en un método de medición inmunológica de una sustancia a medir en una muestra biológica, siendo dicha diferencia la diferencia entre un valor de medición cuando se usa una muestra de sangre a la que se agrega heparina como anticoagulante y un valor de medición cuando se usa un suero, caracterizado por que se forma un inmunocomplejo entre la sustancia a medir y un anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir en presencia de un polisacárido sulfatado, polisacárido en donde la sustancia a medir se selecciona de una proteína, una glucoproteína, una proteína lipídica, un receptor, una enzima, un antígeno vírico, y un anticuerpo antivírico, siempre que la proteína no sea troponina I.
- 30 [2] el método de [1], en donde el polisacárido sulfatado es sulfato de dextrano o sulfato de β -ciclodextrina,
- [3] el método de uno cualquiera de [1] o [2], en donde el polisacárido sulfatado está contenido en una solución para diluir el espécimen y/o una solución de anticuerpo,
- 35 [4] el método de uno cualquiera de [1] a [3], que comprende la etapa de separación B/F del inmunocomplejo formado,
- [5] el método de uno cualquiera de [1] a [4], que comprende poner en contacto la sustancia a medir con un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir, y medir el inmunocomplejo formado por una reacción de antígeno-anticuerpo,
- 40 [6] el método de uno cualquiera de [1] a [5], en donde la sustancia a medir es el receptor de interleucina-2 soluble o el antígeno prostático específico,
- [7] el método de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la sustancia a medir se selecciona del receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R), antígeno prostático específico (PSA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpo y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de linfocitos T humanos-1 (HTLV-1), anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP), marcadores miocárdicos y hormonas,
- 45 [8] el método de [7], en donde el marcador miocárdico a medir se selecciona de creatina quinasa (CKMB) y mioglobina,
- [9] El uso de un kit para medir una sustancia a medir de acuerdo con el método de uno cualquiera de [1] a [8], comprendiendo dicho kit un anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir, y un tampón que contiene un polisacárido sulfatado, en donde la sustancia a medir se selecciona de una proteína, una glucoproteína, una proteína lipídica, un receptor, una enzima, un antígeno vírico, y un anticuerpo antivírico, siempre que la proteína no sea troponina I,
- 50 [10] el uso de [9], que comprende un anticuerpo soportado en una partícula magnética, como el anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir,
- [11] el uso de acuerdo con [9] o [10], en donde la sustancia a medir se selecciona del receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R), antígeno prostático específico (PSA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpo y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de linfocitos T humanos-1 (HTLV-1), anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP), marcadores miocárdicos en particular creatinina quinasa (CKMB) y mioglobina, y hormonas,
- 60 [12] el uso de acuerdo con [11], en donde los marcadores miocárdicos se seleccionan de creatina quinasa (CKMB) y mioglobina, y
- [13] el uso de acuerdo con uno cualquiera de [9] a [12], en donde la sustancia a medir es el receptor de interleucina-2 soluble o el antígeno prostático específico.
- 65

Efectos ventajosos de la invención

Independientemente del tipo de muestras de prueba (un suero y plasma heparinizado), que se utilizan amplia y generalmente, una sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) en una muestra biológica se puede medir de manera estable con alta precisión utilizando el método y el kit de reactivos de la presente invención, sin verse afectado por las sustancias interferentes en la muestra de prueba.

Descripción de realizaciones

La muestra biológica de la presente invención es una muestra recogida de un ser humano y se sospecha que contiene una sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R). Como la muestra biológica, muestras de sangre, tales como sangre total, un suero, plasma, son un ejemplo, y en particular, es preferible que se incluyan un suero y plasma heparinizado en las muestras de prueba.

La muestra de prueba (espécimen), que se puede usar en la presente invención, no está particularmente limitada, siempre que sea una muestra para medir que se pueda preparar a partir de la muestra biológica mencionada anteriormente. Cuando se trata de una muestra de sangre, los especímenes obtenidos utilizando un anticoagulante, tales como sangre total, un suero, plasma, son un ejemplo. Como el anticoagulante, heparina, EDTA, ácido cítrico y similares, son un ejemplo. Preferentemente, el anticoagulante se puede utilizar añadiéndolo de antemano a un tubo de recogida de sangre o similar cuando se recoge de un sujeto a medir, tal como un ser humano. En particular, es preferible cuando se trata en paralelo de un suero y un plasma heparinizado porque el efecto de la presente invención es mayor.

La sustancia a medir, que es el objetivo en la presente invención, no está particularmente limitada, siempre que sea una proteína, una glucoproteína, una proteína lipídica, un receptor, una enzima, un antígeno vírico, un anticuerpo vírico. Particularmente, receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R), antígeno específico prostático (PSA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpo y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de linfocitos T humanos-1 (HTLV-1), anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP); varios marcadores miocárdicos (creatinina quinasa (CKMB), mioglobina, troponina); y varias hormonas. Se prefiere el receptor de interleucina-2 soluble. El receptor de interleucina-2 soluble es un receptor implicado en la respuesta inmunitaria, por ejemplo, está principalmente presente en la membrana de los linfocitos T, que son células inmunitarias y promueve la activación de los linfocitos T formando un complejo con la interleucina-2 como su ligando. El receptor de interleucina-2 tiene tres subtipos, y se sabe que una subunidad α del mismo se aísla de la membrana celular y está presente en la sangre. Dado que el receptor de interleucina-2 soluble mantiene una propiedad de unión con la interleucina-2, se considera que también está implicado en la regulación inmunitaria de un organismo vivo, y se utiliza principalmente como marcador de leucemia aguda en la práctica clínica.

El método de medición inmunológica, que se puede usar en la presente invención, no está particularmente limitado, siempre que sea un método conocido que use un anticuerpo específico para una sustancia que se va a medir. Por ejemplo, un inmunoensayo turbidimétrico (TIA), un inmunoensayo enzimático (EIA), un radioinmunoensayo (RIA), un método de aglutinación en látex, un inmunoensayo de fluorescencia, una inmunocromatografía, son un ejemplo. Más concretamente, es un método en el cual se forma en una solución de reacción un inmunocomplejo de una sustancia a medir contenida en una muestra de prueba con un anticuerpo específico de la sustancia a medir, y se detecta la presencia de la sustancia a medir detectando apropiadamente una señal causada por la formación. Aunque el anticuerpo puede determinarse dependiendo del sistema de medición, se puede seleccionar un método de medición inmunológica en sándwich (un inmunoensayo en sándwich) que usa dos o más anticuerpos para una medición cuantitativa con alta sensibilidad. El método de medición inmunológica en sándwich puede llevarse a cabo en una o más fases (dos fases, tres fases). Por ejemplo, un método que comprende la etapa de formar un inmunocomplejo de una sustancia a medir con un anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir y que está soportado en un vehículo insoluble para la separación B/F, la etapa de separación B/F del inmunocomplejo y la etapa de medir el inmunocomplejo separado, son un ejemplo.

Por ejemplo, cuando el sIL-2R contenido en una muestra biológica es la sustancia a medir, la medición de sIL-2R puede llevarse a cabo preparando un espécimen a partir de la muestra biológica, tal como se ha descrito anteriormente; preparando un espécimen para la medición a partir del espécimen utilizando una solución de dilución de espécimen; formando un inmunocomplejo mezclando un vehículo insoluble en donde se une un anticuerpo que se une específicamente a sIL-2R (un primer anticuerpo) y otro anticuerpo específico de sIL-2R que es diferente del primer anticuerpo y está marcado con una sustancia para marcar (un segundo anticuerpo); eliminando un anticuerpo sin reaccionar y sIL-2R mediante lavado (separación B/F); y midiendo la cantidad de la sustancia marcada unida al vehículo insoluble.

Como el vehículo insoluble, se puede usar un vehículo generalmente utilizado en la técnica. Como un material del vehículo insoluble, por ejemplo, materiales poliméricos, tales como látex, caucho, polietileno, polipropileno, poliestireno, copolímero de estireno-butadieno, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, poli(acrilamida), polimetacrilato, copolímero de estireno-metacrilato, metacrilato de poliglicidilo, copolímero de acroleína-dimetacrilato de etilen glicol, difluoruro de polivinilideno (PVDF), silicona; agarosa; gelatina; eritrocito; materiales inorgánicos, tales

como gel de sílice, vidrio, alúmina inerte, o material magnético son un ejemplo. Estos materiales pueden usarse solos o como una combinación de dos o más.

5 Como la forma del vehículo insoluble, una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, perlas, partículas, nanopartículas, son un ejemplo. Como las partículas, partículas magnéticas, partículas hidrófobas, tales como látex de poliestireno, partículas de látex de copolímero que tienen grupos hidrófilos, tales como un grupo amino, un grupo carboxilo, sobre la superficie, eritrocitos, partículas de gelatina, son un ejemplo. Entre ellas, las partículas magnéticas son especialmente preferidas desde el punto de vista de una rápida y adecuada separación B/F y, más concretamente, pueden usarse preferentemente partículas magnéticas de micropartículas, hechas de metales, tales como óxido férrico (Fe₃O₄), trióxido de dihierro (Fe₂O₃), diversas ferritas, hierro, manganeso, níquel, cobalto, cromo; o aleaciones, tales como cobalto, níquel, manganeso. Asimismo, se pueden usar preferentemente estas partículas magnéticas en la forma en que están contenidas dentro del látex polimérico tal como poliestireno, gelatina, liposomas, o en la forma en que están inmovilizadas en la superficie.

15 El método de inmovilización del primer anticuerpo sobre estos vehículos insolubles es conocido en la técnica. La inmovilización puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un método de adsorción física, un método de enlace covalente, un método de enlace iónico, o combinaciones de los mismos.

20 La sustancia para marcaje no está particularmente limitada, siempre que sea una sustancia para marcar que pueda usarse en un método de medición inmunológica convencional. Por ejemplo, una enzima, una sustancia fluorescente, un isótopo radiactivo, una sustancia en partículas insoluble, son un ejemplo. Como la enzima para marcaje, fosfatasa alcalina, peroxidasa, glucosa oxidasa, tirosinasa, fosfatasa ácida, o similares, son un ejemplo. Como la sustancia fluorescente, isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína verde fluorescente (GFP), luciferina, son un ejemplo. Como el isótopo radiactivo, ¹²⁵I, ¹⁴C, ³²P, son un ejemplo.

25 En el caso de que la sustancia a marcar sea una enzima, la sustancia a marcar se puede medir realizando una reacción de luminiscencia, fluorescencia o coloración usando un sustrato para la enzima. En el caso de que la enzima sea la fosfatasa alcalina, como el sustrato, se puede usar un sustrato quimioluminiscente, tal como CDP-star (marca registrada)(4-cloro-3-(metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-il)fenil fosfato disódico), CSPD-star (marca registrada)(3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-il)fenil fosfato disódico), AMPPD (marca registrada)(adamantil metoxifenil fosforil dioxietano), APS-5, un sustrato fluorescente, tal como 4-metilumbeliferilfosfato o similares; un sustrato cromogénico, tal como p-nitrofenil fosfato, BCIP (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfórico), NBT (cloruro de 4-nitro azul de tetrazolio), INT (yodo-nitrotetrazolio).

35 Como el anticuerpo que se une específicamente a una sustancia a medir, que se puede usar en la presente invención, los expertos en la materia pueden seleccionar y usar apropiadamente un anticuerpo conocido. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a sIL-2R no está particularmente limitado, siempre que sea un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal que reconozca la secuencia de aminoácidos o la estructura tridimensional de sIL-2R como su epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo AM92.3 (fabricado por Pierce), el anticuerpo monoclonal 7G7/B6 (fabricado por Pierce), MAB223 (fabricado por R&D Systems), MAB623 (fabricado por R&D Systems), MAB1020 (fabricado por R&D Systems), YNRhIL2R fabricado por SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), IL2R.1 (fabricado por Abcam), B-B10 (fabricado por Lifetechnologies), EPR6452 (fabricado por Genetex), OAPA00004 (fabricado por AVIVA system biology), DM254-05 (fabricado por Acris antibodies), son un ejemplo.

45 Estos anticuerpos pueden prepararse de acuerdo con un método conocido. Por ejemplo, en el caso de sIL-2R, un animal se inmuniza con sIL-2R purificado a partir de linfocitos T humanos, sIL-2R recombinante preparado *in vitro*, como un antígeno, para preparar un anticuerpo, y además, se puede determinar su epítipo. El epítipo significa no solo la región mínima reconocida por un anticuerpo, sino también una región identificada como la región reconocible por un anticuerpo. Asimismo, se puede usar un fragmento de anticuerpo, tal como Fab o similares, el cual puede prepararse por un método conocido. Estos anticuerpos pueden adquirirse adecuadamente en Genway Biotech, Diaclone, Santa Cruz, R&D Systems.

55 En el caso de que se utilicen dos tipos de anticuerpos en la medición de la presente invención, los anticuerpos no están limitados, siempre que puedan formar un inmunocomplejo con la sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) contenida en una muestra biológica, pero es preferible que los epítopos reconocidos por el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo sean diferentes entre sí. Asimismo, se pueden usar un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal como una combinación apropiada de los mismos. Asimismo, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo no se limitan a un tipo de anticuerpo, y se pueden usar dos o más anticuerpos como cada uno de ellos.

60 En el método de medición inmunológica descrito anteriormente, la adición de un polisacárido sulfatado en la presente invención puede llevarse a cabo de modo que el polisacárido sulfatado esté presente al menos durante la formación del primer inmunocomplejo (en la solución de reacción) de la sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) y el anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R). Más concretamente, el polisacárido sulfatado puede agregarse simultáneamente en el momento de la formación del inmunocomplejo (en la solución de reacción), o puede agregarse al espécimen antes de la formación del inmunocomplejo (antes del contacto entre el anticuerpo y el espécimen que contiene la sustancia a medir).

El polisacárido sulfatado que se va a añadir se puede preparar como una solución disolviéndolo en un tampón conocido. Además de eso, el tampón se puede preparar solo o junto con una o más sustancias conocidas requeridas en un pretratamiento del espécimen, o en la reacción. Dado que el polisacárido sulfatado puede añadirse al menos durante la formación del inmunocomplejo (en la solución de reacción), como se ha descrito anteriormente, éste puede estar contenido en un tampón. El tampón puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de un método de medición y del instrumento usado, pero una solución de dilución del espécimen, una solución de anticuerpos (una solución de partículas inmovilizadas con anticuerpos, una solución de anticuerpos marcados), son un ejemplo. Asimismo, el polisacárido sulfatado puede agregarse a múltiples tampones.

Como el polisacárido sulfatado en la presente invención, sulfato de dextrano, sulfato de β -ciclodextrina, N-acetil heparina (NAH), heparina N-acetil-de-O-sulfatada (NA-de-o-SH), heparina de-N-sulfatada (De-NSH), heparina de-N-sulfatada-acetilada (De-NSAH), heparina oxidada con ácido peryódico (POH), laminarina sulfatada química (CSL), ácido alginico sulfatado químico (CSAA), pectina sulfatada química (CSP), oligosacárido derivado de heparina (HDO), polisulfato de pentosano (PPS), fucoidan, son un ejemplo. Preferentemente, como ejemplo se puede citar sulfato de dextrano y sulfato de β -ciclodextrina. El polisacárido sulfatado puede agregarse en cualquier forma, siempre que pueda existir como iones en la solución de reacción. Por ejemplo, se puede citar como ejemplo polisacárido de cloruro sulfatado o polisacárido de bromuro sulfatado, y más particularmente, se puede citar la coexistencia con cloruro de litio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, bromuro de litio, bromuro de sodio, bromuro de potasio, bromuro de calcio, bromuro de magnesio, bromuro de amonio, siendo preferido el cloruro de sodio.

La concentración del polisacárido sulfatado en la presente invención, como la concentración en el momento de la formación del inmunocomplejo, se puede seleccionar como una combinación adecuada del grupo que consiste en más de 0,000004 %, 0,000004 % o más, preferentemente 0,00004 % o más, más preferentemente 0,0004 % o más, aún más preferentemente 0,004 % o más, aún más preferentemente 0,04 % o más, aún más preferentemente 0,01 % o más y aún más preferentemente 0,02 % o más; y 1 % o menos, preferentemente 0,4 % o menos, y más preferentemente 0,04 % o menos. En la presente invención, independientemente de la presencia de polisacáridos sulfatados en una muestra biológica (por ejemplo, heparina en plasma heparinizado), se permite que el polisacárido sulfatado en la solución de reacción exista en el intervalo de concentración anterior. En relación con esto, hay que tener precaución, porque si el polisacárido sulfatado en la solución de reacción aumenta demasiado, se suprime (inhibe) la reacción antígeno-anticuerpo y la medición deseada no se puede realizar con una alta precisión. Para medir de manera estable sIL-2R en una muestra biológica con una alta precisión, independientemente del tipo de espécimen de acuerdo con la presente invención, se diseña un intervalo para determinar la concentración a agregar dependiendo de la cantidad de sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) contenida en el espécimen y el polisacárido sulfatado utilizado. Por ejemplo, 0,000004 % o más y 0,04 % o menos para el sulfato de dextrano (peso molecular: 20.000), 0,0004 % o más y 0,04 % o menos para el sulfato de dextrano (peso molecular: 4.000), 0,02 % o más y 0,4 % o menos para el sulfato de β -ciclodextrina, son un ejemplo.

Tal como se muestra en los Ejemplos, a continuación, la concentración y el tipo de polisacárido sulfatado en la presente invención pueden determinarse fácilmente por los expertos en la materia, preparando una muestra de sangre a la que se le agrega heparina (plasma heparinizado) y otras muestras (un suero); midiendo la sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R) en cada muestra de sangre en presencia de varias concentraciones diferentes de polisacárido sulfatado; y determinando el intervalo de concentración del polisacárido sulfatado donde los valores medidos de ambas muestras son concordantes entre sí. Es decir, la concentración y el tipo de polisacárido sulfatado en la presente invención pueden seleccionarse en un intervalo de concentración donde un valor medido obtenido al usar una muestra de sangre a la que se le agrega heparina como anticoagulante (plasma heparinizado) concuerda con un valor medido obtenido al usar otras muestras (un suero). El hecho de que los valores medidos concuerden entre sí significa concretamente que el valor medido (un recuento óptico proporcionado con un instrumento de medición, una concentración calculada usando un patrón) está dentro del intervalo entre -10 % y +10 %. En general, puede considerarse clínicamente útil, si está dentro del intervalo.

El uso de un kit para medir una sustancia a medir de acuerdo con el método de la presente invención, comprendiendo dicho kit un anticuerpo que se une específicamente a una sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R), y un tampón que contiene un polisacárido sulfatado.

Como el anticuerpo que se une específicamente a una sustancia a medir, se puede usar un anticuerpo conocido descrito anteriormente y se puede usar un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Asimismo, puede usarse en el kit un fragmento de anticuerpo que mantiene una propiedad de unión específica a la troponina cardíaca, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, o Fv.

Asimismo, en el kit el anticuerpo se puede utilizar tal cual, o en una forma adecuada para el método inmunológico utilizado. Por ejemplo, puede usarse en el kit, en un estado de inmovilización a un soporte de látex, cuando se usa un método de aglutinación en látex; en un estado de inmovilización a partículas magnéticas, cuando se utiliza un método de medición de alta sensibilidad que utiliza partículas magnéticas; en un estado de inmovilización a un sustrato, cuando se usa una inmunocromatografía usando un sustrato; o en un estado marcado, cuando es necesario marcar con una

sustancia marcadora (una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, un isótopo radiactivo, biotina o avidina).

5 Tal como se menciona anteriormente, como el tampón que contiene el polisacárido sulfatado, por ejemplo, una solución de dilución del espécimen, una solución de anticuerpo (una solución de partículas inmovilizadas con anticuerpos o una solución de anticuerpo marcado), son un ejemplo. Se prefiere la solución de dilución del espécimen.

10 El kit usado en la presente invención puede comprender un manual de instrucciones, en el cual se incluye la explicación sobre los procedimientos del método de medición inmunológica usando el kit de la presente invención, precauciones relativas a la conservación, manipulación, o el propio kit.

Ejemplos

15 La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

"Ejemplo de referencia 1: Preparación de reactivo para medir el receptor de interleucina-2 soluble y medición)"

Ejemplo de referencia 1-1: Preparación de reactivo para medir el receptor de interleucina-2 soluble y muestras a medir

20 Se preparó un reactivo para medir un receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R).

- Solución de dilución del espécimen: Se usó un tampón que contiene 0,1 mol/l de HEPES (8,0), 0,15 mol/l de NaCl, y Tween20 al 0,05 %.
- 25 ▪ Solución del primer anticuerpo: se utilizó una solución de partículas magnéticas que contenía partículas de látex magnético (JSR) sobre las que se había inmovilizado un anticuerpo monoclonal de ratón (fabricado por R&D Systems) que reconocía sIL-2R.
- Solución del segundo anticuerpo: se utilizó una solución de anticuerpo marcado que contenía otro anticuerpo monoclonal de ratón (fabricado por R&D Systems) que reconocía sIL-2R y que estaba marcado con fosfatasa alcalina (ALP) mediante un método de maleimida.
- 30 ▪ Solución de sustrato luminiscente: se usó CDP-star (fabricado por Applied Biosystems).
- Solución de lavado B/F: Se usó un tampón que contiene 0,01 mol/l de MOPS (7,5), 0,15 mol/l de NaCl, y Triton X-100 al 0,05 %.
- Muestras a medir (especímenes): Se utilizó un suero y plasma heparinizado obtenidos de una persona sana de acuerdo con un método convencional.

35 Ejemplo de referencia 1-2: Medición con reactivo para medir el receptor de interleucina-2 soluble

Medición utilizando el sistema de pruebas clínicas automatizado (STACIA: fabricado por LSI Medience Corporation)

40 Los frascos especiales de STACIA se llenaron individualmente con la solución de dilución del espécimen preparada anteriormente, la solución del primer anticuerpo (reactivo de látex magnético) y la solución del segundo anticuerpo (reactivo de anticuerpo marcado con enzima) y se colocaron en el instrumento. La medición se llevó a cabo de acuerdo con el método de operación del instrumento de la siguiente manera: Más concretamente, se añadieron 50 µl de la solución de dilución del espécimen a 5 µl de un espécimen, y se calentó a 37 °C durante 3,5 minutos y, a continuación,

45 se añadieron 25 µl de la solución del primer anticuerpo (reactivo de látex magnético) y se calentó a 37 °C durante 4,2 minutos. El sIL-2R en el espécimen reaccionó con el primer anticuerpo: (látex magnético) formando un complejo látex magnético-sIL-2R. A continuación, se añadieron 50 µl de la solución del segundo anticuerpo (reactivo de anticuerpo marcado con enzima) y se calentó a 37 °C durante 4,4 minutos. Cuando se le añadió la solución del segundo anticuerpo (anticuerpo marcado con ALP), el anticuerpo marcado con ALP se hizo reaccionar con el complejo látex magnético-sIL-2R para formar un complejo látex magnético-sIL-2R-anticuerpo marcado con ALP. Después de eliminar los anticuerpos sin reaccionar y sIL-2R mediante lavado (separación B/F), se añadieron 100 µl de la solución de sustrato luminiscente. Después de una reacción a 37 °C durante 2,7 minutos, se midió la cantidad de luminiscencia. Cuando se añadió CDP-Star, el CDP-Star fue hidrolizado por la ALP contenida en el complejo emitiendo luz. En la

50 detección, el recuento de luminiscencia del sustrato quimioluminiscente detectada por un tubo fotomultiplicador (PMT) se consideró como el resultado de la medición.

"Ejemplo 1: Efecto de la adición de polisacárido sulfatado, polisacárido sin grupo sulfato o compuesto sin polisacárido pero que tiene grupo sulfato a la solución de reacción sobre la reactividad de sIL-2R"

60 La medición se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, excepto que se añadió uno cualquiera de los polisacáridos sulfatados, polisacáridos sin un grupo sulfato o compuestos sin un polisacárido pero que tienen un grupo sulfato a la solución de dilución del espécimen para obtener las siguientes concentraciones en la solución de reacción.

- 65 ▪ Polisacáridos sulfatados: Se añadió sulfato de dextrano (peso molecular: 4000) a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %. Se añadió sulfato de β-ciclodextrina a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %.

- Polisacáridos sin un grupo sulfato: se agregó dextrano a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %. Se añadió ciclodextrina a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %.
- Compuestos sin un polisacárido pero que tienen un grupo sulfato: Se añadió CHAPSO a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %. Se añadió octanoato de sodio a la solución de dilución del espécimen hasta obtener 0,04 %. La medición se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, excepto por lo anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla 1. El valor obtenido al dividir el recuento del plasma heparinizado por el recuento del suero y multiplicarlo después por 100 se mostró como plasma heparinizado/suero. En el caso de no adición, se observó que la reactividad del receptor de interleucina-2 soluble era diferente entre el suero y el plasma heparinizado. Asimismo, en el caso de polisacáridos que tienen grupos sulfato (polisacáridos sulfatados), tales como sulfato de dextrano (peso molecular: 4000), sulfato de β -ciclodextrina, o similares, la reactividad en el suero fue concordante con la del plasma heparinizado (plasma heparinizado/suero era 99 % o 100 %), pero en el caso de solo polisacáridos sin un grupo sulfato, tales como dextrano, ciclodextrina o similares, o compuestos sin un polisacárido pero que tienen un grupo sulfato, tales como CHAPSO, octanoato de sodio, o similares, la reactividad en el suero no fue concordante con la del plasma heparinizado (plasma heparinizado/suero era 130 % a 138 %). Se demostró que era necesaria la adición de un polisacárido que tuviera grupos sulfato para que la reactividad en el suero fuera concordante con la del plasma heparinizado.

[Tabla 1]

	Sin adición	Sulfato de dextrano (4.000)	Sulfato de β -ciclodextrina	Dextrano (2.000)	Ciclodextrina	CHAPSO	Octanoato sódico
Muestra de suero (recuento)	15544	21591	21328	16185	16156	15508	16224
Plasma heparinizado/suero (recuento)	20779	21462	21310	21112	22316	20981	21349
Plasma heparinizado/suero	134 %	99 %	100 %	130 %	138 %	135 %	132 %

"Ejemplo 2: Efecto de la adición de varios polisacáridos sulfatados a la solución de reacción sobre la reactividad del receptor de interleucina-2 soluble"

La medición se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, excepto por la siguiente descripción.

- Solución de dilución del espécimen: Se usó un tampón que contiene 0,1 mol/l de HEPES (8,0), 0,15 mol/l de NaCl, Tween20 al 0,05 % y 0,4 mmol/l de ácido etilendiaminotetraacético.
- Se añadió sulfato de dextrano (peso molecular: 20.000) a la solución de dilución del espécimen de modo que se obtuviese cada una de las concentraciones (0,0000004, 0,000004, 0,00004, 0,0004, 0,004, 0,04 %) en la solución de reacción.
- Se añadió sulfato de dextrano (peso molecular: 4.000) a la solución de dilución del espécimen de modo que se obtuviese cada una de las concentraciones (0,000004, 0,00004, 0,0004, 0,004, 0,04 %) en la solución de reacción.
- Se añadió sulfato de β -ciclodextrina a la solución de dilución del espécimen de modo que se obtuviese cada una de las concentraciones (0,004, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,2, 0,4 %) en la solución de reacción.
- Patrón: Se usó una serie de diluciones obtenida al diluir sIL-2R recombinante hasta 100.000, 40.000, 2.500, 500 y 0 U/ml. A esta dilución, se usó un tampón que contiene 0,05 mol/l de PBS (7,4), Tween20 al 0,05 %, BSA al 0,1 % y azida sódica al 0,05 %. El patrón se usó para calcular cada concentración (U/ml) de cada recuento de luminiscencia de acuerdo con un método conocido.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. El valor obtenido al dividir la concentración del plasma heparinizado por la concentración del suero y multiplicarlo después por 100 se mostró como plasma heparinizado/suero. En el caso de no adición, se observó que la reactividad del receptor de interleucina-2 soluble era diferente entre el suero y el plasma heparinizado.

Como resultado, cuando el intervalo que se consideró que era concordante se definió como -10 % a +10 %, se confirmó que la reactividad del receptor de interleucina-2 soluble en el suero era concordante con la del plasma heparinizado al agregar 0,000004 % o más de sulfato de dextrano (peso molecular: 20.000), 0,0004 % o más de sulfato de dextrano (peso molecular: 4.000), o 0,004 % o más de sulfato de β -ciclodextrina.

[Tabla 2]

Se añadió sulfato de dextrano (peso molecular: 20.000)										
Concentración de polisacárido sulfatado (%)	0	0,0000004 %	0,0000004 %	0,000004 %	0,00004 %	0,0004 %	0,0004 %	0,004 %	0,04 %	0,04 %
Muestra de suero (U/ml)	119	185	224	259	270	271	267	266	270	271
Plasma heparinizado/suero (U/ml)	142	223	223	247	252	252	267	266	266	267
Plasma heparinizado/suero	119 %	121 %	100 %	95 %	97 %	97 %	99 %	99 %	99 %	99 %
Se añadió sulfato de dextrano (peso molecular: 4.000)										
Concentración de polisacárido sulfatado (%)	0	0,0000004 %	0,000004 %	0,00004 %	0,0004 %	0,004 %	0,004 %	0,04 %	0,04 %	0,04 %
Muestra de suero (U/ml)	119	175	176	217	259	262	249	249	262	262
Plasma heparinizado/suero (U/ml)	142	217	217	235	245	249	249	249	249	249
Plasma heparinizado/suero	119 %	124 %	123 %	108 %	95 %	95 %	95 %	95 %	95 %	95 %
Sulfato de β-ciclodextrina										
Concentración de polisacárido sulfatado (%)	0,000 %	0,004 %	0,01 %	0,02 %	0,04 %	0,08 %	0,2 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %
Muestra de suero (U/ml)	119	147	161	173	170	180	192	191	192	191
Plasma heparinizado/suero (U/ml)	142	149	174	175	168	162	174	189	174	189
Plasma heparinizado/suero	119 %	101 %	108 %	101 %	99 %	90 %	91 %	99 %	91 %	99 %

"Ejemplo comparativo 1: Efecto de la adición de polisacáridos sin un grupo sulfato y compuestos sin un polisacárido pero que tienen un grupo sulfato a la solución de reacción sobre la reactividad de sIL-2R"

5 Un polisacárido sin un grupo sulfato y un compuesto sin un polisacárido pero que tiene un grupo sulfato se añadieron simultáneamente a la solución de reacción para examinar si mostraban o no una reactividad similar a los polisacáridos sulfatados. La medición se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo de referencia 1, excepto que se añadieron a la solución de dilución del espécimen un polisacárido sin un grupo sulfato y un compuesto sin un polisacárido pero que tiene un grupo sulfato para obtener las siguientes concentraciones.

10 ▪ Compuestos sin un polisacárido pero que tienen un grupo sulfato: NDSB-195, NDSB-201, y NDSB-256 se añadieron individualmente a la solución de dilución del espécimen para obtener 0,385 mmol/l y 3,85 mmol/l.

15 ▪ Mezcla de un compuesto sin un polisacárido pero que tiene un grupo sulfato y un polisacárido sin un grupo sulfato: se agregaron NDSB-195 y dextrano (peso molecular: 2000) a la solución de dilución del espécimen para obtener 3,85 mmol/l y 0,19 %, respectivamente.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 3. El valor obtenido al dividir la concentración del plasma heparinizado por la concentración del suero y multiplicarlo después por 100 se mostró como plasma heparinizado/suero. Como resultado, se observó que el valor medido del suero no era concordante con el del plasma heparinizado en el caso de los compuestos sin un polisacárido pero que tenían un grupo sulfato, y que los valores medidos no eran concordantes entre sí cuando se añadía adicionalmente el polisacárido sin un grupo sulfato.

25 En el caso de la coexistencia del polisacárido sin un grupo sulfato y el compuesto sin un polisacárido pero que tiene un grupo sulfato, no se obtuvieron efectos similares a los de los polisacáridos que tienen grupos sulfato de los ejemplos 1 y 2. Fue un resultado inesperado, porque estos considerables efectos pudieron obtenerse en presencia del polisacárido que tiene grupos sulfato, y no pudieron obtenerse con la coexistencia del grupo sulfato y el polisacárido.

[Tabla 3]

Compuesto	Sin adición	NDSB-195		NDSB-201		NDSB-256		NDSB-195 +dextrano (2000)
		3,85mM	0,385mM	3,85mM	0,385mM	3,85mM	0,385mM	
Concentración	-							
Muestra de suero (recuento)	5352	5476	5388	5317	5352	5390	5200	3,85mM+0,19 % 5822
Plasma heparinizado/suero (recuento)	6619	6943	7173	6678	7143	7115	7055	7617
Plasma heparinizado/suero	124 %	127 %	133 %	126 %	133 %	132 %	136 %	131 %

"Ejemplo 3: Efecto de la adición de polisacárido sulfatado a la solución de reacción sobre la reactividad del receptor de PSA total"

Ejemplo 3-1: Preparación de reactivo para medir el PSA total y muestras a medir

5

Se preparó un reactivo para medir el PSA total.

- 10 ▪ Solución de dilución del espécimen: Se usó un tampón que contiene 0,1 mol/l de HEPES (8,0), 0,15 mol/l de NaCl, y Tween20 al 0,05 %.
- 10 ▪ Solución del primer anticuerpo: se utilizó una solución de partículas magnéticas que contenía partículas de látex magnético (JSR) sobre las que se había inmovilizado un anticuerpo monoclonal de ratón (fabricado por Biospacific) que reconocía PSA.
- 15 ▪ Solución del segundo anticuerpo: se utilizó una solución de anticuerpo marcado que contenía otro anticuerpo monoclonal de ratón (fabricado por Biospacific) que reconocía PSA y que estaba marcado con fosfatasa alcalina (ALP) mediante un método de maleimida.
- 15 ▪ Solución de sustrato luminiscente: se usó CDP-star (fabricado por Applied Biosystems).
- 20 ▪ Solución de lavado B/F: Se usó un tampón que contiene 0,01 mol/l de MOPS (7,5), 0,15 mol/l de NaCl, y Triton X-100 al 0,05 %.
- 20 ▪ Se añadió sulfato de β -ciclodextrina a la solución de dilución del espécimen de modo que se obtuviese cada una de las concentraciones (0,002, 0,004, 0,008, y 0,031 %) en la solución de reacción.
- 20 ▪ Muestras a medir (especímenes): Se utilizó un suero y plasma heparinizado obtenidos de una persona sana de acuerdo con un método convencional.
- 25 ▪ Patrón: Se usó una serie de diluciones obtenida al diluir PSA recombinante hasta obtener 100, 50, 10, 1 y 0 ng/ml. A esta dilución, se usó un tampón que contiene 0,01 mol/l de MOPS (7,0), 0,15 mol/l de NaCl, TritonX al 0,05 % y Proclin300 al 0,05 %. El patrón se usó para calcular cada concentración (ng/ml) de cada recuento de luminiscencia de acuerdo con un método conocido.

Ejemplo 3-2: Medición con reactivo para medir el PSA total y resultados

30 La medición se llevó a cabo de manera similar al Ejemplo de referencia 1-2, excepto que el objeto a medir era el PSA total.

35 Los resultados se muestran en la Tabla 4. El valor obtenido al dividir la concentración del plasma heparinizado por la concentración del suero y multiplicarlo después por 100 se mostró como plasma heparinizado/suero. En el caso de no adición, se observó que la reactividad del PSA total era diferente entre el suero y el plasma heparinizado. Asimismo, cuando el intervalo que se consideró era concordante se definió como -10 % a +10 %, se confirmó que la reactividad del PSA total en el suero era concordante con la del plasma heparinizado al agregar 0,002 % o más de sulfato de β -ciclodextrina.

40

[Tabla 4]

Sulfato de β -ciclodextrina	0.000 %	0,031 %	0,008 %	0,004 %	0,002 %
Concentración de polisacárido sulfatado (%)	0,48	0,54	0,54	0,58	0,53
Muestra de suero (ng/ml)	0,56	0,58	0,58	0,59	0,54
Plasma heparinizado/suero (ng/ml)	116 %	107 %	106 %	101 %	103 %

Aplicabilidad industrial

45 De acuerdo con la presente invención, cuando se detecta una sustancia a medir (por ejemplo, sIL-2R), en particular, independientemente del tipo de espécimen generalmente utilizado (suero y plasma heparinizado), es posible obtener de forma estable el resultado de la medición con una gran precisión, sin verse afectado por las sustancias interferentes en el espécimen. Las pruebas clínicas deben medirse de manera conveniente y rápida, y también se miden no solo en el laboratorio sino también en el campo POCT. Por ejemplo, cuando se trata de muestras de sangre, considerando la posibilidad de poder medirlas en diversas circunstancias, ya que los recipientes utilizados para recoger las muestras son diversos, independientemente del tipo de espécimen obtenido, en particular, cuando se trata de un suero o plasma heparinizado de uso general, es particularmente útil la presente invención en la cual el resultado de la medición se puede obtener de forma estable.

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir una diferencia en un método de medición inmunológica de una sustancia a medir en una muestra biológica, siendo dicha diferencia la diferencia entre un valor de medición cuando se usa una muestra de sangre a la que se agrega heparina como anticoagulante y un valor de medición cuando se usa un suero, **caracterizado por que** se forma un inmunocomplejo entre la sustancia a medir y un anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir en presencia de un polisacárido sulfatado, en donde la sustancia a medir se selecciona de una proteína, una glucoproteína, una proteína lipídica, un receptor, una enzima, un antígeno vírico y un anticuerpo antivírico, siempre que la proteína no sea troponina I.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polisacárido sulfatado es sulfato de dextrano o sulfato de β -ciclodextrina.
3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el polisacárido sulfatado está contenido en una solución para diluir el espécimen y/o una solución de anticuerpo.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la etapa de separación B/F del inmunocomplejo formado.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende poner en contacto la sustancia a medir con un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo que se unen específicamente a la sustancia a medir, y medir el inmunocomplejo formado mediante una reacción de antígeno-anticuerpo.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sustancia a medir es el receptor de interleucina-2 soluble o el antígeno prostático específico.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sustancia a medir se selecciona del receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R), antígeno prostático específico (PSA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpo y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de linfocitos T humanos-1 (HTLV-1), anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP), marcadores miocárdicos y hormonas.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el marcador miocárdico a medir se selecciona de creatina quinasa (CKMB) y mioglobina.
9. El uso de un kit para medir una sustancia a medir de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, comprendiendo dicho kit un anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir, y un tampón que contiene un polisacárido sulfatado, en donde la sustancia a medir se selecciona de una proteína, una glucoproteína, una proteína lipídica, un receptor, una enzima, un antígeno vírico, y un anticuerpo antivírico, siempre que la proteína no sea troponina I.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende un anticuerpo soportado en una partícula magnética, como el anticuerpo que se une específicamente a la sustancia a medir.
11. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde la sustancia a medir se selecciona del receptor de interleucina-2 soluble (sIL-2R), antígeno prostático específico (PSA), antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpo y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC), anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), anticuerpo del virus de la leucemia de linfocitos T humanos-1 (HTLV-1), anticuerpo de *Treponema pallidum* (TP), marcadores miocárdicos en particular creatinina quinasa (CKMB) y mioglobina, y hormonas.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde los marcadores miocárdicos se seleccionan de creatina quinasa (CKMB) y mioglobina.
13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde la sustancia a medir es el receptor de interleucina-2 soluble o el antígeno prostático específico.