



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 357 405**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06726468 .9**

(96) Fecha de presentación : **23.03.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1861719**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

(54) Título: **Detección de antígenos.**

(30) Prioridad: **24.03.2005 GB 0506183**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

(73) Titular/es: **ALBA BIOSCIENCE LIMITED**
Ellen's Glen Road
Edinburgh EH17 7QT, GB

(72) Inventor/es: **Robb, Janine, Scott;**
Petrik, Juraj;
Ghazal, Peter y
Campbell, Colin

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 405 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

Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos de antígenos de grupos sanguíneos presentes en una muestra de glóbulos rojos que se están ensayando dichos procedimientos no emplean la adición de marcas extrínsecas para detectar dichos antígenos de superficie celular. La detección se lleva a cabo usando una capacidad de fluorescencia intrínseca de los glóbulos rojos que se están ensayando.

Antecedentes de la Invención

La tipificación de la sangre en los campos clínicos y de transfusión se lleva a cabo de manera típica usando ensayos de tipificación o bien en placas de pocillos múltiples, véase por ejemplo, documento US 4.770.856, o en formato tarjeta/columna (por ejemplo los documentos US 5.552.064 y US 5.338.689). Adicionalmente, la tipificación por procedimiento múltiple se puede llevar a cabo usando citometría de flujo, pero esto requiere marcado fluorescente y aparato relativamente complejo.

El documento US 4.851.210 desvela un dispositivo de tipificación de sangre basado en el flujo capilar a través de una membrana, que comprende una disposición para los anticuerpos de tipo específico capaz de unirse a los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos unidos se pueden detectar visualmente por el color rojo de las células, o mediante el uso de agentes detectables tales como colorantes, anticuerpos marcados de manera detectable, o o ligandos de actividad marcados de manera detectable.

El documento EP0223978 desvela procedimientos y dispositivos para determinar la clasificación del grupo sanguíneo de las muestras de sangre o suero, utilizando un sustrato poroso que comprende uno o más anticuerpos unidos a él en áreas de adsorción delimitadas. Los glóbulos rojos unidos se detectan mediante una señal de color de eritrocitos unidos a los anticuerpos.

No obstante, cualesquiera sistemas actuales que dependen de la detección visual en general requieren una muestra relativamente grande de sangre y / o un área suficientemente grande de para unirse a los glóbulos rojos, de modo que el color se pueda discernir fácilmente visualmente se apreciará que pueden ser no deseables. Además, la detección visual puede ser no preferible ya que puede dar como resultado un error humano e interpretación incorrecta de resultados. De este modo, puede ser deseable utilizar un sistema automático.

Es un objeto de la presente invención obviar y / o mitigar al menos una de las desventajas anteriormente mencionadas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en las observaciones por los presentes inventores que ciertas células son capaces de auto-fluorescencia. Esto es, las células se pueden exponer a la luz de una primera longitud de onda y puede ser fluorescente a una segunda longitud de onda, que se pueda detectar, usando, por ejemplo, un aparato foto elector apropiado. De esta manera las células se pueden detectar sin el uso de agentes de marcado adicionales.

En un primer aspecto se proporciona un procedimiento para determinar un grupo sanguíneo de una muestra de sangre, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una muestra de sangre, que comprende glóbulos rojos a un dispositivo que comprende un sustrato que comprende uno o más agentes de unión unidos a él, en el que dichos agentes de unión son capaces de unirse de manera específica a antígenos del grupo de los glóbulos rojos específicos que pueden estar presentes en la muestra de sangre;

b) permitir que cualesquiera antígenos de glóbulos rojos presentes en la muestra de sangre reaccionar de manera específica con dichos agentes de unión unidos;

c) sustancialmente eliminar o reducir cualquier material no unido de al menos un área del sustrato al que dichos agentes de unión están unidos; y

d) detectar directamente cualesquiera antígenos unidos a dichos agentes de unión con el fin de determinar un grupo sanguíneo de sujetos; llevándose a cabo la detección mediante exposición de los glóbulos rojos unidos a una primera longitud de onda y detectar la fluorescencia intrínseca de los glóbulos rojos unidos a una segunda longitud de onda más larga.

Los ensayos de la presente divulgación se pueden usar para detectar, por ejemplo, cualquier antígeno de grupo sanguíneo específico. Los sistemas de grupos sanguíneos más comunes son los sistemas ABO y D (Rhesus) bien conocidos en la técnica, aunque otros sistemas tales como Kell, Duffy, Lewis, Kidd y Fisher también se conocen y se

pueden ensayar para o de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. Véase también Handbook of Transfusion Medicine, McClelland, DBL, Ed; TSO Londres, 2001.

Típicamente, los agentes de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos de los antígenos a detectar. Sin embargo, se pueden emplear otros agentes de unión específicamente reactivos, tales como miméticos de anticuerpo de molécula pequeña, o receptores de otras células que son capaces de unirse a dichos antígenos. También se pueden emplear lectinas. Sin embargo, para simplicidad de aquí en adelante se hará referencia a anticuerpos, pero no se debe considerar como limitante.

Con el fin de detectar si un determinante antigénico particular está presente o no en una muestra de células, se proporcionará un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al antígeno particular, unido al sustrato. Por ejemplo, para detectar células del tipo ABO, el sustrato comprenderá anticuerpos anti-A y anti-B. Células que se unen solamente a los anticuerpos anti-A serán el tipo A; células que se unen solamente a los anticuerpos anti-B serán del tipo B; células que se unen a los anticuerpos anti-A y anti-B serán el tipo AB; y células que no se unen a cualesquiera anticuerpos anti-A o anti-B serán el tipo O. Con referencia a la detección de si o no una muestra de células sanguíneas son Rhesus-positivo o Rhesus negativo, anticuerpos Anti-D, Anti-C y / o Anti-E en general se unirán al sustrato ya que el D antígeno es el más potente de los antígenos de Rhesus y el más comúnmente implicado en la sensibilización por transfusión o embarazo.

Como un control positivo, con el fin de asegurar que los antígenos de glóbulos rojos están de hecho unidos, se pueden usar lectinas o anti-H. Esto puede ser ventajoso cuando ni los anticuerpos anti-A o anti-B se unen a los glóbulos rojos, como puede ser el caso cuando la sangre es del tipo O.

Los anticuerpos unidos al sustrato pueden ser policlonal o monoclonal. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizadas con un antígeno, o si derivado funcional antigénico. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar animales por ejemplo conejos, ovejas, cerdos, etc., se pueden inmunizar mediante inyección con un antígeno específico suplementado opcionalmente con adyuvantes.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos para una antígeno particular, se puede obtener mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstos incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, Nature 256: 495 - 497; y la Patente de Estados Unidos US N° 4.376.110), la técnica de hibridoma de células B (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026 - 2030), y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., 1985, Monoclonal Anti-bodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., p.77 - 96).

Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce el mAb se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. La producción de altas valoraciones de mAbs *in vivo* hace que éste sea el procedimiento de producción actualmente preferido.

Además, se pueden usar técnicas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851 - 6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604 - 608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452 - 454; Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) por unión de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de una especificidad de antígeno apropiada conjuntamente con los genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en las que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de mAb de tipo murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

De manera alternativa, se pueden utilizar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778: Bird, 1988, Science 242: 423 - 426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879 - 5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544 - 546) y para preparar anticuerpos monoclonales humanizados (Patente de Estados Unidos N° 5.225.539).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopes específicos se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir mediante digestión por pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden producir mediante reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. De manera alternativa, las genotecas de expresión Fab expression libraries se pueden construir (Huse et al., 1989, Science, 246: 1275 - 1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Típicamente, los anticuerpos están unidos al sustrato en una disposición. Como se usa en el presente documento el término "disposición" se refiere a una disposición ordenada de manera general de anticuerpos unidos, que específicamente se unen a antígenos de glóbulos rojos, especialmente antígenos de la superficie celular, sobre un sustrato tal como un vidrio. Típicamente la disposición puede estar en la forma de una serie de áreas delimitadas aparte

regularmente separadas a las que los anticuerpos están unidos. Tales disposiciones de anticuerpo unido al sustrato se pueden describir de manera común como "escama de anticuerpo".

Los anticuerpos se pueden disponer sobre por ejemplo, un sustrato plano o esférico denominado aquí como "escama" de manera que son preferiblemente al menos uno o más anticuerpos diferentes más preferiblemente al menos aproximadamente 2 anticuerpos, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 4 anticuerpos están unidos a la superficie de sustrato. Además, cada anticuerpo específico se puede proporcionar en un número de diluciones y / o repetirse un número de veces (por ejemplo 3 - 10 veces), con el fin de minimizar cualquier reacción positiva o negativa que se pueda producir, cuando se lleva a cabo un procedimiento de detección.

La disposición se puede realizar de cualquier sustrato convencional a, por ejemplo vidrio, silicio, óxido de silicio, metales y óxidos de metal o bien sencillos o funcionalizados con polímeros funcionales tales como glicidoxipropiltrietoxisilano, poli-1-lisina, aminopropilsilano, carboxisilano, hidrogeles y cepillos de polímero, monocapas auto ensambladas de por ejemplo alquil tioles funcionalizados.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable utilizar sustratos recubiertos de oro. Fluorescencia de las células, especialmente glóbulos rojos se pueden incrementar en los sustratos recubiertos de oro en comparación con los sustratos no recubiertos de oro. Sin querer estar unido a ninguna teoría, esto se puede explicar en términos de las propiedades ópticas especiales que las películas de oro muestran. Dentro de 7 nm de la superficie de oro, la transferencia de energía no radiactiva se producirá entre el fluoróforo excitado y la superficie y esta propiedad se ha usado para el buen efecto en el diseño de "faros moleculares" (Du et al., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 4012 - 4013). Esto dará como resultado una inactivación de la luz emitida y una disminución concomitante en la señal fluorescente asociada a una viruta. Ya que los glóbulos rojos se tienen aproximadamente 6 - 8 μm de diámetro y 1 μm de longitud, 99% del volumen celular está fuera de este área, que significa que la señal no está inactivada. Sin embargo, cuando la fluorescencia de glóbulos rojos virutados sobre los portaobjetos de oro se compara con aquellos sobre los portaobjetos de epoxi silano, la fluorescencia de las células sanguíneas sobre los portaobjetos de oro es mayor. Esto se puede explicar en términos de otra calidad óptica de película de metal noble, la capacidad para formar un campo evanescente en la superficie. La onda evanescente es una onda luminosa no propagante que se extiende desde la superficie durante cientos de nanómetros. El posicionamiento de un fluoróforo en este campo potenciará la intensidad de luz emitida de él. Mientras que la potencia la onda evanescente dependerá del ángulo de incidencia en el que el láser golpea la superficie de oro, es probable que incluso se use alguna potenciación incluso cuando se usa un escáner no optimizado como se ha mostrado usando portaobjetos impresos con un patrón de injerto (Neuschafer, D., Budach, W., Wanke, C., Chibout, S.-D., Biosens. Bioelectronics 2003, 18, 489-497). La fluorescencia potenciada provocada por la excitación de glóbulos rojos por una onda luminosa confinada en la superficie que provoca que la señal de las virutas de sangre sobre oro emitan una mayor intensidad de luz que sobre las películas recubiertas epoxi-silano. Ésta es una ventaja significativa del uso de oro como una superficie de microdisposición. Del mismo modo sin estar unido a ninguna teoría, los inventores consideran que ya que la diferencia entre la inactivación de la fluorescencia y potenciación evanescente de la señal provocada por una dependencia de la distancia, el oro es una superficie preferida para trabajar con una variedad de ensayos. El oro se puede funcionalizar fácilmente usando técnicas bien establecidas para la formación de monocapas autoensambladas (Datwani, S.S., Vijayendran, R.A., Johnson, E., Biondi, S.A., Langmuir 2004, 20, 4970 - 4976), que significa que la distancia entre un fluoróforo y la superficie de oro se puede sintonizar mediante, por ejemplo, la longitud de la cadena alquilo (Imahori, H. Norieda, H., Nishimura, Y., Yamazaki, I., Higuchi, J., Kato, N., Motohiro, T., Yamada, H., Tamaki, K., Arimura, M., Sakata, Y., J. Phys. Chem. B. 2000, 104, 1253 - 1260) y la química de la superficie se puede controlar fácilmente por la elección del grupo final. Este planteamiento significa que los anticuerpos usados en un ensayo se pueden posicionar de manera que los glóbulos rojos se unan dentro del campo evanescente sin ser inactivados. Para tener una ventaja total de este procedimiento la rugosidad de la superficie del oro puede necesitar que se optimice ya que esto mejorará la potenciación y la configuración del explorador de microdisposición se pueda igualar al ángulo de resonancia del plasmón.

La disposición puede estar en cualquier forma que se pueda leer, incluyendo plana y esferoide. Los sustratos preferidos son cualquier soporte rígido o semi-rígido adecuado incluyendo membranas, filtro, escamas, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, polímeros, micropartículas y capilares. El sustrato puede tener una diversidad de formas superficiales, tales como pocillos, líneas, alfileres, canales y poros, a los que están unidos los anticuerpos. La arquitectura de la superficie de sustrato preferida para mejorar la detección fluorescente se desvela en los documentos W002/059583 y W003/023377. En ciertas realizaciones, los sustratos son preferiblemente ópticamente transparentes.

Hablando en términos generales "escamas de anticuerpo" de la presente divulgación pueden comprender pequeños sustratos planos, tales como 50 - 100 mm, por ejemplo 76 mm x 15 - 50 mm, por ejemplo 26 mm, con tamaño de viruta entre 50 y 1000 μm , y hasta 10000 virutas de anticuerpos por portaobjetos. De manera conveniente cada anticuerpo se puede manchar, imprimir o de otra manera unirse al sustrato usando técnicas conocidas, véase por ejemplo Michael J. Heller, Annual Review of Biomedical Engineering, 2002 Vol. 4: 129 - 153. DNA Microdisposición Technology: Devices, Systems and Applications. Angenendt, P.; Glokler, J.; Murpy, D.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Anal.

Biochem., 2002, 309, 252-260 Angendt, P.; Glokler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. Chromatogr. A, 2003 100, 997 - 104. Las virutas típicas son menores que 1 mm de diámetro, tales como menos de 500 µm o 100 µm de diámetro. De esta manera 10s a 1000s de virutas de anticuerpo se pueden proporcionar en una disposición individual, si así se requiere.

5 Los "escamas de anticuerpo" de la presente divulgación también se pueden usar para ensayar más de una muestra. De esta manera, cada escama puede comprender una pluralidad de disposiciones separadas sobre la superficie del sustrato, dispuesta de una manera que permita que muestras separadas se pongan en contacto con cada disposición de de tal forma que las muestras no se mezclen. Por ejemplo, cada disposición puede estar unida por una pared, cresta, dique, zona hidrófoba o similares diseñadas para evitar que las diferentes muestras se pongan en
10 contacto entre sí.

Cualesquiera antígenos presentes en la muestra de sangre se permite que reaccionen específicamente reaccionen con dichos anticuerpos unidos durante un período de tiempo, tal como 10 segundos a varias horas, por ejemplo 1 minuto a 60 minutos. Típicamente, esto se puede llevar a cabo a temperatura ambiente, pero también se puede llevar a cabo a, por ejemplo, 37°C.

15 La eliminación del material no unido se puede lograr mediante, por ejemplo, lavado de la superficie del sustrato con una solución tal como agua o solución salina, mediante soplado o succión de aire a través de la superficie del sustrato, o mediante el uso de centrifugación, o agitando para dispersar el material no unido de la superficie del sustrato. Además, áreas del sustrato fuera de las áreas delimitadas a las que están unidos los anticuerpos pueden ser porosos para las células de la muestra que se están ensayando, de manera que las células que no se ponen en contacto con los anticuerpos pasan a través del sustrato y por lo tanto se pueden eliminar fácilmente.

20 La detección directa se lleva a cabo irradiando la superficie del sustrato y detectando cualquier fluorescencia en las áreas del sustrato al que se ha unido el anticuerpo. De manera sorprendente, los inventores han observado que los glóbulos rojos y otras células eucarióticas, de manera que los macrófagos son fluorescentes cuando se irradian con una luz de longitud de onda más corta que la usada para detección. Por ejemplo los glóbulos rojos se pueden irradiar o excitar con luz de longitud de onda aproximadamente 420 nm, 488 nm, 543 nm o 580 nm y emisión detectada a una longitud de onda más larga como 530 nm si se excita a 488 nm o 570 – 585 nm si se excita a 543nm.

25 De este modo, si cualesquiera glóbulos rojos se unen a un anticuerpo unido a la superficie del sustrato, esto se puede detectar mediante una señal fluorescente. Conociendo la posición de cada anticuerpo específico sobre el sustrato, es posible identificar qué antígenos están presentes sobre la superficie de los glóbulos rojos que se están ensayando y de este modo identificar el grupo sanguíneo de la muestra de sangre que se está ensayando.

30 A diferencia de algunos otros procedimientos descritos en la técnica, los resultados de los presentes procedimientos no se pretende que se detecten visualmente. Las principales razones para esto son que de esta manera se minimiza el error humano y / o permite la detección a niveles en general menos que discernible (o características más pequeñas que discernibles) por el ojo humano. De este modo, cualquier fluorescencia se detecta mediante fotodetectores conocidos en la técnica.

35 Típicamente un espectrofotómetro, exploradores de microdisposición comercialmente disponibles o similares se pueden usar para irradiar las áreas de la disposición a las que están unidos los anticuerpos a una primera longitud de onda y cualquier fluorescencia detectada, como un resultado de las células que están unidas a dichos anticuerpos, a una segunda longitud de onda más larga.

40 Además, usando elementos electrónicos y software apropiados, cualquier dispositivo se puede programar para identificar y localizar anticuerpos específicos sobre la superficie del sustrato y para correlacionar esto con las señales fluorescentes generadas, de manera que se pueda determinar e identificar un grupo sanguíneo particular a ensayar. Adicionalmente, software estadístico se puede incluir de manera que se combine y formulen los resultados de las diversas repeticiones y / o diluciones de los anticuerpos proporcionados sobre el sustrato. De esta manera, las señales fluorescentes obtenidas de una multiplicidad de machas de anticuerpo específicas se pueden factorizar conjuntamente y un resultado estadísticamente significativo mostrado al ensayador.

45 En un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un procedimiento de determinación si un antígeno de la superficie celular particular está presente o no en una muestra de células, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra que comprende las células a ser ensayadas;
- 50 b) poner en contacto dichas células con un sustrato que comprende uno o más anticuerpos unidos a él, en el que dichos anticuerpos son capaces de unirse específicamente a antígenos celulares específicos tales como antígenos de la superficie celular que pueden estar presentes en las células;
- c) permitir que cualesquiera antígenos celulares presentes en la muestra reaccionen de manera específica dichos

anticuerpos unidos;

d) eliminar de manera sustancial cualesquiera células y / o otro material no unido de al menos un área del sustrato a la que dichos anticuerpos están unidos; y

5 e) detectar directamente cualesquiera células unidas a dichos anticuerpos, con el fin de determinar si o no dicho antígeno de la superficie celular está presente en las células.

10 Las células adecuadas pueden incluir monocito/macrófagos, células B, células T, células dendríticas, células NK, células del tronco y microbios tales como bacterias, hongos y parásitos. Antígenos a detectar pueden incluir proteínas que se pueden expresar sobre las células que muestran proliferación anormal y / o agregación, como se puede observar, por ejemplo, en cáncer, inflamación o inmunopatologías aberrantes. De este modo, los procedimientos de la presente divulgación se puede usar el diagnóstico de cáncer, afecciones inflamatorias e inmunopatologías y / o para controlar la progresión de la enfermedad o tratamiento.

La presente invención se describirá ahora, a modo de ejemplo y con referencia a las figuras, que muestran:

Figura 1 muestra perfiles de reactividad de eritrocitos marcados fluorescentemente con una microdisposición de anticuerpos a) células del grupo A; b) células del grupo B; e) células del grupo O;

15 Figura 2 muestra una comparación de muestras de sangre para uso en una disposición a base de experimento de tipificación: a) Tipo A, b) Tipo B, c) Tipo O;

Figura 3 muestra el espectro de absorbancia de los glóbulos rojos;

Figura 4 muestra una comparación de protocolos de exploración de microdisposición de tipificación de de sangre sin marcar (véase la tabla 2), a) 488/1, b) 543/1, c) 543/2, d) 543/3, e) 488/1;

20 Figura 5 muestra una Curva de Sensibilidad de Características de Operador Receptor (ROC) contra (1-especificidad), el ejemplo mostrado es de las Puntuaciones de Índice de las muestras de sangre de tipo A (positivos verdaderos) contra las muestras de sangre de tipo B (Positivos falsos); y

Figura 6 muestra una Evaluación de un procedimiento de microprocesador de una proteína para tipificación de la sangre entera.

25 **Divulgación Detallada**

Ejemplo 1: Preparación de disposiciones

Portaobjetos recubiertos de Epoxi silano se prepararon usando portaobjetos de microscopio de vidrio convencionales de Erie Scientific. Los portaobjetos se limpian en una solución de etanol caústica que comprende:

Hidróxido de sodio 105 g

30 Agua 420 ml

Etanol 630 ml

35 durante 2 horas con agitación. Los portaobjetos se enjuagan dos veces con agua desionizada y se centrifugan hasta sequedad en una centrífuga Eppendorf 581OR a 1000 rpm durante un minuto. Los portaobjetos se colocaron después en solución de glicidoxipropiltrióxido silano (1% v/v en 95:5 etanol/agua) durante una hora con agitación continua. Después de enjuagar dos veces con etanol los portaobjetos se calientan en un horno a 383 K durante 15 minutos. Después de enfriar, los portaobjetos se mantienen en un ambiente desecado. Cuando se usan, otros tipos de portaobjetos se obtuvieron de fuentes comerciales. Los portaobjetos de oro de Erie Scientific o Ssens BV, portaobjetos de Hidrogel de Schott o Full Moon.

40 Los anticuerpos se depositaron en estos portaobjetos usando alfileres sólidos de o bien 700 ó 200 μm sobre un observador Microgrid II de Biorobotics. La temperatura para imprimir era 291 ± 1 K y >30 % de humedad. Cada anticuerpo estaba presente como cuatro réplicas.

Después de imprimir, las disposiciones se almacenaron en una caja de portaobjetos y se selló bajo nitrógeno. Mientras no está en uso, las disposiciones se almacenaron a 278 K.

45 Todos los anticuerpos se derivan de líneas celulares de hibridoma monoclonales. Las v se prepararon en casa de acuerdo con protocolos convencionales. Las líneas celulares establecidas se almacenaron en alícuotas congeladas en nitrógeno líquido. Cuando se requiere, las alícuotas se descongelan de manera aséptica en medio DMEM/F12 que contiene Suero de ternera fetal. Las células se doblan aproximadamente cada 24 horas y el cultivo se expande usando

5 el medio hasta que se alcanza el volumen deseado. Durante este tiempo se mantienen las condiciones las óptimas para cada línea celular (O_2 , CO_2 , pH, temperatura). Una vez que se ha alcanzado el volumen deseado las células se mantienen en las condiciones óptimas hasta que la viabilidad celular está por debajo de 30%. El anticuerpo se recoge después mediante filtración de flujo tangencial para librar el cultivo de los desechos celulares. El material recogido se concentró de manera rutinaria hasta 1/5 del volumen mediante filtración de flujo tangencial. Desde la descongelación hasta la recogida del material (aprox. 100 l desarrollados en fermentador) la escala temporal está sobre un promedio de 4 semanas. Los anticuerpos ensayados se purificaron o bien mediante filtración en gel o mediante un procedimiento de captura por afinidad. Para ensayar tanto la especificidad como la potencia del anticuerpo, se usan técnicas de hemoaglutinación sexológicas convencionales. Esto implica la adición de una suspensión de eritrocitos al anticuerpo y observando la aglutinación visible (hemoaglutinación). La presencia o ausencia de hemoaglutinación se usa para determinar especificidad. Para practicar la potencia se usan los mismos principios pero en este caso el anticuerpo se somete a soluciones de duplicación y después se ensayan con eritrocitos. Los puntos finales de la potencia se usan para describir la potencia.

15 Los anticuerpos se eligen en la base de especificidad establecida como se muestra en la tabla más adelante. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía y sus propiedades de aglutinación en fase de solución y reactividades de microdisposición correlacionadas (Tabla 1).

Los anticuerpos se imprimieron típicamente en cuatro diferentes diluciones por escama.

Tabla 1. Anticuerpos usados para microdisposiciones de impresión.

Referencia de anticuerpo	Especificidad	SDS PAGE	Potencia después de columna	Microdisposición S/N
LA1	Anti-A	Distintivas bandas pesadas y ligeras (muy pocas impurezas)	Buena 1/256	3,5 clara
LA2,	Anti-A	Distintivas bandas pesadas y ligeras	Muy buena, 1/4 K	301 a 1:8 dil
ES9,	Anti-A	Bandas pesadas y ligeras no obvias	Ok, 1/32	258 clara
DAM1,	Anti-A	Bandas pesadas y ligeras no obvias	Buena 1/512	215 clara
LB2,	Anti-B	Distintivas bandas pesadas y ligeras	Muy buena, 1/4 K	96 clara
ES15,	Anti-A(B)	Distintivas bandas pesadas y ligeras	Muy buena, 1/4 K	301 clara
LB3	Anti-B	Bandas pesadas y ligeras no obvias	Pobre	1,5

20 Ejemplo 2: Experimentos de Microdisposición

Antes de uso, las disposiciones se bloquearon en Albúmina Sérica Bovina (BSA); esto se considera en general que reduce la unión no específica a la superficie de la disposición.

25 Para bloquear, los portaobjetos se enjuagan brevemente en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) pH 7,0 que contiene 1 % de Albúmina Sérica Bovina (BSA) y 0,1% de Tween 20 mediante inmersión vigorosa 10 veces. Después se colocaron en un recipiente reciente de PBS pH 7,0 que contiene 1 % de BSA durante una hora a temperatura ambiente, con mezcla constante.

Los portaobjetos se enjuagaron brevemente en PBS pH 7,0 (se sumergieron 10 veces) y se centrifugaron

hasta sequedad en una centrífuga Eppendorf 5810R a 1000 rpm durante un minuto.

Las muestras de sangre se incubaron en la disposición usando cámaras de hibridación de Schleicher y Schuell (capacidad aproximada: 450 µl). Las muestras de sangre se incubaron en las disposiciones durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Después de incubación, las cámaras de hibridación se retiran y los portaobjetos se lavan en una mezcla de PBS y Tween 20 (1%) mediante su inmersión vigorosa diez veces. Después los portaobjetos se enjuagaron dos veces en agua desionizada y se centrifugaron hasta sequedad con una centrífuga Eppendorf 5810R a 1000 rpm durante un minuto.

La exploración se llevó a cabo usando un explorador de microdisposición confocal Scanarray 5000 de Packard Biochip Technologies. Para cada disposición, se tomaron cinco exploraciones usando una posición de pmt consistente e incrementando de manera creciente la posición de potencia de láser. Las disposiciones se analizaron usando el Quantarray. De las cinco exploraciones de cada portaobjetos, el barrido óptimo en términos de intervalo lineal se seleccionó en la base de análisis gráfico de dispersión comparativo.

Una señal para la relación de ruido (S/N) se calculó para cada mancha de anticuerpo. Los niveles de ruido se determinaron para cada portaobjetos tomando la intensidad fluorescente promedio más dos desviaciones estándar de las manchas de PBS (controles negativos ya que ninguna célula se debe unir específicamente). La señal de relación de ruido se calculó después mediante la división de la intensidad de fluorescencia para cada mancha por el ruido. Para cada grupo de manchas replicadas, se obtuvo un valor medio.

Resultados

Los experimentos de microdisposición que usan una disposición de anticuerpos unidos a una superficie de epoxi-silano han mostrado que la tipificación de la sangre multiplexada puede diferenciarse entre grupos sanguíneos comunes A, B y O. Figura 1(a-c) muestra cómo el patrón de reactividad de anticuerpo expresado como una a la relación de ruido difiere de cada uno de los grupos sanguíneos cuando se usan purificados, los glóbulos rojos marcados (observar la diferencia en escala).

Usando las células purificadas y marcadas al tipo de sangre sobre una microdisposición requiere varias etapas de preparación y derivatización de muestras. Con el fin de simplificar este procedimiento, los presentes inventores intentaron tipificar la sangre entera y de este modo disponer de algunas etapas de pretratamiento de sangre. Los presentes inventores intentaron marcar la sangre entera usando isotiocianato de fluoresceína (FITC) y después se incubó esto sobre una disposición con la espera que los glóbulos rojos marcados de manera fluorescente serían cuantificables si se han unido a manchas de anticuerpo. Aunque los glóbulos rojos estaban claramente unidos a las manchas y eran visibles visualmente, cuando se exploran usando un establecimiento de FITC de la fluorescencia del fondo entre las manchas era tan fuerte que superaban la señal específica de de las manchas.

Probablemente esto se puede explicar considerando la preparación de proteoma de sangre. Aproximadamente 40% del proteoma de suero humano es Albúmina Sérica Humana y esto se marcará de manera fluorescente al mismo tiempo que los glóbulos rojos ya que FITC no marca específicamente todas las proteínas. HSA se sabe que se une de manera no específica a una cantidad de proteínas y en tan altas concentraciones altas que una interacción relativamente débil puede ser responsable del alto fondo de las manchas de anticuerpo. Con el fin de superar este problema en la tipificación de la sangre entera, los presentes inventores buscaron si la señal fluorescente provocada por la señal fluorescente de los glóbulos rojos es suficiente para cuantificar la reacción de unión.

Figura 2 es un gráfico que muestra la reactividad de cualquier disposición de anticuerpos con glóbulos rojos marcados, sangre entera, sangre entera diluida 1:5 con PBS y sangre entera diluida 1:10 con PBS. Se puede observar a partir de este gráfico que el patrón de reactividad es el mismo que para las células marcadas que para la sangre entera pero que la intensidad de señal varía con el tratamiento. También se puede observar que en todos los casos, la señal para las relaciones de ruidos son más altas suficientes para permitir la discriminación entre el tipo de sangre A, B y O. Para las células de tipo A, sangre diluida 1:5 parece que tiene la más alta relación de S/N pero para B la sangre entera clara tiene la mayor S/N.

Ejemplo 3: Optimización de condiciones de exploración

Los glóbulos rojos tienen un espectro de absorbancia como se muestra en la Figura 3.

Este espectro de absorbancia es típicamente de oxi-hemoglobina, como se esperaría con los glóbulos rojos nativos. Ya que los presentes inventores originalmente creen que las especies de hemoglobina serían responsables de la fluorescencia de eritrocitos, intentaron maximizar la señal fluorescente mediante sintonización de la longitud de onda de excitación al espectro de absorbancia mostrado en la Figura 3. En sus experimentos iniciales, que usan células marcadas con fluoresceína, usan establecimientos de para fluoresceína (excitación 488 nm, emisión 530 nm). Ya que los glóbulos rojos absorben fuertemente a 20, 540 y 580 nm, se esperará que una de estas longitudes de onda proporcionen la mayor fluorescencia cuando se excitan. El máximo a 420 nm tiene la mayor absorbancia pero ya que las

exploraciones de microdisposición comercial no tienen láser que pueden excitarse a esta longitud de onda, la excitación menor disponible era 488 nm. Los presentes inventores compararon la señal a la relación de ruido para este establecimiento con tres establecimientos que se excitan a 543 nm (cerca del máximo de absorbancia) como se detalla en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Longitudes de onda usadas para comparación de establecimientos de exploraciones

	Longitud de onda de Excitación	Longitud de onda de detección
Caso 488/1	488	530
Caso 543 /1	543	570
Caso 543/2	543	578
Caso 543/3	543	585

La señal para las relaciones de ruido obtenidas usando estos establecimientos se muestran en la Figura 4. Después de la exploración, la exploración 488/1 se repitió para asegurar que el blanqueamiento deletéreo de fluorescencia se puede controlar

10 Se puede observar que aunque existe una poca variabilidad entre S/N de las exploraciones 488 mn, son ambas mayores que los establecimientos que usan excitación a 543 nm. La razón de esto puede ser que la mayor energía (baja longitud de onda) excita más autofluorescencia de la pared celular y otros componentes así como hemoglobina y de este modo proporciona una señal global mayor. Sin embargo, ya que los componentes celulares son específicos para las células y no el área de fondo entre las manchas, la mejor señal para divulgar se observa usando procedimientos de exploración de excitación a 488 nm.

15 **Ejemplo 4: Evaluación adicional de un procedimiento de microprocesador de proteína para tipificar la sangre entera**

20 **Resumen del experimento:** Un total de 67 portaobjetos de microdisposición de oro (Ssens BV) se imprimieron con anticuerpos específicos para antígenos de tipo de sangre A (**LA2-SF**, 159 manchas separadas por disposición) y B (**LB2**, 224 manchas separadas por disposición). Un total de 67 muestras de sangre entera (**A** = 26, **B** = 8, **O** = 33) se obtuvieron de donantes y se usaron con el previo consentimiento y se obtuvo la acreditación ética de los donantes. Las muestras de sangre individuales se diluyeron 1/40 en solución salina tamponada con fosfato y se añadieron a las disposiciones durante una hora de incubación a temperatura ambiente con agitación regular a intervalos de 5 minutos.

25 Los portaobjetos se exploraron con un explorador de microdisposición confocal ScanArray 5000 de Packard Biochip Technologies. Para cada disposición se tomaron cinco exploraciones usando un establecimiento consistente PMT e incrementando de manera creciente el establecimiento de la potencia de láser. Las imágenes de microdisposición se analizaron con el software Quantarray usando el procedimiento del círculo fijo y y restando la fluorescencia de fondo del valor de la mancha (Señal de Fondo). De las cinco exploraciones de cada portaobjetos, la exploración óptima en términos de intervalo lineal se seleccionó en la base de análisis de gráfico de dispersión comparativo (Forster, Roy & Ghazal, 2003 Journal of Endocrinology. 178: 195 - 204).

30 Se obtuvo el valor de la señal de fondo para cada señal replicada y la mediana de estos valores para cada sonda se usó para el análisis comparativo. Se obtuvo una puntuación del Índice para cada disposición donde la mediana del valor de la señal de para la sonda de **LA2-SF** se dividió por la mediana para la sonda de **LB2**, proporcionando un valor de relación para las dos respuestas. Curva de Sensibilidad de Características de Operador Receptor (ROC) contra (1-especificidad) se usaron para obtener los valores umbrales (**Véase la Figura 5**).

35 Las curvas ROC mostraron que la relación **LB2/LA2-SF** derivada tiene una buena capacidad para discriminar entre los tipos de sangre A y B. Se prepararon las curvas de ROC adicionales para obtener los umbrales para el tipo de sangre B y para el O contra el A y el O contra los tipos de sangre B y el área bajo cada una de estas curvas ROC se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Área bajo las curvas ROC para cada una de las comparaciones del tipo de sangre

Tipo de sangre	Área bajo la curva ROC
A	0,995
B	0,995
O respecto A	0,986
O respecto B	0,890

Estos valores umbral se usaron después para asignar el tipo de sangre basándose en el valor de la puntuación de índice para cada tipo disposición (Véase la Tabla 4).

5 **Tabla 4 Valores umbral de las puntuaciones de Índice para cada tipo de sangre se obtuvieron siguiendo el análisis de la curva de ROC**

Tipo de sangre	Valor umbral seleccionado de la Puntuación de Índice de la curva ROC	Porcentaje de sensibilidad en el umbral	Porcentaje de especificidad en el umbral
A	$\geq 2,71$	100	96,2
B	$\leq 0,64$	100	87,5
O	0,929 - 2,7	87,5 (a 0,929) 92,3 (a 2,7)	100 (a 0,929) 97 (a 2,7)

10 Basándose en cada uno de los valores umbral de las 67 disposiciones se asignó un tipo de sangre sin conocimiento previo de los orígenes de de la muestra de sangre individual. Se asignó una respuesta de o bien 'Llamada' o 'No Llamada' a cada disposición para cada uno de los tipos posible de sangre basándose en cada uno de los tipos de sangre disponibles. Una muestra correctamente pronosticada era una que recibía una 'Llamada' correcta para solamente el tipo de sangre correcto, mientras que una muestra pronosticada incorrectamente era una que recibía una 'No Llamada' para el tipo de sangre correcto y una 'Llamada' para el tipo de sangre incorrecto (Véase la Tabla 5). Estos

15 datos se presentan de manera gráfica más adelante como una representación del número de muestras de sangre individuales correctamente e incorrectamente pronosticadas para cada tipo de sangre (Véase la Figura 6).

Tabla 5 Número de muestras de sangre correctamente o incorrectamente pronosticadas usando los valores umbral de las puntuaciones de índice para cada tipo de sangre. NB – Todas las muestras recibían una 'Llamada' para un tipo de sangre particular.

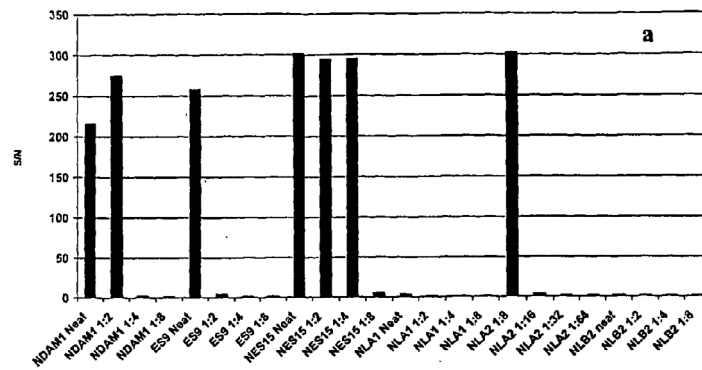
Clasificación	A	B	O	Total
Muestras totales	26	8	33	67
Correctamente pronosticadas	25	7	32	64
incorrectamente pronosticadas	1	1	1	3
Porcentaje de muestras correctamente pronosticadas	96,2	87,5	96,9	95,5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar un grupo sanguíneo de una muestra de sangre, que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una muestra de sangre, que comprende glóbulos rojos a un dispositivo que comprende un sustrato que comprende uno o más agentes de unión unidos a él, en el que dichos agentes de unión son capaces de unirse de manera específica a antígenos del grupo de los glóbulos rojos específicos que pueden estar presentes en la muestra de sangre;
 - b) permitir que cualesquiera antígenos de glóbulos rojos presentes en la muestra de sangre reaccionar de manera específica con dichos agentes de unión unidos;
 - c) sustancialmente eliminar o reducir cualquier material no unido de al menos un área del sustrato al que dichos agentes de unión están unidos; y
 - d) detectar directamente cualesquiera antígenos unidos a dichos agentes de unión con el fin de determinar un grupo sanguíneo de sujetos; llevándose a cabo la detección mediante exposición de los glóbulos rojos unidos a una primera longitud de onda y detectar la fluorescencia intrínseca de los glóbulos rojos unidos a una segunda longitud de onda más larga.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el antígeno del grupo sanguíneo a determinar es de los sistemas ABO y / o D (Rhesus).
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en el que el antígeno de sangre a determinar es del antígeno del grupo sanguíneo Kell, Dutty, Lewis, Kidd y cualquier otro detectable usando sistemas de reactivos específicos apropiados.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el agente de unión es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para dicho (s) antígeno (s) a detectar.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que comprende además el uso de un control positivo para asegurar que los antígenos de los glóbulos rojos son capaces de unirse a dicho agente de unión.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dichos agentes de unión están unidos al sustrato en la forma de una disposición.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que cada agente de unión específica se proporciona en un número de diluciones y / o número de veces repetido, con el fin de minimizar cualesquiera reacciones falsas positivas o negativas que se puedan producir, cuando se lleva a cabo el procedimiento de detección.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el sustrato está hecho de vidrio, silicio, óxido de silicio, metales y óxidos de metal, bien sencillos o funcionalizados con polímeros funcionales tales como glicidoxipropiltrietoxisilano, poli-1-lisina, aminopropilsilano, carboxisilano, hidrogeles y cepillos de polímero, monocapas auto ensambladas de por ejemplo alquil tioles funcionalizados.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el sustrato es un sustrato recubierto de oro.
10. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 9 en el que el oro está funcionalizado de manera que los agentes de unión son capaces de estar unidos a él.
11. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 10 en el que la funcionalización es tal que una distancia entre la superficie de oro y cualesquiera glóbulos rojos se pueden controlar.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 - 11 en el que la disposición se forma sobre un sustrato plano o esferoide.
13. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el sustrato es un soporte rígido o semi-rígido que incluye membranas, filtro, escamas, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, polímeros, micropartículas y capilares.
14. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 13 en el que el sustrato incluye una arquitectura de superficie modificada.
15. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que dichos agentes de unión se manchan, imprimen o unidos de otra manera al sustrato.

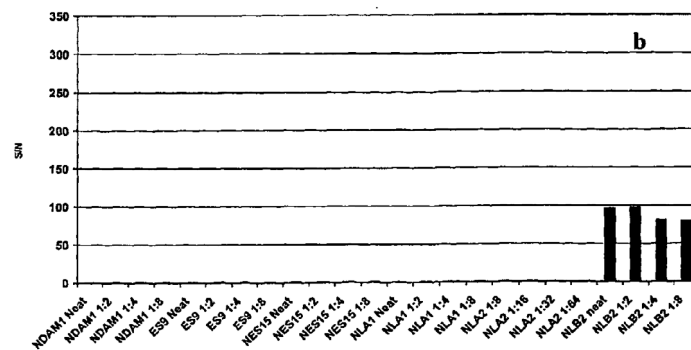
16. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el sustrato comprende una pluralidad de disposiciones separadas sobre la superficie del sustrato, dispuesta de una manera que permita separar las muestras a poner en contacto con cada disposición, de tal forma que las muestras no se mezclen y con el fin de que más de una muestra se pueda ensayar.
- 5 17. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el material no unido se retira mediante lavado de la superficie del sustrato con una solución tal como agua salina, mediante soplado o succión de aire a través de la superficie del sustrato, o mediante el uso de centrifugación, o agitando para dispersar el material no unido de la superficie del sustrato.
- 10 18. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que los glóbulos rojos se irradian o excitan con luz con una longitud de onda de aproximadamente 420 nm, 488 nm, 543 nm o 580 nm y emisión detectada a una longitud de onda más larga.
19. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 18 en el que los glóbulos rojos se irradian o excitan a 488 nm y detección se lleva a cabo a 530 nm, o se irradian o excitan a 543 nm y detección llevada a cabo a 570 - 585 nm.
- 15 20. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 en el que cualquier fluorescencia se detecta por un foto-detector.
21. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el software estadístico se utiliza de manera que se combine y formule a partir de los resultados de diversas repeticiones y / o diluciones antes de mostrar/proporcionar un resultado al ensayador

FIGURA 1
Células del grupo A1 - marcadas



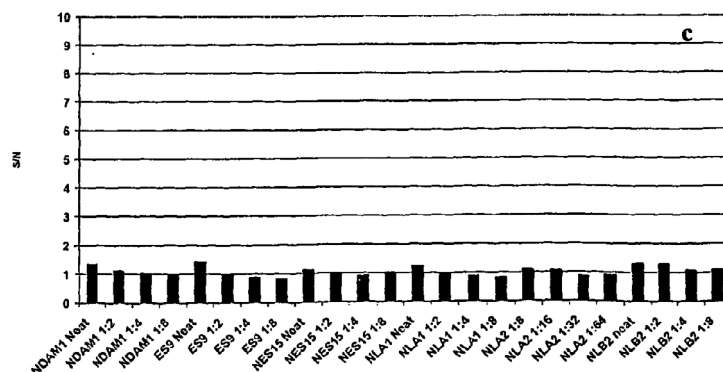
Anticuerpo

Células del tipo B - marcadas



Anticuerpo

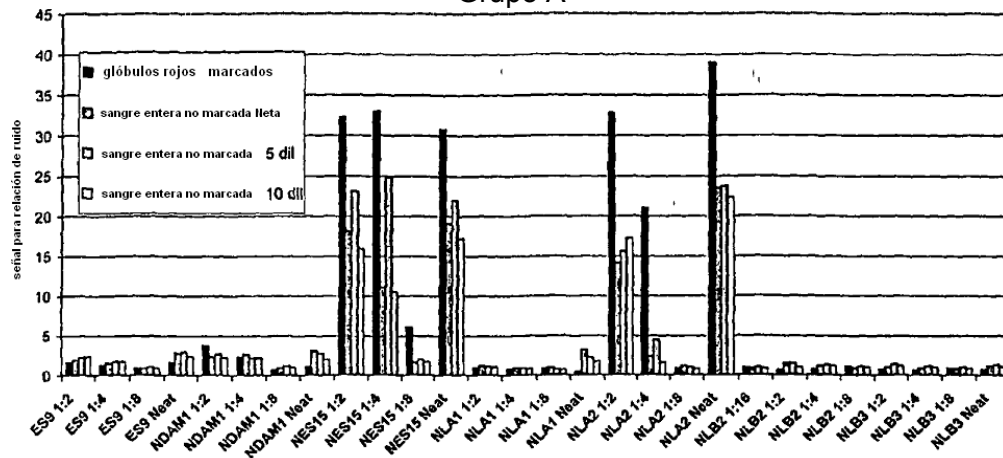
Células del grupo O – marcadas



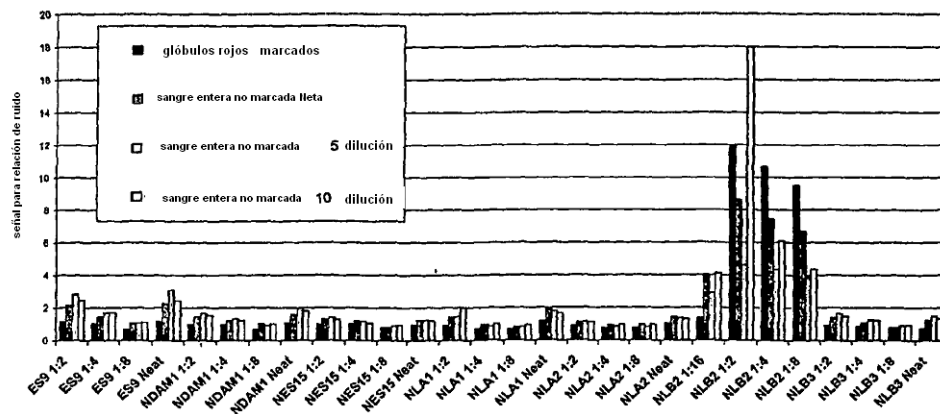
Anticuerpo

FIGURA 2

Grupo A



Grupo B



Grupo O

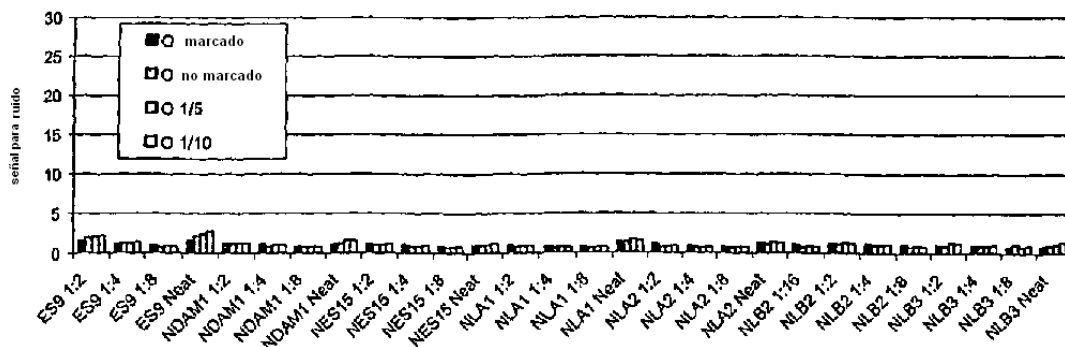


FIGURA 3

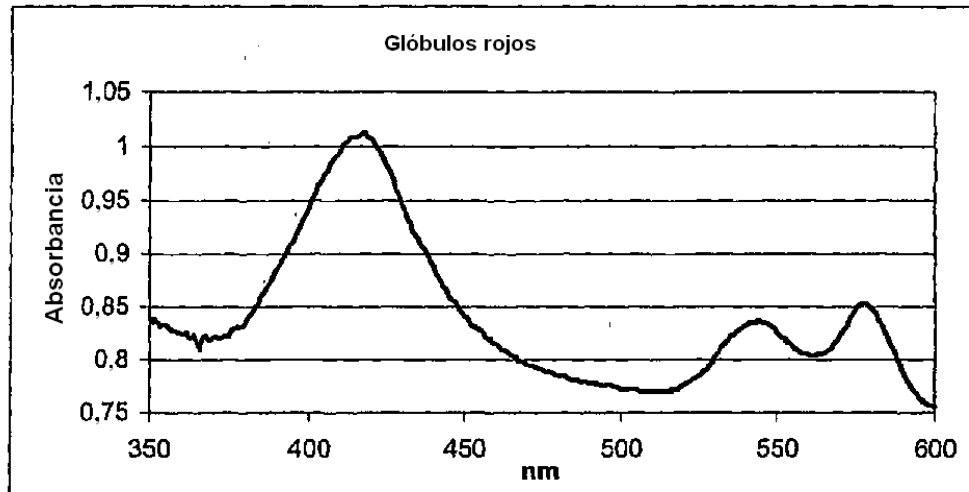
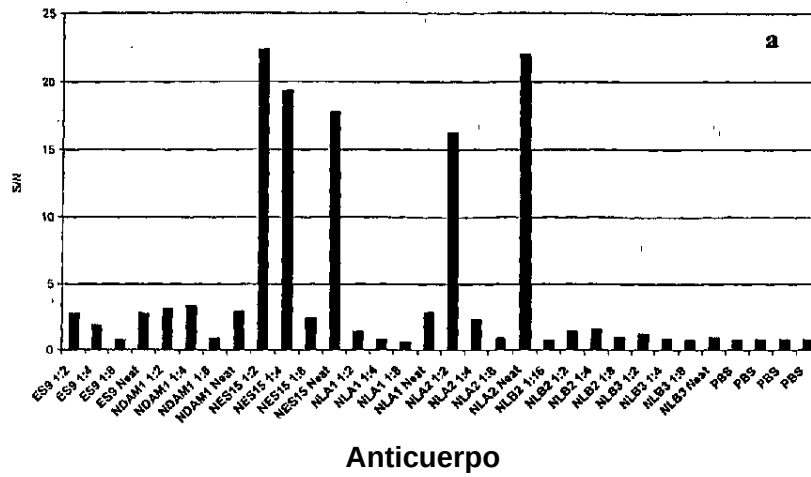
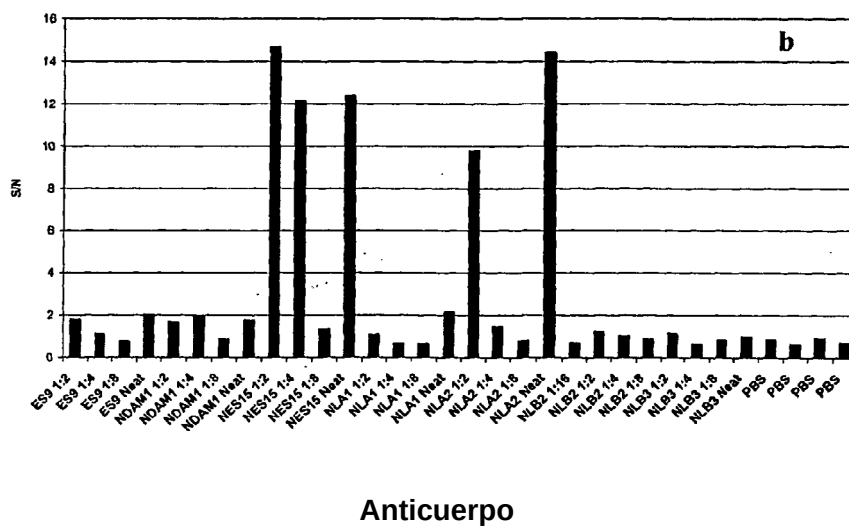


FIGURA 4

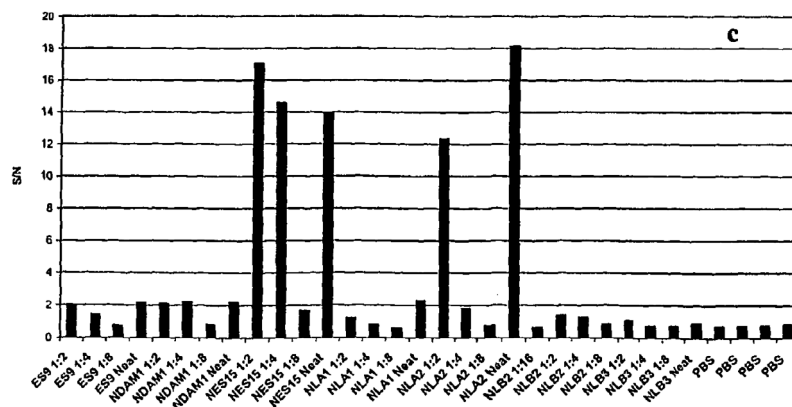
488/1



543/1

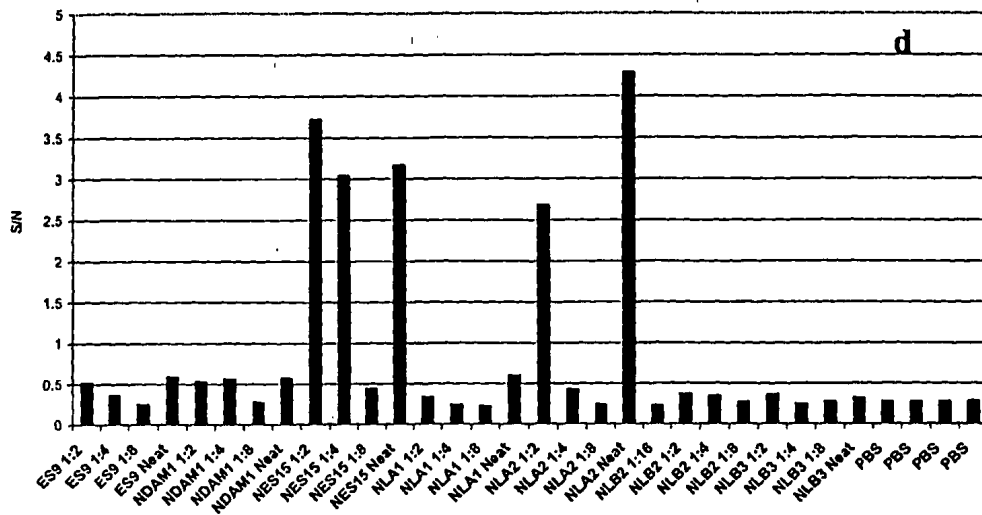


543/2



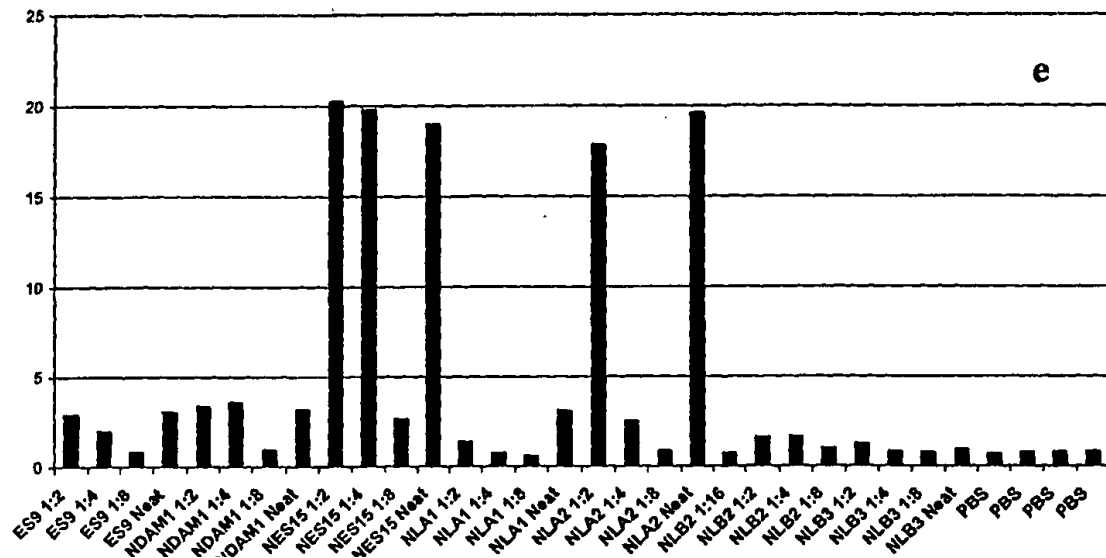
Anticuerpo

543/3



Anticuerpo

488/1 repetición



Anticuerpo

FIGURA 5

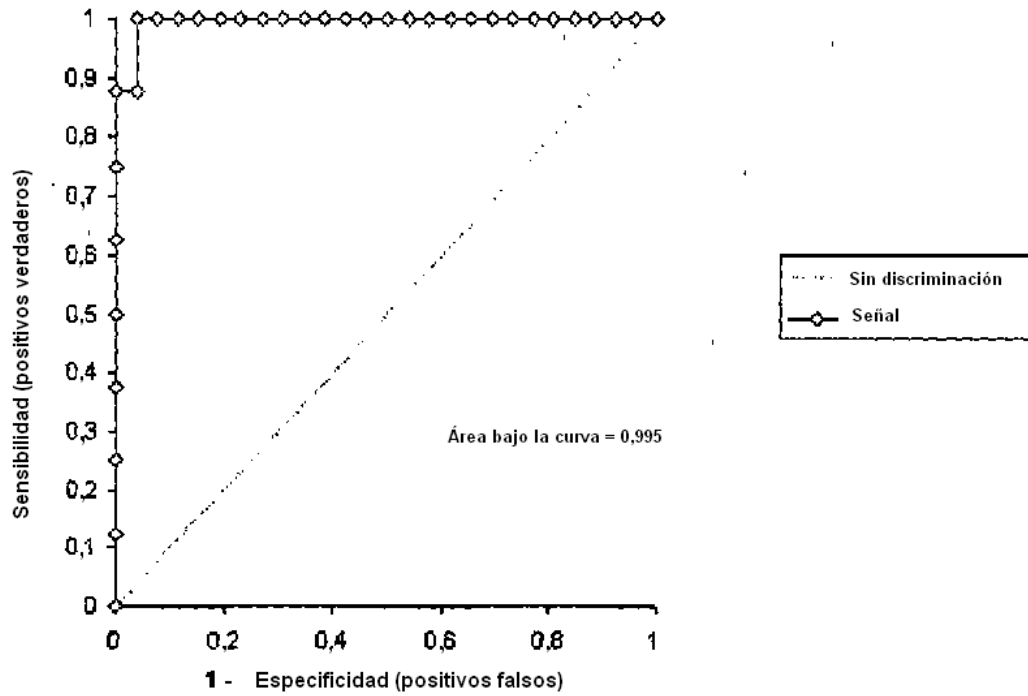


FIGURA 6

