



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 430**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05768273 .4**
96 Fecha de presentación : **20.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1789789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para optimizar la unión al sustrato del analito y el anticuerpo por adsorción de energía mínima.**

30 Prioridad: **20.07.2004 CA 2475456**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2011

73 Titular/es: **SQI DIAGNOSTICS SYSTEMS Inc.**
36 Meteor Drive
Toronto, ON M9W 1A4, CA

72 Inventor/es: **Lea, Peter;**
Ewart, Thomas, G.;
Carmichael, Stuart, X. y
Ricks, Claude

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 358 430 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

Procedimiento y dispositivo para optimizar la unión al sustrato del analito y el anticuerpo por adsorción de energía mínima

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a procedimientos para optimizar y para preparar un dispositivo de ensayo para llevar a cabo un ensayo para detectar una concentración de analito en una muestra.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los procedimientos de análisis de ensayos para inmunodiagnóstico incorporan técnicas para medir errores que resultan de la técnica de ensayo defectuosa cuando los ensayos se han completado. Por ejemplo, la medición de la sensibilidad del ensayo caracteriza la sensibilidad por análisis estadístico clásico basado en mediciones repetidas de muestras de concentración baja para confirmar que el resultado de la muestra no es estadísticamente diferente de cero. Puesto que el error típico que se obtiene es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de mediciones reales, este procedimiento no mide la sensibilidad inherente del ensayo.

15

[0003] Como se conoce en la técnica, la sensibilidad analítica es la concentración mínima o cambio detectable, en la que el patrón cero se mide varias veces y el límite de la sensibilidad se convierte en una concentración igual a 2-3 DT (desviación típica) de la M (la Media). Sin embargo, la precisión, que se conoce en la técnica como la proximidad de las mediciones de un analito en múltiples partes alícuotas de un volumen único y homogéneo de matriz, puede ser incorrecta en un orden de magnitud. El ajuste simultáneo de cualquier curva de calibración obtenida no crea una curva de valores de dosis-respuesta verdaderos. Esto da como resultado considerables errores en la sensibilidad real de un ensayo.

20

[0004] Para medir la exactitud, conocida en la técnica como la proximidad de la media de los resultados de ensayo obtenidos por el procedimiento para la concentración verdadera de analito, la exactitud se usa para definir cuánto se aproxima el valor medido medio al valor verdadero. La diferencia de la medición se conoce como el sesgo o el grado de exactitud. El sesgo puede estar muy por encima del rango del ensayo. En la técnica se sabe que es necesario desarrollar procedimientos para medir este valor verdadero.

25

[0005] La repetibilidad o precisión de un ensayo, definido como la proximidad de las mediciones individuales de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidamente a múltiples partes alícuotas de un volumen único y homogéneo de matriz o el error calculado en un ensayo analítico, se conoce en la técnica como el porcentaje del coeficiente de variación (% CV). Las máquinas de análisis de ensayo automático pueden estar afectadas por variaciones en la concentración de muestra, temperatura, calor y efectos de borde, suspensión de partículas incompleta y precipitación de fase sólida. Los efectos de la precisión también son resultado de la separación de fracciones y errores de recuento. En los sistemas ópticos el error se debe a efectos de turbidez, presencia de fluoróforos, deterioro de las lámparas y detectores y deterioro a lo largo del tiempo de los reactivos. Estos factores en general conducen a disminuciones significativas de la relación de señal a ruido. Los errores de manipulación mecánica son resultado del mal pipeteo y los periodos de parada del instrumento.

30

[0006] Por lo tanto, la evaluación de la precisión de cualquier procedimiento analítico requiere la medición de la variabilidad a concentraciones conocidas y relevantes, usando disoluciones de control normalizadas o definidas para crear patrones de calibración de los valores iniciales. La determinación exacta de dichos calibradores se basa en la medición de concentraciones conocidas en series de dilución a intervalos predeterminados, las cuales después se interpolan. Están disponibles en el comercio disoluciones de referencia o patrones de referencia o bien se pueden preparar en el laboratorio, pero a menudo están calibrados con matrices normalizados, externos o combinados, los cuales pueden variar considerablemente de las muestras de ensayo del paciente real. Parte de la solución para superar estos errores es representar gráficamente la precisión frente a un amplio intervalo de concentraciones para obtener un perfil de precisión, o la calibración cuantitativa del ensayo.

35

[0007] También se ha mostrado que la reactividad cruzada, especificidad del ensayo, interferencias que producen sesgo, alteraciones en el antígeno, anticuerpo, sitios de unión, efectos gancho de dosis bajas (ensayo competitivo) y dosis altas (ensayo de tipo sándwich), interferencia de anticuerpos heterófilos, autoanticuerpos endógenos interferentes, complemento, factor reumatoide, interferencia en la unión de anticuerpos a la fase sólida, sustancias endógenas generadoras de señales, inhibidores enzimáticos, catalizadores y cofactores, expresan una actividad que

[0007] También se ha mostrado que la reactividad cruzada, especificidad del ensayo, interferencias que producen sesgo, alteraciones en el antígeno, anticuerpo, sitios de unión, efectos gancho de dosis bajas (ensayo competitivo) y dosis altas (ensayo de tipo sándwich), interferencia de anticuerpos heterófilos, autoanticuerpos endógenos interferentes, complemento, factor reumatoide, interferencia en la unión de anticuerpos a la fase sólida, sustancias endógenas generadoras de señales, inhibidores enzimáticos, catalizadores y cofactores, expresan una actividad que

45

[0007] También se ha mostrado que la reactividad cruzada, especificidad del ensayo, interferencias que producen sesgo, alteraciones en el antígeno, anticuerpo, sitios de unión, efectos gancho de dosis bajas (ensayo competitivo) y dosis altas (ensayo de tipo sándwich), interferencia de anticuerpos heterófilos, autoanticuerpos endógenos interferentes, complemento, factor reumatoide, interferencia en la unión de anticuerpos a la fase sólida, sustancias endógenas generadoras de señales, inhibidores enzimáticos, catalizadores y cofactores, expresan una actividad que

50

[0007] También se ha mostrado que la reactividad cruzada, especificidad del ensayo, interferencias que producen sesgo, alteraciones en el antígeno, anticuerpo, sitios de unión, efectos gancho de dosis bajas (ensayo competitivo) y dosis altas (ensayo de tipo sándwich), interferencia de anticuerpos heterófilos, autoanticuerpos endógenos interferentes, complemento, factor reumatoide, interferencia en la unión de anticuerpos a la fase sólida, sustancias endógenas generadoras de señales, inhibidores enzimáticos, catalizadores y cofactores, expresan una actividad que

55

induce a confusión en los ensayos, incluyendo reactividad cruzada, efectos matriz y arrastre de la muestra en los instrumentos y muestreadores de inmunoensayo automáticos.

5 **[0008]** Para aplicaciones clínicas, las muestras de control de calidad pueden no reflejar las concentraciones reales en el paciente, pueden no reflejar el espectro de analitos presente e interferir con la matriz de muestras y no seguir reflejando el contenido de las muestras del paciente. Las muestras de control de calidad pueden medir el rendimiento en intervalos de concentración discrepantes que pueden no reflejar puntos de decisión clínicos.

10 **[0009]** Los autores de la invención han desarrollado ensayos de micromatrices que proporcionan la detección rápida de la presencia de analitos en una muestra. Estas se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 10/856.785 publicada como US2005/0266398 A1 y titulada "Method and Device for Rapid Detection and Quantitation of Macro and Micro Matrices". Los ensayos permiten las mediciones cuantitativas y cualitativas rápidas de la concentración de analito en una muestra. El analito se marca con un primer anticuerpo que se conjuga con un marcador detectable. Un dispositivo de ensayo típico define una cámara entre la parte de carga y la parte de lectura de modo que una parte líquida de la muestra se mueve de la parte de carga a la parte de lectura por acción capilar. En la parte de lectura están impresas las matrices de puntos de ensayo inmovilizadas sitioespecíficas. Las manchas de ensayo incluyen un segundo anticuerpo que se une a la superficie del dispositivo de ensayo y que está adaptado para unirse y marcar el analito. El dispositivo de ensayo también tiene matrices de puntos de calibración inmovilizadas sitioespecíficas que contienen cantidades predeterminadas de analito unido para la reacción con cantidades en exceso del primer anticuerpo marcado con el marcador detectable. Una vez que el analito conjugado se une a los puntos de ensayo, la medición del analito en los puntos de ensayo se puede determinar por comparación de la intensidad del marcador de los puntos de ensayo con la intensidad del marcador de los puntos de calibración y leer la concentración de analito de las curvas de calibración adecuadas.

25 **[0010]** En general, los inmunoensayos dependen implícitamente de la detección directa y medición de la señal generada por el número de sitios de adsorción de antígeno a anticuerpo. Los ensayos no competitivos identifican estos sitios de adsorción usando un anticuerpo secundario marcado, mientras que los ensayos competitivos miden sitios de adsorción no ocupados. Puesto que los inmunoensayos son función de la concentración de anticuerpo, volumen y constantes de afinidad, solamente si estos valores se mantienen constantes se podrán obtener mediciones comparativamente exactas. Sigue siendo necesario medir la cantidad real de analito en la muestra. La concentración de analito se mide por comparación con las matrices inmovilizadas sitioespecíficas de concentración precalibrada de los patrones de referencia internos.

35 **[0011]** Si se usan concentraciones precalibradas de patrón de referencia externo para crear curvas de calibración externa, esto proporciona una fuente constante de error en la conversión de la señal de detección interpolada en la concentración de analito que se supone que está presente en la muestra de ensayo. Se puede inducir un error adicional en la medición de anticuerpo a analito mediante el uso de un soporte o sustrato sólido en el que se adsorbe el antígeno o el anticuerpo. Aunque el aumento de carga de unión en el sustrato agrava errores adicionales de referencia externos, los ensayos de analitos ambientales están igualmente distorsionados.

40 **[0012]** Aunque la adsorción a superficies de soporte sólido aumenta por adición de fuerzas de unión hidrófobas, aumentar la modificación de la superficie puede producir cambios en la estructura del analito proteínico, así como en la estructura del anticuerpo, que alteraría significativamente la formación de complejo. El cambio estructural que conduce a la alteración de la formación de complejo tiene un efecto directo en los cuantos de la señal, p. ej., errores de recuento de fotones, medidos por un detector para determinar una relación de marcador a concentración.

50 **[0013]** Kusnezow y col. (2003, *Proteomics* 3: 254-264) describen la evaluación de diferentes parámetros implicados en la producción de micromatrices de anticuerpos sobre soportes de vidrio. Se analiza el efecto de estos parámetros, incluyendo la modificación de la superficie de vidrio, tipo y longitud de los reticuladores, composición y pH de los tampones de aplicación de manchas, reactivos de bloqueo, concentración de anticuerpos y procedimientos de conservación, en el rendimiento de las matrices. Mann y col. (2004, en: "Protein Array Technology", Kambhampati (ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pág. 165-194) describen diferentes tipos de micromatrices proteínicas, incluyendo matrices de anticuerpos, matrices de antígenos o inversas, matrices funcionales, matrices de captura y matrices de solutos, así como los procedimientos y desventajas de su producción.

55 **[0014]** Por lo tanto es necesario un procedimiento para analizar analitos en líquidos, producidos en determinadas condiciones, para optimizar el valor del diagnóstico de matrices inmovilizadas sitioespecíficas. Es necesario un dispositivo de ese tipo que tenga una fijación segura, repetible, cuantificable, reproducible, modulada y fiable de las matrices inmovilizadas sitioespecíficas a un soporte sólido, sin aberración, para mejorar la sensibilidad de dichos

inmunoensayos para tener un intervalo de detección dinámico de concentraciones de analito de femtomoles a nanomoles por ml. La modificación a la superficie del sustrato modulada potencia la calibración interna dinámica fiable como requieren las agencias reguladoras, tales como la FDA (Oficina federal estadounidense de fármacos y alimentos).

5

RESUMEN DE LA INVENCION

[0015] La invención se refiere a un procedimiento para matrices inmovilizadas sitioespecíficas de ensayo, que tienen un anticuerpo de captura para unirse a un analito, y matrices inmovilizadas sitioespecíficas de calibración, que contienen concentraciones conocidas de analito, que se van a imprimir sobre una superficie común de un dispositivo de ensayo. El dispositivo de ensayo tiene la superficie modificada para permitir la fijación modulada y cuantificable sitioespecífica de especies moleculares requeridas y sus agregados a una superficie. Se modula una proporción de sitios de enlace hidrófilos, hidrófobos y covalentes a sitios de unión en la superficie del sustrato de ensayo en un dispositivo, con el fin de optimizar la sensibilidad del ensayo en un principio específico del ensayo.

15

[0016] En el caso de multiplexado, la modulación de la energía superficial se hace en una pareja de ensayo, es decir, basado en antígeno/anticuerpo.

[0017] El dispositivo de inmunodiagnóstico tiene un soporte sólido, cuya superficie se ha modificado para permitir la modulación y por lo tanto la optimización de fuerzas contrapuestas hidrófilas e hidrófobas. Esta modificación permite la adsorción óptima de la proteína analito y el anticuerpo. La impresión de matrices inmovilizadas sitioespecíficas con puntos de diagnóstico de 5 μm a 500 μm de diámetro, con un intervalo preferido de 50 μm a 125 μm de diámetro, también es función de la humedad relativa constante. Sorprendentemente, la calibración interna de un ensayo mediante impresión del analito de concentraciones conocidas en matrices inmovilizadas sitioespecíficas permite la determinación de la medición proporcional usando exceso de complejos de anticuerpo–marcador detectable. El procedimiento se refiere a esta combinación de parámetros para establecer la configuración óptima para obtener resultados de ensayos de diagnóstico más exactos.

20

[0018] Según la presente invención, se proporciona un procedimiento de optimización de un ensayo para detectar una concentración de un analito en un líquido de muestra, usando dicho ensayo un dispositivo de ensayo que tiene una superficie, teniendo la superficie un punto de calibración inmovilizado sitioespecífico que incluye una cantidad predeterminada de analito impresa en la misma, y un punto de ensayo que incluye un anticuerpo de captura para la unión de dicho analito, incluyendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

25

- modificar dicha superficie aplicando un revestimiento de epoxisilano para proporcionar sitios de unión hidrófobos, sitios de enlace hidrófilos, y sitios de enlace covalentes;
- imprimir dichas manchas de ensayo y dichas manchas de calibración sobre dicha superficie;
- aplicar el líquido de muestra de ensayo al dispositivo de ensayo;
- probar la sensibilidad del ensayo; y
- modular la relación de dichos sitios de unión hidrófobos a dichos sitios de enlace hidrófilos a dichos sitios covalentes, modulando el tiempo y la temperatura de cocción del revestimiento de epoxisilano con el fin de optimizar la sensibilidad del ensayo.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40

Figura 1. Es una vista en perspectiva de un dispositivo de ensayo de la presente invención para llevar ensayos en matriz fijos.

Figura 2. Es una fotografía de una superficie superior de un dispositivo de ensayo de la presente invención que muestra la morfología de las manchas de 10 tampones de impresión diferentes sobre sustratos epoxídicos.

45

Figura 3. Es una fotografía de una superficie superior de un dispositivo de ensayo de la presente invención que muestra la intensidad media de la fluorescencia de diluciones de conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales.

Figura 4A. Es una representación gráfica de la intensidad media de la fluorescencia de diluciones del conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales con el epoxi Erie Superchip.

50

Figura 4B. Es una representación gráfica de la intensidad media de la fluorescencia de diluciones del conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales con el epoxi Erie Superchip con el lote 40309 de Epoxi.

Figura 4C. Es una representación gráfica de la intensidad media de la fluorescencia de diluciones del conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales con el epoxi Erie Superchip con el lote 40406 de Epoxi.

Figura 4D. Es una representación gráfica de la intensidad media de la fluorescencia de diluciones del conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales con el epoxi Erie Superchip con el lote 40309 de Epoxi.

Figura 5. Es una representación gráfica de la relación de la intensidad media de la fluorescencia de diluciones del conjugado BSA.RB aplicadas como manchas puntuales después de lavado (W) frente a las intensidades medias de las fluorescencia de blancos que intervienen después de lavado (WC) para ERIE y 3 lotes de epoxisilano de la presente invención.

Figura 6. Es una fotografía de una superficie superior de una realización alternativa del dispositivo de ensayo de la presente invención.

Figura 7. Es una gráfica que representa curvas de dosis/respuesta para realizar una curva de calibración dinámica interna.

Figura 8. Es una gráfica que muestra una correlación de la densidad de carga en la unión con la superficie del soporte sólido modificada.

Figura 9. Es una fotografía de un dispositivo de ensayo que muestra la modificación de la superficie adecuada de una superficie del soporte del dispositivo.

Figura 10. Es una fotografía que muestra la inmovilización específica del sitio de puntos de la matriz comparando la distribución aglomerada, heterogénea, anular y uniformemente espaciada del analito dentro de un punto.

Figura 11. Es una fotografía que muestra oligonucleótidos hibridados inmovilizados, sitios específicos, de embriones de ratón.

Figura 12. Es una fotografía que muestra oligonucleótidos hibridados inmovilizados, sitios específicos, de bazo de ratón.

Figura 13. Es una fotografía que muestra las respuestas de IgG e IgM en el suero de un paciente a 10 micromatrices de patógenos más los patrones de calibración de la IgG e IgM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] El procedimiento de la presente invención lleva a cabo preferiblemente en asociación con un dispositivo de ensayo que tiene matrices inmovilizadas sitioespecíficas de puntos de calibración y matrices inmovilizadas sitioespecíficas de puntos de ensayo impresas en el mismo. En la figura 1 se muestra un dispositivo de ensayo preferido. El dispositivo de ensayo tiene una superficie sustancialmente plana 16. En la superficie sustancialmente plana 16 se ha impreso al menos una y preferiblemente al menos tres matrices de captura de ensayo 20 y matrices inmovilizadas sitioespecíficas de calibración 22 impresas en la zona de lectura. Más preferiblemente, se imprime un multiplexado de matrices inmovilizadas sitioespecíficas de manchas de ensayo para detectar la presencia de analitos en la zona de lectura 16. Las manchas de ensayo de la matriz inmovilizada sitioespecifica 20 preferiblemente incluyen anticuerpos unidos que se unen específicamente a un analito proteínico. Los anticuerpos unidos están preferiblemente espaciados para que cada anticuerpo unido esté disponible para la unión al antígeno de ensayo, libre de impedimento estérico de los complejos de antígeno adyacentes. Preferiblemente, una proteína no reactiva separa los anticuerpos unidos en cada uno de los puntos de ensayo de la matriz inmovilizada sitioespecificas.

[0021] La zona de lectura 16 tiene matrices inmovilizadas sitioespecíficas de puntos de calibración 22 impresas en la misma. Los puntos de calibración contienen una cantidad predeterminada de dicho analito para reaccionar con el reactivo del recipiente sin reaccionar, que está unido a un marcador detectable. Las matrices inmovilizadas sitioespecificas de las manchas de calibración permiten correlacionar la intensidad del marcador con la cantidad de antígeno presente. La intensidad del marcador en las matrices inmovilizadas sitioespecificas de las manchas de ensayo después se usa para obtener la cantidad de antígeno presente en un volumen de muestra ensayado.

[0022] El sustrato de inmovilización del ensayo se puede seleccionar de materiales que permiten la modificación de la superficie, incluyendo materiales de silicio, vidrio y poliméricos, pero en una realización preferida está hecho de un sustrato de soporte plástico tal como poliestirenos y polipropilenos. La superficie polimérica se puede modificar fácilmente para adsorber antígeno y anticuerpo. La adsorción de proteínas requiere sitios de unión hidrófobos para la fijación óptima a la superficie del dispositivo de ensayo, mientras que el anticuerpo se une bien a enlaces de carga hidrófila, incluyendo enlaces covalentes. Estas matrices inmovilizadas sitioespecificas de las manchas de ensayo se adsorben de forma proporcional a la superficie de la zona de lectura en función de la modificación de la superficie que resulta del aumento de la densidad de carga eficaz por unidad de área. El aumento o los cambios del equilibrio de fuerzas asociadas con las interacciones de Van der Waals, fuerzas hidrófilas e hidrófobas y la modulación de la densidad de enlaces covalentes, permite el aumento selectivo de las propiedades hidrófilas frente a hidrófobas de la superficie de la zona de lectura y las matrices de manchas de ensayo inmovilizadas sitioespecificas.

[0023] La mayor expansión del volumen del líquido de la mancha, que resulta de una modificación del ángulo de

contacto, también es una función de la humedad relativa y la temperatura. Al aumentar la humedad relativa, aumenta el tiempo de secado de las manchas lo cual permite la formación de manchas mayores sobre la superficie para un volumen de líquido de ensayo dispensado similar. El efecto neto produce manchas mucho más finas, acercándose de esta forma al ideal del adsorbato de una sola capa molecular que forma una capa molecular más sensible para la captura óptima del analito por el anticuerpo de captura. Sorprendentemente, la dispersión uniforme del analito por las matrices de manchas de ensayo inmovilizadas sitioespecíficas optimiza la morfología de las manchas de ensayo en 3 dimensiones.

5
10
15
[0024] El analito que se va a capturar y medir se identifica mediante un marcador conjugado con un anticuerpo con un marcador específico del analito. Se conocen en la técnica los colorantes fluorescentes como marcadores detectables para proporcionar el marcaje exacto. Sorprendentemente, el complejo de analito-anticuerpo-colorante proporciona una medida de la concentración de analito cuando se compara con un valor inicial obtenido de las matrices inmovilizadas sitioespecíficas usadas como calibradores de analito internos de referencia. En contraste, el uso de calibradores externos es una fuente principal de error aceptada que se encuentra normalmente en los inmunoensayos.

20
25
[0025] El exceso de colorante conjugado con el anticuerpo dirigido contra el analito, que no se une al respectivo analito, normalmente se considera que es redundante y se elimina en el lavado como se conoce en la técnica. Sorprendentemente, este procedimiento de la presente invención usa el anticuerpo dirigido contra el analito para crear múltiples líneas de calibración internas del dispositivo directamente a partir de las matrices de calibración inmovilizadas sitioespecíficas.

30
35
40
[0026] Junto con los puntos de ensayo de matrices inmovilizadas sitioespecíficas con anticuerpo de captura conocido para capturar el analito, se imprime una serie de puntos de calibración de matrices inmovilizadas sitioespecíficas directamente adyacentes a las matrices inmovilizadas sitioespecíficas de los puntos de ensayo, como se muestra en la figura 1. Este segundo conjunto de puntos de calibración inmovilizados sitioespecíficos 22 consiste en la disminución de la concentración por punto de la concentración de analito conocida. Por lo tanto ahora, cuando se lleva a cabo el ensayo en el dispositivo, se ha reducido a un ensayo de una sola etapa, sin la necesidad obligatoria de etapas de lavado intermedias para eliminar el exceso de anticuerpo dirigido contra el analito, puesto que el exceso de concentración de fondo de anticuerpo marcado conjugado se reduce eficazmente por la unión a las manchas predominantes de la matriz inmovilizada sitioespecífica que contienen concentraciones conocidas del antígeno de calibración.

45
50
55
[0027] Sorprendentemente, el procedimiento de la presente invención proporciona sustratos de epoxisilano para las matrices inmovilizadas con unión de alta capacidad, covalente y modulada de bibliotecas de oligonucleótidos amino-terminales, bibliotecas de ADNc, proteínas, péptidos, glicoproteínas, lipopolisacáridos, así como moléculas pequeñas tales como Biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina (Pierce, EZLink Biotin-PEO-Amine). No se usan disolventes orgánicos en el procedimiento. No se requiere una campana de extracción, ni precauciones especiales de eliminación de residuos. Se obtienen resultados óptimos cuando se usan los tampones de impresión 3X a 6X SSC pH 7, tampón de fosfato sódico 0,15 M pH 8,5, tampón de fosfato sódico 0,1 M pH 7,2, y bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,6. El tamaño de la mancha se puede ajustar añadiendo una pequeña cantidad de detergente (SDS del 0,01% al 0,05%).

60
65
70
[0028] Cuando el líquido de ensayo que contiene el complejo de analito-anticuerpo-colorante así como el excedente de complejo de anticuerpo dirigido contra analito-colorante, fluye a lo largo de los dos tipos de matrices inmovilizadas sitioespecíficas impresas en el dispositivo de ensayo, el complejo excedente se une con las manchas de analito conocidas para crear las concentraciones de referencia para la calibración cuando se lee la concentración de colorante en un lector. El complejo de analito-anticuerpo-colorante se une con el anticuerpo de captura de las matrices inmovilizadas sitioespecíficas de las manchas de ensayo y proporciona una lectura de la concentración de analito en la disolución de ensayo. Este procedimiento de la presente invención de calibración dinámica interna (Internal Dynamic Calibration, IDCTM) integra una curva de referencia de calibración interna comparativa con la curva de ensayo comparativa como se muestra en la figura 8. La concentración real de analito en el líquido de ensayo se determina con exactitud porque se proporciona simultáneamente el patrón de calibración interna específica del ensayo.

75
80
[0029] Cuando el procedimiento se usa junto con el dispositivo proporciona una determinación empírica del aumento correcto de las cargas inducidas en el dispositivo de ensayo para unir suficientemente los componentes de ensayo sin producir pérdida de la señal de detección como resultado de sucesos de unión de alta densidad, es decir número de enlaces por área de superficie unitaria del dispositivo de ensayo.

- 5 **[0030]** Con el fin de alcanzar la sensibilidad máxima en el dispositivo de ensayo de la presente invención, el dispositivo de ensayo tiene concentraciones conocidas de antígeno en los puntos de calibración. Las concentraciones crecientes de antígeno se leen durante el ensayo como resultado de la unión con el excedente de complejo de calibración antígeno-anticuerpo más marcador fluorescente. El antígeno, sea una proteína y/o ácido nucleico o derivado requeridos, tiene que ser fijado firmemente a la superficie del sustrato de inmovilización del dispositivo de ensayo para evitar que se vuelva soluble y sea eliminado en el lavado durante el desarrollo del procedimiento de ensayo. La fijación del analito a las matrices inmovilizadas sitioespecíficas de las manchas de ensayo se optimiza con un equilibrio de los enlaces hidrófobos, hidrófilos y covalentes, modulados por el tampón de suspensión del analito que contiene un separador molecular para la dispersión uniforme del analito por la mancha de ensayo impresa. La dispersión uniforme asegura un nivel de iluminación uniforme por mancha de ensayo y minimiza el impedimento estérico.
- 10 **[0031]** Sorprendentemente, el grado de modificación máximo de la superficie para la adsorción de proteína, puede actuar a la inversa para la adsorción del anticuerpo como se muestra en la figura 9. La densidad óptima de cargas de la superficie puede unir el anticuerpo tan firmemente a la superficie modificada con cargas en una medida en la que aunque esté presente el anticuerpo, no se encuentran sucesos de unión del antígeno. Como consecuencia directa, no se puede capturar complejo de antígeno-marcador libre.
- 15 **[0032]** La unión directa de anticuerpos a una superficie desnuda en la que no se ha modificado el sustrato según la presente invención, puede producir cambios conformacionales en el anticuerpo que reducen su afinidad por el analito. Los analitos también se adsorben de forma pasiva en superficies energizadas. La proporción de analito unido puede estar en el intervalo de 5% a 95%, por lo que es importante la optimización cuidadosa de la modificación de una superficie y el procedimiento de recubrimiento. La unión de proteína a plástico, por ejemplo, se produce porque las moléculas de agua tienen una afinidad mucho más fuerte entre sí que con las regiones hidrófobas. La exclusión de sitios hidrófobos de la disolución hace que partes de las proteínas se adsorban en los sustratos.
- 20 **[0033]** La superficie del soporte sólido del dispositivo de ensayo se modifica para tener un equilibrio del aumento hidrófilo para la unión del anticuerpo y las características de flujo del líquido de ensayo frente al mantenimiento de la unión hidrófoba y covalente para la adsorción de proteína. La impresión sobre la superficie modificada de los analitos de los puntos de calibración y ensayo suspendidos en tampón de modulación que contiene separador molecular, se lleva a cabo con control de la humedad constante para asegurar que las manchas tienden al espesor mínimo que conduce a la formación de matrices inmovilizadas sitioespecíficas de las manchas de ensayo con espesor de capa molecular. Las características clave de la superficie modular resultantes de la presente invención, incluyen el mantenimiento de la precisión, sensibilidad y repetibilidad del ensayo.
- 25 **[0034]** Como se muestra en la figura 6, un procedimiento de calibración interna del ensayo consiste en múltiples repeticiones para mantener los límites de confianza altos para diagnósticos exactos. Un equilibrio eficaz de los parámetros aplicados para la fijación de los puntos a la superficie modificada se confirma llevando a cabo el inmunodiagnóstico del líquido de la muestra de ensayo. Cuando se han confirmado las condiciones óptimas para un ensayo específico, empieza la producción en masa con ensayos de control de calidad incorporados en los intervalos requeridos.
- 30 **[0035]** Con el fin de producir recubrimientos de epoxisilano moduladores consistentes para superficies de sustratos, el sustrato se limpia en disolución de detergente, se lava durante varias horas, y después se transfiere a lejía. El recubrimiento de epoxisilano se aplica en forma de disolución recién preparada de monohidrato del ácido 2-morfolinoetano sulfónico (MES) con 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano añadido. Se elimina el exceso de agua de los sustratos y los sustratos se transfieren a una disolución de epoxisilano/MES. Los sustratos se lavan preferiblemente en 3, pero alternativamente 1 ó 2, cambios de agua DI y se secan. Inmediatamente después del recubrimiento con el epoxisilano la superficie del sustrato es hidrófila. El cocimiento deshidrata la superficie sin degradar los grupos epoxi reactivos sobre la superficie y hace a la superficie menos hidrófila. Los sustratos se almacenan mejor a temperatura ambiente.
- 35 **[0036]** Este procedimiento de epoxisilano covalente de la presente invención ha demostrado ser el procedimiento óptimo para producir la modulación de la energía superficial puesto que la reacción covalente favorece termodinámica la minimización de energía y la superficie de epoxisilano se puede modular usando el tiempo y la temperatura de cocción, para tener energías superficiales controladas (ángulos de contacto) desde muy hidrófilas a moderadamente hidrófobas.

[0037] Si la tensión superficial del recubrimiento es mayor que la energía superficial del sustrato, el recubrimiento no se extenderá ni formará una película. Al aumentar la energía superficial del sustrato, el recubrimiento se extenderá y formará una película pero cuando seque, tendrá poca adherencia. Mayores aumentos de la energía superficial del sustrato darán como resultado la formación más fácil de la película húmeda y mejor adherencia de la película seca.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1. Efecto del tampón de impresión en la morfología de las manchas y la capacidad de unión**

[0038] Con respecto a la superficie epoxídica, figura 3, el tampón de fosfato 0,150 M produjo otra vez los mejores resultados. El glicerol al 10% dio las señales más bajas. Para esta superficie, el DMSO al 50% también mostró señales falsas en las manchas del blanco. Las intensidades de las señales y las capacidades de unión en conjunto son de forma bastante evidente menores que las correspondientes a la superficie de hidrogel-epoxi para todas las concentraciones de BPA y en todos los tampones.

[0039] La figura 2 muestra una morfología de manchas de 10 tampones de impresión diferentes en sustrato epoxídico. Se imprimieron 8 diluciones (5x) de BPA por triplicado desde el máximo de 1000 µg/ml a la izquierda hasta 0,0 a la derecha. El sustrato se bloqueó con tampón de bloqueo durante 2 horas. El BPA unido se refirió por tratamiento con estreptavidina-Cy3 4 µg/ml en el mismo tampón de bloqueo durante 1 h. Fosfato pH 8,5 DMSO 10%/Agua Blanco DMSO 50%/Agua Glicerol 10%/Agua Blanco MES pH 4,7 Borato pH 9,3 Carbonato pH 9,6 6 x SSC pH 7,2 3 x SSC pH 7,2 Agua

25 **Ejemplo 2. Optimización de la impresión y control de calidad de la unión covalente de sustratos de micromatrices**

[0040] Hay una serie de procedimientos aceptados en general para el control de calidad de las micromatrices impresas con agujas. En una biblioteca impresa de matrices de oligómeros o ADNc, se pueden visualizar la morfología de las manchas y las manchas que faltan con colorantes intercaladores de ADN tales como SYBR 555 (Invitrogen/Molecular Probes P32930), y por hibridación con oligómeros de 9 bases aleatorios marcados con colorante AlexaFluor (Invitrogen/Molecular probes P32934, y P32937). Se puede añadir ADN trazador con un marcador fluorescente que no sea excitado por las longitudes de onda del láser ni del rojo ni del verde estándar, a cada oligómero o ADNc de la biblioteca. Esto es ideal y proporciona la cuantificación del ADN en cada mancha simultáneamente con las señales de hibridación, leídas en un microscopio confocal con un tercer láser y filtro de interferencia para el trazador marcado.

[0041] Antes de realizar el esfuerzo y el gasto de imprimir una biblioteca en lotes de sustratos, se prefiere comprobar en los propios lotes la capacidad de unión, morfología de las manchas, y uniformidad de un lote a otro.

[0042] Cuando se imprimen disoluciones de oligonucleótidos, ADNc, proteínas o moléculas pequeñas sobre sustratos de micromatrices, hay una concentración óptima para la disolución. Cada superficie tiene una capacidad de unión máxima. La impresión en exceso de ésta desperdicia material valioso y puede producir niveles de fondo más altos y mayor traslado o contaminación cruzada de la biblioteca. Imprimir menos de la cantidad óptima produce señales menores y potencialmente relaciones de señal a ruido menores.

[0043] Conjugado de BSA-Rodamina B (BSA.RB). El isotiocianato de Rodamina B (RBITC, Sigma-Aldrich nº 283984) es un fluoróforo que absorbe la longitud de onda del láser verde usada para la Cy3, y emite por encima de un espectro más ancho tanto en los canales de Cy3 como de Cy5 de los microscopios confocales de barrido estándar. Se disolvieron 6 mg de RBITC en 600 µl de lactato de etilo. Se prepararon 3 partes alícuotas de 1 ml de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich nº A7517), 20 mg/ml, en tampón de carbonato/bicarbonato pH 9,6. Cada parte alícuota se mezcló con 100, 200 ó 300 µl de la disolución de RBITC y se dejó reaccionar durante la noche. La reacción se inactivó por adición de 10 mg de lisina a cada una de las partes alícuotas y dejándolas reaccionar durante 2 horas. Se empaquetó una minicolumna con Sephadex G50 y se lavó con 3X SSC. Cada parte alícuota se filtró en gel en la columna G50 y se eluyó en 3X SSC, el tampón destinado a la impresión de la micromatriz. Se recogió el primer pico coloreado (el conjugado de BSA.RB) y los picos posteriores se descartaron. Las relaciones de conjugación resultantes de las relaciones crecientes de RBITC se evaluaron a partir de los espectros de absorbancia comparativos de BSA pura, RBITC puro y los conjugados eran aproximadamente 2:1, 5,5:1 y 12.8:1 moléculas de colorante por molécula de BSA.

5 **[0044]** Se seleccionó el conjugado 5,5:1 para imprimir según lo siguiente. El BSA tiene aproximadamente el mismo peso molecular que una cadena de oligómero de 200 bases de ADNc y ocupa aproximadamente la misma área superficial que una sonda de oligómero de 70 bases hibridada con una diana de oligómero de 200 bases. Además, la relación recomendada de nucleótido/colorante para hibridar los transcritos marcados es aproximadamente 40:1, o 5 fluoróforos por oligómero de 200 bases. Por lo tanto, la molécula de conjugado de BSA.RB simula el área superficial de unión por molécula de una sonda de oligómero y el marcaje de fluorescencia de la diana esperado en una micromatriz. Los oligómeros de 70 bases de las bibliotecas de Qiagen/Operon terminan en amino para la reacción covalente con las superficies activas tales como epoxi, aldehído y éster de NHS. Los grupos amino de los restos de lisina superficiales de la BSA que no han reaccionado con el RBITC están disponibles para reaccionar con la superficie mediante la misma química.

15 **[0045]** La concentración de impresión recomendada para las bibliotecas de oligómeros de 70 bases de Qiagen/Operon es de 15 μM (15 $\text{pM}/\mu\text{l}$). Se preparó una dilución seriada 2X del conjugado BSA.BR en 3X SSC en una placa de 384 pocillos de modo que alternaran los blancos (solo el tampón 3X SSC) entre diluciones de conjugado. Esto se diseñó para ensayar el lavado de las agujas de la impresora de matrices y determinar la gravedad del traslado de pocillo a pocillo o contaminación cruzada. Por lo tanto, la concentración inicial se ajustó para que fuera ligeramente superior que la recomendada, 18 $\text{pM}/\mu\text{l}$.

20 **[0046]** Los portaobjetos con recubrimiento covalente de epoxisilano de la presente invención y las muestras de epoxi Erie SuperChip proporcionadas por el fabricante se imprimieron a partir de la placa de dilución seriada de 384 pocillos con agujas divididas de tungsteno de Point Technologies mediante un dispositivo SpotArray de Perkin Elmer. La disolución de lavado era etanol al 10% en agua de OI, ajustándose el dispositivo SpotArray para 3 ciclos de 2 segundos de lavado por chorro seguido de 2 segundos de secado a vacío entre pocillos. Las manchas eran 340 μg separados en 12 manchas por fila, 6 repeticiones de cada dilución de BSA.RB seguido de 6 repeticiones del blanco correspondiente en la misma línea, como se muestra en la figura 3.

30 **[0047]** La figura 3 muestra el sustrato con micromatriz de unión covalente de epoxisilano comercial (izquierda) y 3 lotes hechos en el laboratorio impresos con el conjugado de BSA.Rodamina B diluido de forma seriada, con las imágenes generadas antes (parte superior) y después (parte inferior) del lavado durante 24 horas con tampón de bloqueo etanolamina al 1% + BSA al 1% pH 8,5. El barrido de las imágenes superiores e inferiores de cada grupo se hizo en el mismo láser y parámetros de aumento, pero no son los mismos para todos los conjuntos.

35 **[0048]** El barrido de las matrices de dilución de BSA.BR se hizo en un dispositivo SpotArray de Perkin Elmer, microscopio láser confocal Express. Los parámetros típicos eran láser 60%, fotomultiplicador 55%, pero no eran exactamente los mismos para todos los portaobjetos. Estos ficheros tif del prelavado se guardaron para el posterior análisis. Los portaobjetos se lavaron durante 24 horas en tampón de bloqueo (etanolamina al 1% + BSA al 1% ajustado a pH 8,5 con HCl), después se hizo el barrido otra vez con los mismos parámetros para obtener los ficheros de imágenes de después del lavado. Las imágenes de antes y después del lavado se analizaron con ScanAlyze (EisenLabs, Stanford). Las cuadrículas y los círculos se ajustaron de forma óptima para cada matriz de modo que los círculos encerraban exactamente las manchas fluorescentes.

Análisis de la retención y el traslado de proteína

45 **[0049]** Dependiendo del lote, las manchas variaban de 160 μm a 250 μm de diámetro como se ve en la figura 3. El lavado de las agujas no era completo ya que pueden verse claramente 6 manchas más débiles a la derecha de las 6 manchas de cada dilución del conjugado de BSA.RB. Esto puede producir la contaminación cruzada de las bibliotecas, limitando el número de impresiones que se pueden realizar antes de tener que descartar la biblioteca. Subraya la importancia de hacer partes alícuotas de las bibliotecas para extender su vida útil y reducir los costes.

50 **[0050]** Las figuras 4 A, B, C y D muestran las intensidades de la fluorescencia de los puntos representadas gráficamente frente a la concentración impresa (antes de lavado) del conjugado de BSA.RB (curva púrpura superior en cada diagrama) y sus correspondientes blancos vecinos (curva púrpura inferior en cada diagrama). Las figuras también muestran la curva de retención del conjugado después de lavado (oscura superior) y del blanco (débil inferior). A la concentración recomendada por Qiagen/Operon para la impresión de sus bibliotecas de oligómeros de 70 bases (15 $\text{pM}/\mu\text{l}$) el traslado es bastante alto. El análisis muestra que la impresión a esta concentración da menos proteína retenida que la impresión a aproximadamente 5 $\text{pM}/\mu\text{l}$ (1/3 de la concentración). Por lo tanto, se desaprovecha material de la biblioteca. Además, el traslado/contaminación cruzada es más alto a las concentraciones mayores puesto que más proteína u oligonucleótido se arrastra de un pocillo a otro en las agujas

incluso después de lavarlas bien.

Tabla 2: Resumen del análisis numérico de los diagramas de la figura 2, a partir de los cuales se puede ver que el intervalo de concentración de impresión óptimo es entre 2,5 y 10 pM/μl. Por encima de este intervalo máximo se mantiene la proteína retenida (señal) mientras que se reduce el traslado.

| Sustrato | % de retención 100*(P/W) entre 2,5 - 10 pM/μl | % de contaminación 100*(WC/W) entre 2,5 - 10 pM/μl |
|----------|---|--|
| ESCE | 47 - 58 | 4,7 - 5,8 |
| 40309 | 33 - 37 | 6,1 - 7,4 |
| 40406 | 16 - 47 | 2,5 - 7,7 |
| 40721 | 35 - 48 | 2,5 - 2,7 |

[0051] La figura 5 muestra las gráficas de las relaciones de las intensidades medias de fluorescencia de diluciones del conjugado de BSA.RB aplicadas como manchas puntuales después de lavado (W) frente a las intensidades medias de fluorescencia de los blancos que intervienen después de lavado (WC) para ERIE y 3 lotes de epoxisilano de la presente invención, analizado por ScanAlyze. Las medias son de 6 repeticiones antes y después de lavado como muestra las imágenes de la figura 1 (Claves: P - dilución de BSA-RB impresa, PC - traslado del blanco impreso, W - dilución de BSA.RB después de lavado, WC - traslado del blanco después de lavado).

[0052] La impresión directa de las proteínas marcadas con fluoróforos u oligómeros de 70 bases es un procedimiento rápido para comprobar la capacidad de unión o el porcentaje de retención de la unión del sustrato de adsorción de energía mínima para las micromatrices impresas con agujas. Se puede comparar la unión y la morfología de las manchas en diferentes lotes de portaobjetos antes de ser aceptados para la impresión de bibliotecas valiosas. Además es un procedimiento valioso para evaluar tanto la calidad del lavado de las agujas como el ajuste de la concentración de impresión óptima para las bibliotecas. La determinación de la concentración de impresión óptima o la señal máxima para la concentración y traslado mínimos, conserva las bibliotecas y prolonga su vida al minimizar la contaminación cruzada. Basándose en estos estudios, la biblioteca de los autores de la invención de oligómeros de 70 bases humanos Operon/Qiagen 600 pM se dividió en 4 partes alícuotas 150 pM cada una. Tres se conservaron para imprimir la biblioteca de 22K entera (versión 2.1.2) y una se usó para seleccionar subconjuntos orientados de 200 a 800 oligómeros para proteasas, genes relacionados con el cáncer de mama, proteína de dedo anular, reloj (relacionado con el ritmo circadiano) y genes HOX. Estos subconjuntos se dividieron además en duplicados 75 pM.

[0053] Se presentan 3 lotes de epoxisilano de la presente invención y un portaobjetos de epoxisilano comercial (epoxi Erie SuperChip) como ejemplos de este procedimiento. Las morfologías de las manchas pueden estar significativamente fuera de la tolerancia (p. ej., el lote 40406) aunque la capacidad de unión pueda ser aceptable.

[0054] La señal máxima y la retención de proteína están dentro del intervalo de concentración de impresión de 2,5 a 10 pM/μl para todos los portaobjetos en este experimento. Este intervalo óptimo aproximado también se ha encontrado en otro experimento con oligonucleótidos de 9 a 70 bases (no se muestran los datos). La impresión a concentraciones más altas reduce de hecho las señales y la retención, supuestamente por impedimento estérico. Los sustratos epoxídicos de la presente invención proporcionan la relación señal a fondo óptima, una mejora de hasta 2 veces frente al sustrato comercial en el intervalo de impresión óptimo, y esto es evidente en las imágenes de la figura 3.

40 Ejemplo 3. Matrices múltiples de ensayo y calibración inmovilizadas sitioespecíficas

[0055] Se han adsorbido múltiples matrices de manchas sobre el sustrato de la superficie del soporte sólido.

[0056] Como se muestra en la figura 6, una realización del dispositivo de ensayo muestra 10 columnas impresas de puntos de calibración 22 de la misma concentración de analito. Las dos columnas finales de los puntos de ensayo 20, a la derecha, son puntos de anticuerpo de captura con muestras de ensayo adsorbidas de concentración a determinar. Cada fila representa un solo ensayo con calibración dinámica interna (IDB). La fila de ensayo se repite 10 veces. La matriz ensayo entera es de 10 puntos x 10 puntos para la IDB y 2 x 10 puntos para las muestras de ensayo. La intensidad de fluorescencia medida determina las concentraciones relativas de analito.

50 Ejemplo 4. Calibración interna dinámica

[0057] Como se muestra en la figura 7, la curva A representa las variaciones típicas en la respuesta a la dosis

cuando las muestras de ensayo se miden usando una curva de concentración generada interna. La curva B es la recta de calibración externa derivada, interpolada erróneamente determinada por una lectura de calibración externa de dosis baja medida y una lectura de referencia de calibración externa de dosis alta. Después, los valores respectivos entre los puntos bajos y altos se integran dibujando una recta, es decir, la curva B. La calibración dinámica interna produce una gráfica de rectas basada en varias gráficas que dan como resultado una curva que representa la respuesta calibrada real de las muestras de ensayo como en la figura 8.

Ejemplo 5. Dispositivo ensayado para comparar el efecto de la carga de superficie de alta densidad con la modificación de la superficie óptima con una carga equilibrada

[0058] Para comparar la respuesta a la dosis del soporte sólido del dispositivo optimizado (curva "óptima" superior) frente a la superficie modificada del soporte sólido con alta carga (curva "cargada" inferior). La concentración de proteína de analito CK-MB de mancha dinámica estaba en el intervalo de 26 pg/ml a 26.000 pg/ml como se muestra en la figura 8. El área de la superficie muy cargada previno de forma eficaz la unión del analito en concentraciones menores de 2620 pg/ml.

Ejemplo 6: Procedimiento aplicado para producir el dispositivo de ensayo

[0059] La figura 9 ilustra una superficie del dispositivo típica, modificada para mostrar matrices de impresión comparativas y confirmar la modificación de superficie adecuada del soporte sólido para la adsorción tanto del analito como del anticuerpo. El procedimiento compara tamaños de puntos relativos con incrementos en el volumen de punto dispensado.

Ejemplo 7. Humedad en el tamaño del punto

[0060] Se ensayó en los soportes sólidos de superficie modificada los efectos hidrófilos del flujo a 24°C al 18% de humedad y 47% de humedad. Se midió el aumento comparativo de diámetro de los puntos. El área superficial aumentó en 51% con mayor humedad para el mismo volumen de líquido de la mancha, aproximadamente una reducción de 50% del espesor de la mancha.

Ejemplo 8. Inmovilización sitioespecífica de los puntos de la matriz que contienen una distribución espaciada uniformemente del analito dentro de un punto

[0061] La figura 10, disposición A, muestra el efecto de usar tampón de bicarbonato a pH 9,0 para formar un agregado central de analito concentrado que produce un pico de emisión y resultados de datos erróneos. La disposición B muestra el efecto del clorhidrato de guanidina adicional que produce agregados de analito dispersados. La disposición C muestra el uso de borato e clorhidrato de guanidina a pH 5,0. Se muestra la formación de un anillo del analito en el perímetro de la mancha, dejando en el centro una concentración mínima. Sorprendentemente, el componente separador molecular de la presente invención, figura 10 en la disposición D, forma la mejor morfología de manchas y señal. El analito se dispersa uniformemente por la mancha usando borato (H_3BO_3 50 mM, pH 5,0), pero añadiendo cloruro de magnesio ($MgCl_2$ 50 mM) para espaciar activamente el analito por la mancha.

[0062] El sustrato de epoxisilano modulado de la presente invención, cuando se usa junto con analito y tampones incompatibles con el sustrato, inmoviliza las manchas de la matriz que contienen patrones definitivos defectuosos de analito y agregados de analito, como se muestra en la figura 10. La agregación molecular y la dispersión del analito en las manchas de la matriz son críticas cuando se obtienen mediciones comparativas de la concentración de analito. El % CV (porcentaje del coeficiente de variación) aceptable en diagnósticos clínicos se obtiene solo cuando las manchas de la matriz contienen una dispersión uniforme del analito, como se muestra en la figura 10 en la disposición D. La mejor morfología de las manchas y señal en casi cada superficie se obtenía, con la mayor frecuencia, con H_3BO_3 50 mM, pH 5,0, en la mayoría de los casos con $MgCl_2$ 50 mM añadido.

Ejemplo 9. Inmovilización de ácido nucleico en el sustrato de epoxisilano de la presente invención

[0063] Las matrices son un conjunto concentrado de 72 oligonucleótidos de la biblioteca genómica de ratón Operon, localizados y sitioespecíficos sobre el sustrato de epoxisilano de la presente invención. El sustrato se bloqueó en 2-aminoetanol 2 mg/ml + BSA al 1% durante 24 horas, después se lavó con agua desionizada y se secó por centrifugación.

- 5 **[0064]** Se comprobó la calidad del ARN extraído de embriones enteros de ratones de 9 días, como se muestra en la figura 11, y de tejido de bazo de ratón adulto, como se muestra en la Figura 12, usando el sistema de extracción de ARN total SV de Promega, usando un bioanalizador Aligent. El ARN se amplificó mediante el procedimiento Ovation de NuGen para dar un aminoalil-c-ADN amplificado unas 500 veces. Este se conjugó con Cy5-éster de NHS para dar el ADNc marcado con fluoróforo. El rendimiento de ADNc se cuantificó y la proporción de incorporación de marcador se confirmó usando un espectrofotómetro de fibra óptica Nanodrop 1000. El Cy5-ADNc (0,5 µg de ADNc total en microlitros) se hibridó en las matrices inmovilizadas sitioespecíficas 20 horas en 5 X SSC + SDS al 0,1%. Las matrices se lavaron sucesivamente en 3X SSC 2 veces, 1X SSC dos veces y 0,1X SSC una vez, y después se secaron por centrifugación. Las matrices de manchas inmovilizadas sitioespecíficas se leyeron usando un
- 10 microscopio de barrido confocal PE ScanArray con parámetros relativamente bajos del láser <65% y aumento <60%. La obtención de buenos resultados con estos parámetros bajos indica que el ADNc está bien marcado y que el sustrato de epoxisilano de la presente invención retiene los oligonucleótidos de la sonda óptimos para hibridar la diana.
- 15 **[0065] Ejemplo 10. El procedimiento de la presente invención aplicado a un dispositivo APT de la presente invención; dispositivos de micropocillos para optimizar la medición de analito y anticuerpo mediante adsorción de energía mínima.**
- 20 **[0066]** Se preparó como sigue una micromatriz proteómica adecuada para el serodiagnóstico de titulación de anticuerpos dirigidos contra patógenos (dispositivo APT). Se imprimieron diluciones seriadas de IgG e IgM humana como patrones de calibración y antígenos bacterianos y víricos por triplicado como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 10: Patrones de calibración y antígenos bacterianos y víricos impresos

| | | | |
|----------------|-----------|----------------|----------------|
| IgM 900 µg/ml | H .pylori | T. gondii | IgG 900 µg/ml |
| IgM 300 µg/ml | | | IgG 300 µg/ml |
| IgM 100 µg/ml | Herpes | Rubella | IgG 100 µg/ml |
| IgM 33,3 µg/ml | | | IgG 33,3 µg/ml |
| IgM 11,1 µg/ml | Herpes 2 | Rubeola | IgG 11,1 µg/ml |
| IgM 3,7 µg/ml | | | IgG 3,7 µg/ml |
| IgM 1,2 µg/ml | CMV | C. trachomatis | IgG 1,2 µg/ml |
| IgM 0,4 µg/ml | | | IgG 0,4 µg/ml |
| IgM 0,14 µg/ml | EBV | C. jejuni | IgG 0,14 µg/ml |
| IgM 0 µg/ml | | | IgG 0 µg/ml |

- 25 **[0067]** La superficie se bloqueó con BSA al 1% en disolución salina tamponada con Tris pH 8 (tampón de bloqueo) durante 18 horas. Las muestras de pacientes que se sabía que estaban infectados por Helicobacter pylori (H. pylori) y que se había ensayado la titulación de anticuerpos por procedimientos de referencia, se diluyeron 1 a 10 en volumen en tampón de bloqueo. Después, estas muestras diluidas se incubaron 200 µl de cada muestra por pocillo en las micromatrices durante 15 minutos. Las muestras se decantaron y los pocillos se lavaron mediante dos ciclos de llenado de los pocillos con disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4, agitando durante 20 segundos y decantando. Se hizo un tercer lavado de 20 segundos con tampón de bloqueo. Después, los pocillos se llenaron con 200 µl de una combinación de conjugado de anticuerpo dirigido contra IgG humana de cabra.Cy3 3 µg/ml y conjugado de anticuerpo dirigido contra IgM humana de cabra.Dy647 en tampón de bloqueo y se incubaron durante 15 minutos. Los conjugados se decantaron y los pocillos se lavaron mediante 2 ciclos de llenado de los pocillos con disolución salina tamponada con fosfato pH 7,4, agitando durante 20 segundos y decantando. Los portaobjetos de plástico de los pocillos se retiraron con una cuña que salía de la parte inferior plana de vidrio del portaobjetos, que se lavó durante 20 segundos en agua desionizada y se secó por centrifugación en la centrífuga a 500 rpm durante 1 minuto.
- 30
- 35
- 40 **[0068]** Se usó un microscopio confocal de barrido láser ScanArray de Perkin Elmer para generar las imágenes de las matrices con los siguientes parámetros: láser (IgG) de canal Cy3 (verde) 70% fotomultiplicador 70%, láser (IgM) de canal Cy5 (rojo) 75% fotomultiplicador 75%. Se muestra una imagen de la matriz representativa del experimento en la figura 13. Por lo tanto, se proporciona un ensayo de diagnóstico, proteómico multiplexado que se lleva a cabo en aproximadamente 35 minutos, que da titulaciones cuantitativas de IgG e IgM en sueros de pacientes contra 10
- 45 patógenos humanos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de optimización de un ensayo para detectar una concentración de un analito en un líquido de muestra, usando dicho ensayo un dispositivo de ensayo que tiene una superficie, teniendo la superficie impresa sobre la misma un punto de calibración inmovilizado sitioespecífico que incluye una cantidad predeterminada del analito y un punto de ensayo que incluye un anticuerpo de captura para unir dicho analito, incluyendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
 5 modificar dicha superficie aplicando un revestimiento de epoxisilano para proporcionar sitios de unión hidrófobos, sitios de enlace hidrófilos y sitios de enlace covalentes;
 10 imprimir dichas manchas de ensayo y dichos puntos de calibración sobre dicha superficie;
 aplicar el líquido de ensayo de la muestra al dispositivo de ensayo;
 ensayar la sensibilidad del ensayo; y
 modular la relación de dichos sitios de unión hidrófobos a dichos sitios de enlace hidrófilos a dichos sitios covalentes modulando el tiempo y la temperatura de cocción del recubrimiento de epoxisilano con el fin de
 15 optimizar la sensibilidad del ensayo.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha superficie es sustancialmente plana.
3. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha superficie incluye una parte de carga para recibir la muestra y una parte de lectura para recibir dicha muestra desde la parte de carga, estando impresos los puntos de calibración y el punto de ensayo sobre dicha parte de lectura.
4. Un procedimiento según la reivindicación 2, en el que las manchas de ensayo y las manchas de calibración se imprimen en la superficie en condiciones de humedad relativa constante.
- 25 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el espesor de los puntos de ensayo y los puntos de calibración es aproximadamente el espesor de una sola capa molecular de adsorbato.
6. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que la humedad relativa constante está en el intervalo de 15% a 90%.
- 30 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la relación de las cargas de dichos sitios de unión hidrófoba a dicho sitio hidrófilo a dicho sitio covalente está en el intervalo relativo para asegurar la relación óptima de unión y adsorción del analito con unión óptima, mientras que se mantiene la fijación y función óptimas del anticuerpo marcador.
- 35 8. Un procedimiento según la reivindicación 1, para asegurar la adsorción óptima del anticuerpo de captura sin producir realineamiento estructural y espacial de la estructura del anticuerpo que inhiba la unión de anticuerpo-analito.
- 40 9. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mancha inmovilizada sitioespecífica contiene un separador molecular.
10. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el punto inmovilizado sitioespecífico presenta el analito uniformemente dispersado.
- 45 11. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el punto inmovilizado sitioespecífico presenta el analito uniformemente dispersado con impedimento estérico minimizado.
- 50 12. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el punto inmovilizado sitioespecífico incluye un tampón que modula la superficie optimizado para obtener la unión óptima del conjugado y los agregados de complejo-analito conjugado.
- 55 13. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha superficie incluye sustratos para la unión de ADN, proteínas, glicoproteínas, lipopolisacáridos, péptidos, fármacos, lecitinas y otras moléculas por los grupos funcionales amino, tiol e hidroxilo, estando activados dichos grupos por epoxisilano.
14. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha superficie incluye vidrio activado por epoxisilano para la unión covalente de ADN, proteínas, glicoproteínas, lipopolisacáridos, péptidos, fármacos,

lecitinas y otras moléculas por los grupos funcionales amino, tiol e hidroxilo.

- 5 15. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de ensayo incluye un multiplexado de matrices de puntos de ensayo en gradiente y matrices de puntos de calibración inmovilizadas.
16. Un procedimiento según la reivindicación 13, que además comprende las etapas de introducir una primera y una segunda muestra en el dispositivo de ensayo y poner en contacto dichas matrices de puntos inmovilizadas sitioespecíficas con la segunda muestra, conteniendo la segunda muestra una sustancia especificada.
- 10 17. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de ensayo se configura para un óptimo ángulo de contacto del flujo de líquido para asegurar el caudal adecuado y controlado del líquido de ensayo en el dispositivo.
- 15 18. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de ensayo se configura para asegurar la adsorción óptima del analito sin producir realineamiento estructural y espacial de la estructura del analito que inhiba la unión de anticuerpo-analito.
- 20 19. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de ensayo incluye una pluralidad de compartimentos de muestra, comprendiendo los compartimentos de muestra una estructura integral, incluyendo cada uno de los compartimentos un multiplexado de matrices de puntos de ensayo en gradiente y matrices de puntos de calibración inmovilizadas impresas en los mismos.
- 25 20. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el recubrimiento de epoxisilano está formado por una disolución de monohidrato del ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) y 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano.

FIG. 1

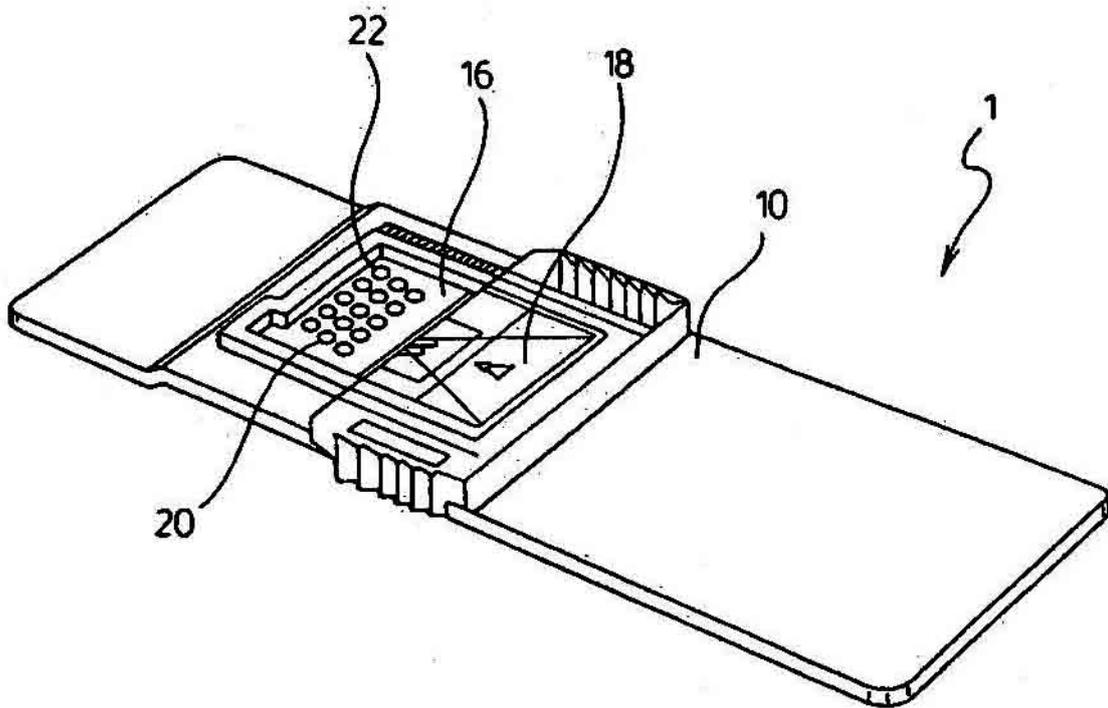


FIG. 2

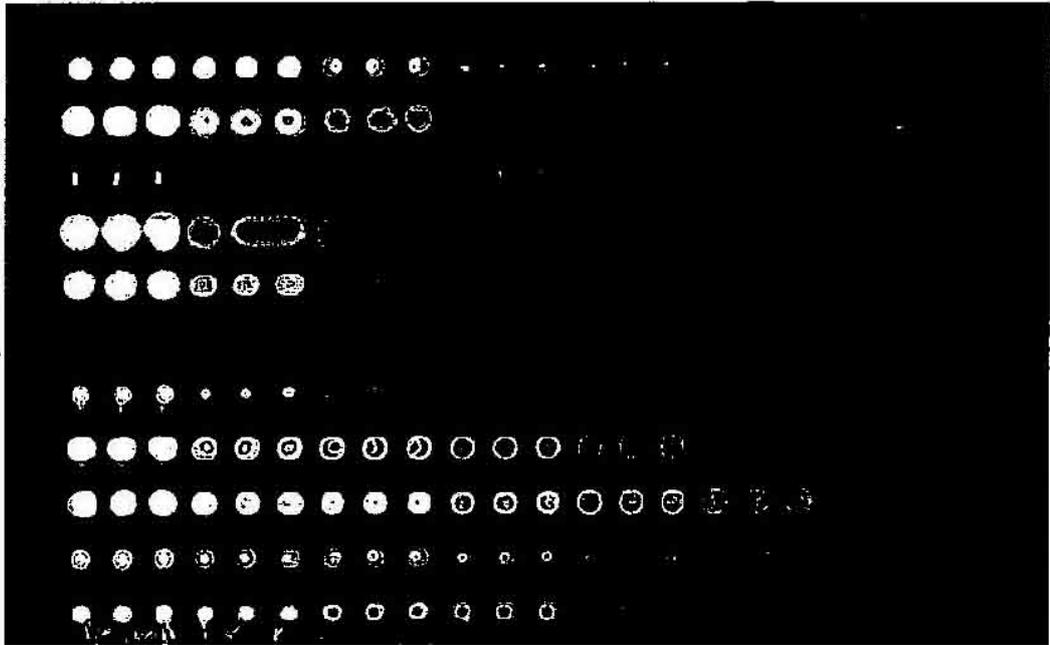


FIG. 3

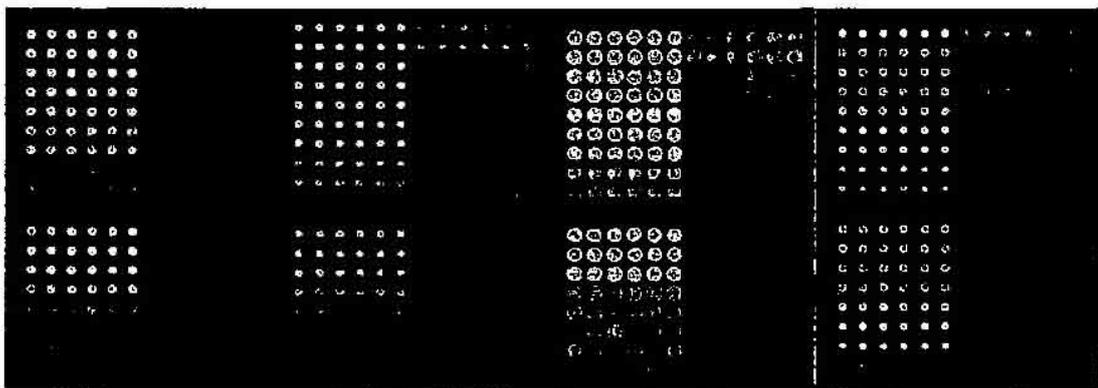


FIG. 4A

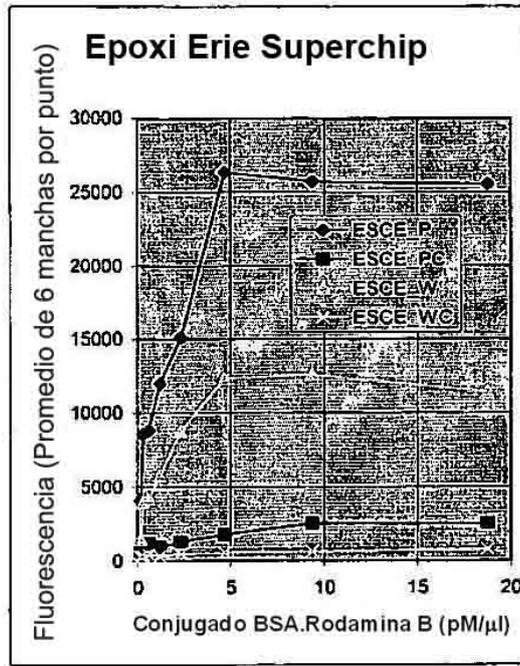


FIG. 4B

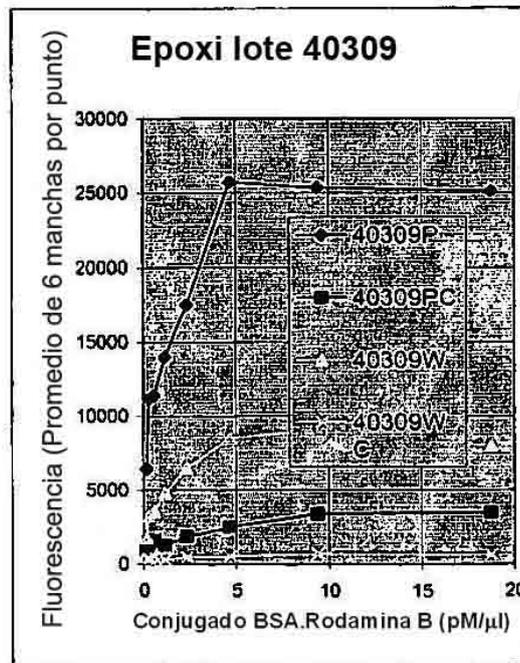


FIG. 4C

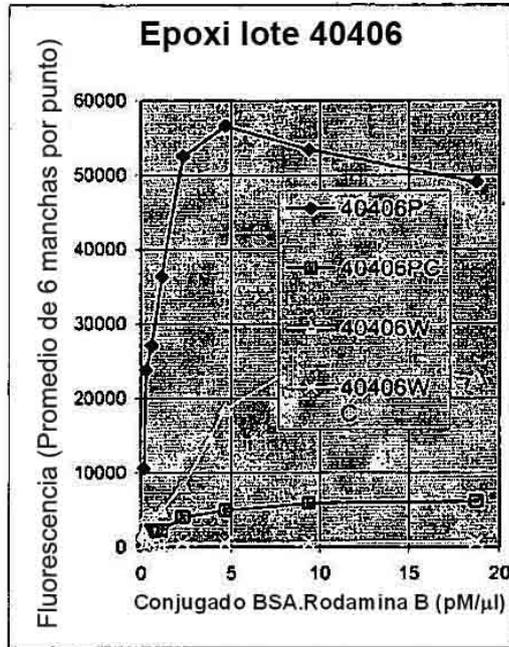


FIG. 4D

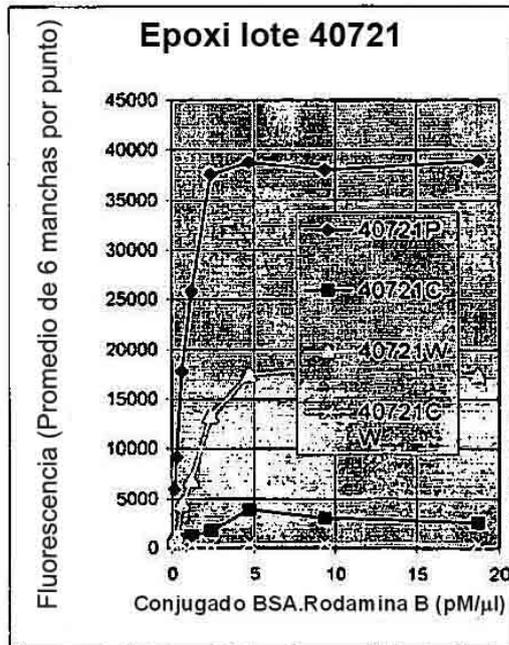


FIG. 5

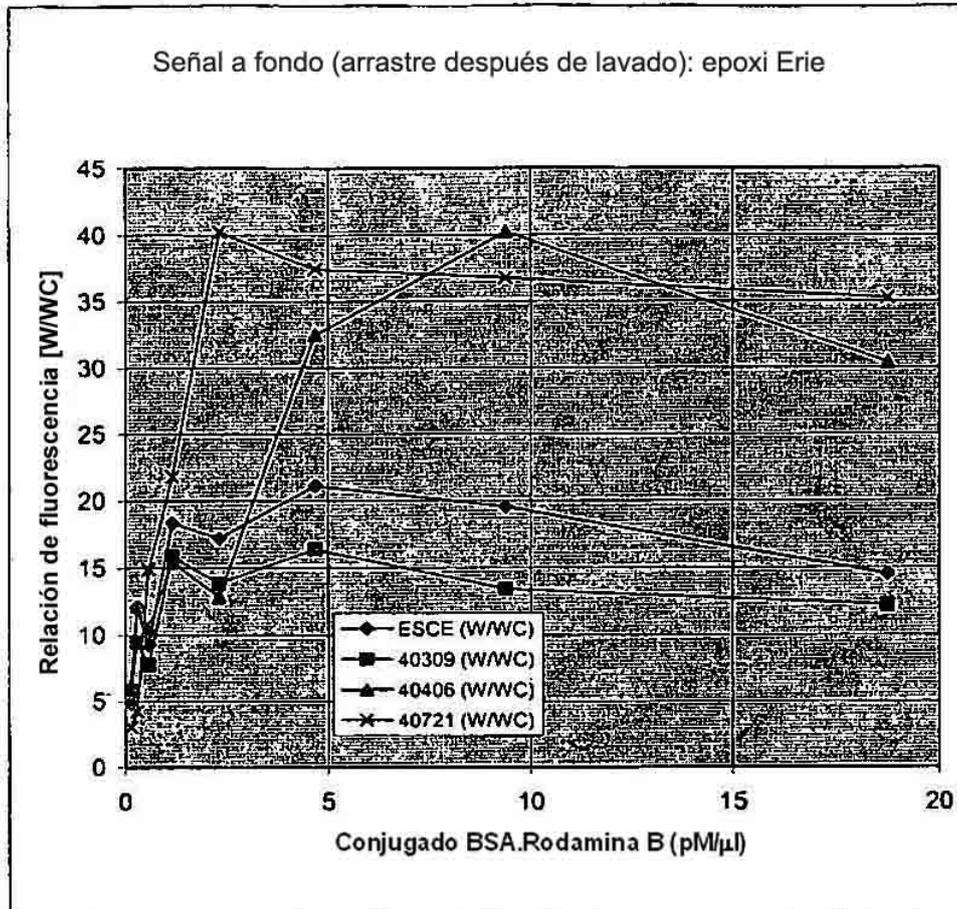


FIG. 6

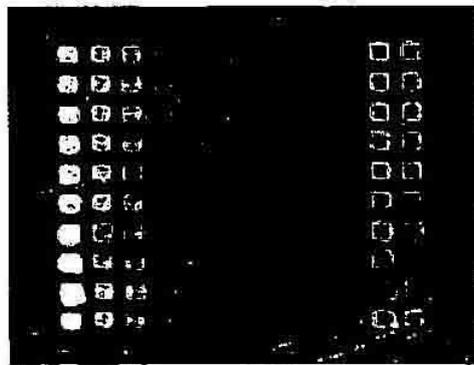


FIG. 7

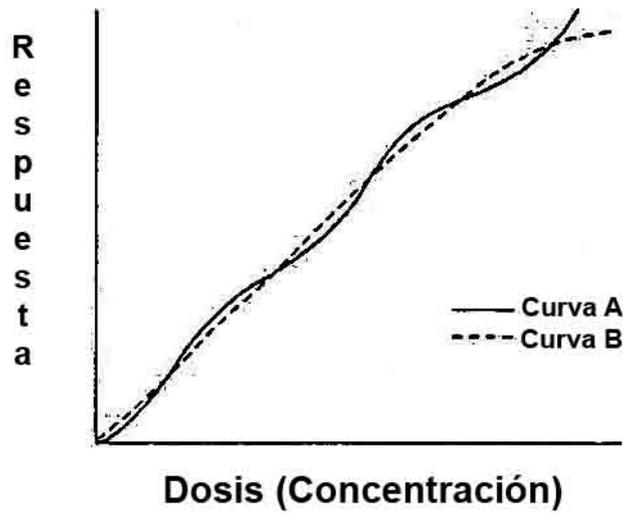


FIG. 8

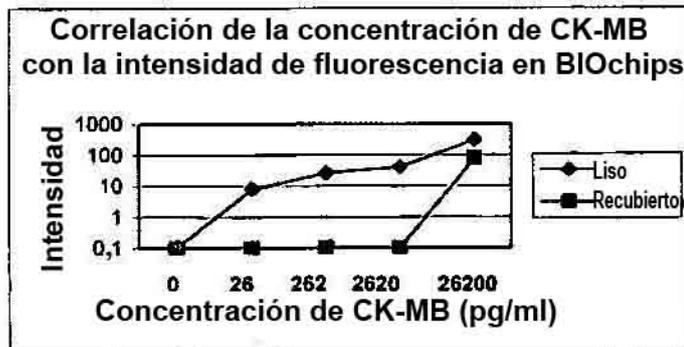


FIG. 9

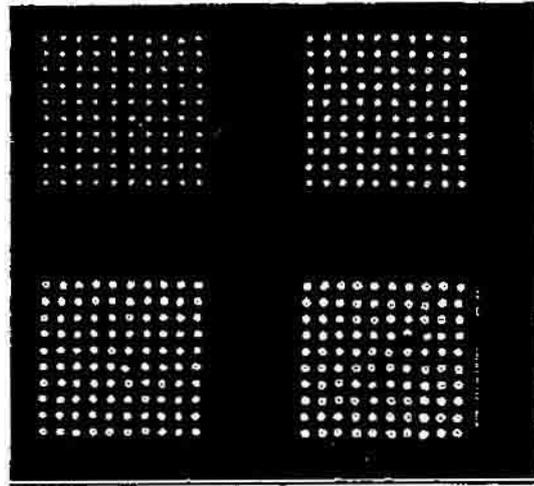


FIG. 10

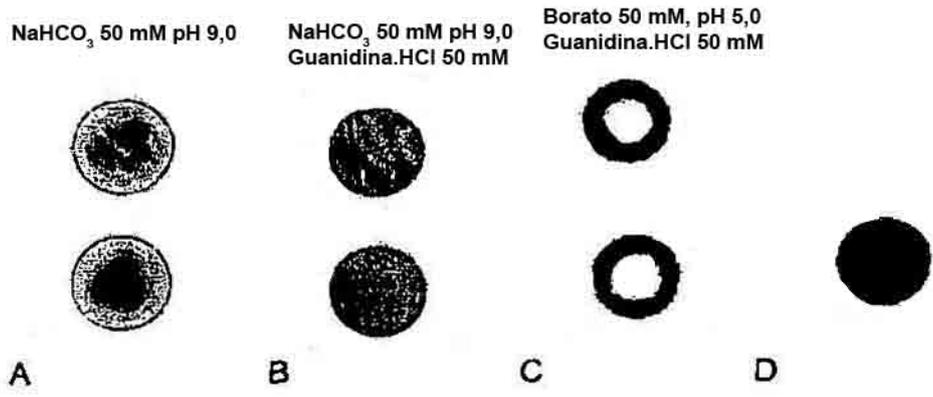


FIG. 11

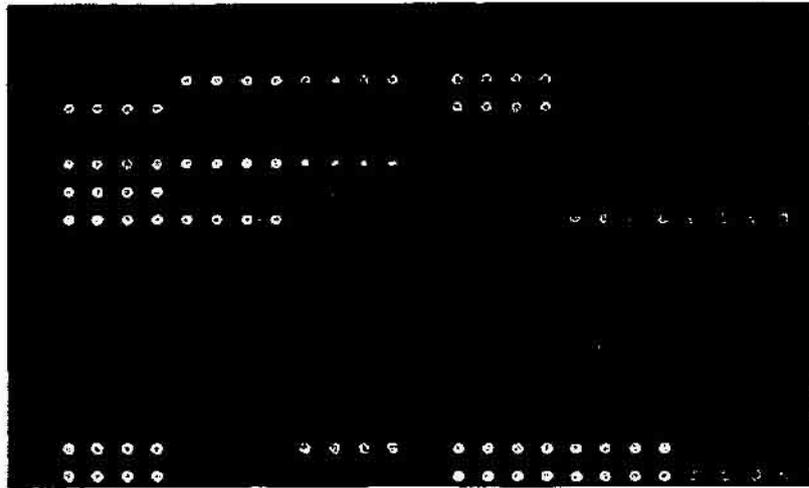


FIG. 12

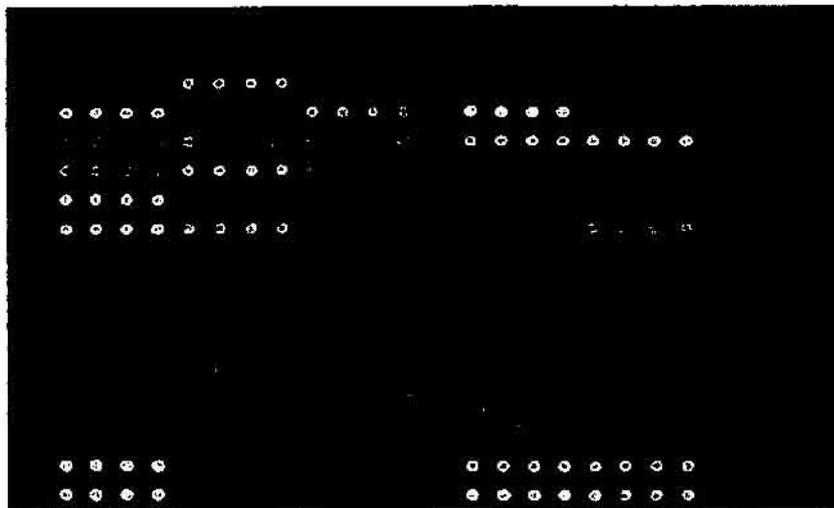


FIG. 13

