

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 766**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006 E 06794953 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 1955066**

54 Título: **Método de ensayo con membranas**

30 Prioridad:

31.10.2005 GB 0522193

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

12.05.2014

73 Titular/es:

**AXIS-SHIELD ASA (100.0%)
Postboks 6863 Rodeløkka
0504 Oslo , NO**

72 Inventor/es:

**HOLTLUND, JOSTEIN;
CAMPBELL, ANDREW y
BORCH, MORTEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 459 766 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de ensayo con membranas

5 El presente invento se refiere a unos métodos para mejorar la exactitud, la confiabilidad y/o la velocidad de unos ensayos realizados con muestras corporales. En particular, el presente invento se refiere a unos ensayos de alta velocidad realizados usando unas membranas o unos filtros con un pequeño tamaño de poros (p.ej. de menos que 1 μm), especialmente con unas muestras que contienen células o desperdicios celulares. De modo sumamente particular, el presente invento se refiere a unos métodos para mejorar los ensayos de concentración con membranas mediados por una lisis (p.ej. una lisis con detergentes) y a unos correspondientes estuches y dispositivos de ensayo.

10 Unos ensayos de diagnóstico rápido son cada vez más importantes para su uso en el sitio de los cuidados (PoC, acrónimo de point of care – p.ej. en el momento de la consulta con un profesional médico) o en unos laboratorios de diagnóstico médico pequeños o de respuesta rápida. Dichos ensayos, especialmente, para el uso en el PoC emplean típicamente por lo menos un “dispositivo”, tal como un tubo desechable, un bastoncillo, un cartucho, un rotor, etc, que contiene unos volúmenes para recibir una o varias muestras más unas trayectorias de fluidos que permiten unas interacciones específicas de la muestra con ciertas partes del dispositivo, y/u otros reactivos.

15 Las membranas, por ejemplo de nitrocelulosa, con un tamaño de poros relativamente pequeño, típicamente de 0,2-5 μm , son un componente corrientemente usado para ensayos de diagnóstico rápido (p.ej. ensayos inmunológicos). Dichas, membranas se pueden usar como la fase sólida del ensayo y se usan también para recoger micro partículas y materiales biológicos precipitados.

20 Hay dos enfoques generales que se pueden usar para el ensayo rápido de componentes en unas muestras que contienen células, tal como un ensayo de proteínas plasmáticas en la sangre; se puede o bien separar las células con respecto del fluido (p.ej. un plasma) o descomponer las células para que pasen a través de la membrana. En el método de separación, las células son retiradas o bien en un proceso realizando por separado antes de un análisis, o por uso de un filtro en el dispositivo de ensayo propiamente dicho. En el método de descomposición de células,

25 las membranas de las células (p.ej. células sanguíneas) son fragmentadas y típicamente solubilizadas, por ejemplo por uso de unos detergentes, permitiendo de esta manera que el material pase a través de los poros de la membrana.

Unos ensayos rápidos, particularmente para su uso en el sitio de los cuidados o en situaciones dinámicas de laboratorio, deberían ser limitados normalmente a un pequeño número de (preferiblemente una única) etapa(s) y a una duración de solamente unos pocos minutos. Esto hace impracticable el uso de una etapa de separación de células realizada por separado y significa que una separación de un fluido (p.ej. un plasma) o bien debe de tener lugar como una parte integrada de los sucesos dentro del dispositivo, o debe de hacer uso de unos agentes o unas condiciones de lisis, tales como unos detergentes, para descomponer y disolver las paredes de las células y las membranas nucleares con el fin de permitir que la muestra pase a través de los poros de la membrana del filtro.

30 Especialmente con unos formatos de circulación a través de membranas para ensayos cuantitativos, el método de lisis es beneficioso, puesto que resulta difícil diseñar una eficiente separación de células sanguíneas con este formato.

En unos ensayos para usarse en el sitio de los cuidados, la velocidad, la sensibilidad y la exactitud son todas ellas unos factores altamente deseables, pero en el contexto del ensayo es frecuentemente necesario hacer un “cambalache”, sacrificando una posible mejoría en uno de los factores (tal como la sensibilidad) con el fin de proporcionar un rendimiento aceptable en otro de ellos (tales como la velocidad). Tendría un gran valor el hecho de proporcionar un método mediante el cual estas propiedades pudieran ser mejoradas en común, de manera tal que el balance podría hacerse a un nivel de más alto rendimiento global.

Los formatos de ensayo de circulación a través de membranas, también denominados ensayos de concentración inmunológica, emplean unas membranas con un pequeño tamaño de poros, típicamente de 0,45 μm , a las que se fijan unos restos de fijación específica, tales como anticuerpos, receptores, fragmentos de anticuerpos, etc. Este formato exige unas muestras altamente exentas de partículas, puesto que incluso unos pequeños números de partículas, por ejemplo de desperdicios celulares con unos tamaños situados alrededor del tamaño de poros de la membrana o que lo superen, disminuyen de una manera eficiente la circulación del líquido a través de la membrana.

45 En el peor de los casos, esto puede conducir a una detención completa del transporte de líquido a través de la membrana, pero incluso una pequeña inhibición de la circulación a través de una membrana puede causar unos problemas de circulación y/o un deterioro en la confiabilidad de ensayo. Una cuestión crucial cuando se desarrollan ensayos de circulación a través de membranas es, por lo tanto, tratar a cualesquiera muestras que contengan células de una manera tal que ellas pasen a través de la membrana sin cambiar el tamaño efectivo de poros ni las propiedades de circulación de la membrana durante todo el ensayo.

50

55

Además de lo antedicho, la corrección del hematocrito es otro problema, que se plantea con los ensayos cuantitativos basados en una sangre entera, que puede ser abordado por uso de unos métodos de lisis (especialmente de lisis con detergentes). Específicamente, usando una lisis de células, una simple medición de la hemoglobina del material lisado proporciona la posibilidad de una corrección del hematocrito.

Durante la lisis (especialmente la mediada por detergentes) de una sangre entera o de otras muestras que contengan células, la meta principal es la de descomponer las membranas celulares y las membranas de los núcleos de manera tal que se permita el paso a través del dispositivo, especialmente a través de un filtro o una membrana.

- 5 Por ejemplo, los detergentes invaden a las membranas y producen micelas y complejos de proteínas y detergentes. El tamaño de las micelas es generalmente lo bastante pequeño como para hacer que ellas pasen a través de una típica membrana con un tamaño de poros de 0,45 μm . Similarmente, unos agentes de lisis caotrópicos descomponen a la estructura de las proteínas soportadas dentro de la membrana y de esta manera descomponen su estructura.
- 10 A pesar de las considerables ventajas del método de lisis (p.ej. con detergentes) en unos ensayos del tipo de membranas, muy pocos sistemas de ensayo comerciales usan este método, particularmente para sistemas de ensayo automáticos. Una razón de esto puede consistir en que un bloqueo de las membranas y una restricción de la circulación suceden algunas veces en unas circunstancias en las que se hubiera esperado una disolución completa de las membranas celulares para formar unas micelas. Con anterioridad, este comportamiento ha sido descartado como artificioso o simplemente no ha sido comprendido, puesto que se ha creído con anterioridad que el factor limitador para el transporte a través de membranas en unos ensayos de lisis es la descomposición de las membranas alrededor y dentro de las células de la muestra. En unas muestras de sangre, por ejemplo, se ha creído que una solubilización inadecuada de las membranas de las células o de las membranas de los núcleos de los leucocitos (glóbulos blancos) era la causa principal del bloqueo de las membranas.
- 15
- 20 Los presentes autores del invento han comprobado ahora inesperadamente, en contraste con el comportamiento anteriormente entendido de las muestras de células lisadas que un ácido nucleico celular, especialmente un ADN, incluso en muy pequeñas cantidades, puede causar un bloqueo determinante del caudal de las membranas y unas señales de fondo alto de ensayos.

25 En un primer aspecto, el presente invento proporciona por lo tanto un método de ensayo para una muestra de sangre entera, comprendiendo dicho método tratar a dicha muestra en unas condiciones con la que se cause una lisis de las células; y someter a la muestra lisada, generada de este modo, a unas condiciones que causan la disociación de moléculas de ácido nucleico, especialmente de moléculas de ADN. Las condiciones para causar la lisis de las células comprenden la adición de un agente de lisis de células, tal como un detergente. El método es un método de ensayo con membranas, más preferiblemente un método de ensayo de "captura con membranas" tal como se describe más adelante. El método puede comprender opcional y preferiblemente (subsiguientemente al paso de la muestra a través de la membrana) ensayar la muestra (p.ej. la parte de la muestra que ha pasado a través de la membrana o de manera preferible la parte de la muestra que ha sido retenida sobre o por la membrana) para por lo menos un componente o componente potencial en dicha muestra y/o de manera opcional y preferible relacionar el valor obtenido en el ensayo con el contenido cualitativo, semi-cuantitativo o cuantitativo del componente ensayado en la muestra corporal que contiene células, y/o de manera opcional y preferible relacionar el componente ensayado con por lo menos una condición médica o biológica.

30

35

40 La presente comprobación, hecha por los autores del invento, de que la causa del bloqueo de las membranas en los dispositivos del ensayo son unos ácidos nucleicos en vez de una solubilidad insuficiente de los componentes de lípidos, aborda la necesidad tanto de una circulación mejorada a través de unas membranas con pequeños tamaños de poros y de la disminución en la señal de fondo cuando dichas membranas se usan para concentrar unos componentes en la muestra. La circulación mejorada, a su vez, permite que los ensayos sean realizados con mayor rapidez y/o permite que un mayor volumen de la muestra sea tratado en el mismo período, permitiendo una concentración del analito a partir de un volumen mayor y una consiguiente mejoría en la sensibilidad y la exactitud.

45 En otro aspecto, el presente invento proporciona, por lo tanto, el uso de una nucleasa en un método de ensayo que comprende la circulación de una muestra corporal que contiene células lisadas a través de una membrana con un tamaño de poros no mayor que 5 μm . Este uso está destinado a mejorar el rendimiento del ensayo y puede adoptar una o más formas o puede ser un mejoramiento en el balance global de propiedades. Preferiblemente, el uso está destinado a aumentar la circulación del fluido a través de la membrana y a reducir la señal de fondo sobre la membrana y/o a aumentar la velocidad del ensayo, en un ensayo de concentración a través de membranas.

50 En todavía otro aspecto, el presente invento proporciona también un dispositivo de ensayo, tal como se expone en la reivindicación 9 adjunta.

55 En todavía otro aspecto, el presente invento proporciona un estuche como se expone en la reivindicación 13 adjunta. De manera opcional y preferible, el estuche contendrá por lo menos unos medios para la lisis de células, tales como un detergente y/o por lo menos un reactivo para el ensayo de un componente potencial de dicha muestra. De manera adicionalmente opcional y preferible, el estuche contendrá unas instrucciones para su uso en un método que comprende una lisis (p.ej. una lisis mediada por detergentes) de dichas células, seguida por una disociación de las moléculas de ácidos nucleicos que se han liberado de este modo, seguida por el paso de por lo menos una parte de la muestra resultante a través de la membrana. De manera sumamente preferible, este método es un método del invento, tal como aquí se describe.

Las condiciones para causar una disociación de las cadenas de ácidos nucleicos, como aquí se refieren, pueden ser unas condiciones físicas (tales como agitación, mezcladura, formación de torbellinos, etc.), unas condiciones radiativas (tales como un tratamiento con una radiación electromagnética, tal como una radiación de rayos ultravioletas (UV), de rayos X o de rayos γ), unas condiciones químicas (tales como el control de las condiciones de pH y/o redox) y/o unas condiciones biológicas (tales como un tratamiento con enzimas y/o una activación de enzimas endógenas que tienen propiedades de lisis de ácidos nucleicos, tales como nucleasas). Unas condiciones preferidas para causar una disociación de ácidos nucleicos son unas condiciones radiativas, químicas y biológicas, especialmente un tratamiento con por lo menos una enzima añadida y/o endógena.

Los autores del presente invento han examinado extensamente las causas del bloqueo de las membranas en unos ensayos que comprenden la circulación de unas muestras que contienen células lisadas con detergentes (especialmente unas muestras de sangre) a través de unas membranas con poros pequeños. Igual a como otras personas con experiencia en la especialidad técnica relevante, ellos partieron de la suposición de que la circulación a través de membranas era controlada por la transformación de membranas en micelas, típicamente mediada por un detergente. Resultó ser una sorpresa notable para los autores del invento el hecho de que la masa relativa muy pequeña de ADN en una muestra, especialmente en una muestra de sangre, pudiera tener cualquier efecto físico observable, especialmente en bloquear a las membranas.

Una sangre humana normal contiene aproximadamente un leucocito por cada 1.000 eritrocitos (glóbulos rojos de la sangre). Los glóbulos rojos no contienen ningún núcleo ni ADN mientras que los leucocitos (glóbulos blancos de la sangre) son nucleados y contienen ADN. Una célula típica de mamífero contiene 70 % de agua, 3 % de fosfolípidos, 1,1 % de ARN y 0,25 % de ADN, entre otros constituyentes. Una típica membrana de células de mamífero contiene aproximadamente 50 % de fosfolípidos y 50 % de proteínas fijadas a la membrana. Esto significa que las membranas celulares constituyen aproximadamente un 20 % del peso en seco de una célula de mamífero, en comparación con un 0,8 % de ADN. Observando solamente los leucocitos de la sangre, la relación másica de las membranas a los ADN es de aproximadamente 25:1, tomando en consideración a los eritrocitos con una membrana pero sin ningún ADN, la relación másica de membranas a los ADN para todas las células sanguíneas tomadas conjuntamente es probablemente de alrededor de 1.000:1.

Inicialmente, se realizaba manualmente un ensayo en el que se empleaban altas fuerzas de cizalladura. Este ensayo no mostraba problemas con bloqueo de las membranas o con señales de fondo altas. En el ensayo manual, se tomaba sangre entera desde la yema de un dedo y subsiguientemente se lisaba por dilución en un líquido que contenía el detergente desoxicolato por agitación enérgica durante algunos segundos. La sangre lisada era filtrada en la siguiente etapa a través de la membrana revestida con anticuerpos, capturando de esta manera al analito. Después de la adición de unos anticuerpos conjugados con oro, seguida por una solución de lavado, se midió una señal de color rojo desarrollada a partir de las partículas de oro.

Subsiguientemente, los autores del invento desarrollaron una versión automática del ensayo de funcionamiento manual que más arriba se ha descrito brevemente. En este ensayo instrumental, la sangre se mezcla suavemente con el líquido de dilución mediante unas bombas contenidas en el instrumento. Cuando se analizaban unas muestras de sangre con este instrumento, algunas muestras mostraban unas propiedades desusadas de circulación a través de una membrana de nitrocelulosa. En algunos casos, la circulación era lenta y en unos pocos casos la circulación del líquido a través de la membrana llegó a una detención total. Se observaba que el líquido de dilución contenía más cantidad del detergente que la que se necesitaba para una lisis completa de unas muestras de sangre que contenían un número muy alto de eritrocitos (hematocrito de 80 %). Las muestras de sangre con un caudal reducido de circulación dieron de una manera coherente una severa sobreestimación de la concentración del analito usando como referencia los resultados en plasma a partir de las mismas muestras.

Un ADN procedente del genoma humano es muy largo, llegando hasta una longitud de 5 cm, y estas hebras son muy vulnerables a las fuerzas de cizalladura. En la muestra preparada manualmente, se establecía como hipótesis que la agitación descomponía al ADN, mientras que en el caso del uso de instrumentos la muestra de sangre se mezclaba con el líquido de dilución de una manera muy suave y se preservaba la estructura del ADN, permitiendo que el ADN bloquease a la membrana. Los autores del invento prepararon unas muestras mezcladas sólo suavemente, que habían sido preparadas de un modo manual, y encontraron que también se produce el bloqueo de las membranas. Similarmente, una agitación enérgica de la muestra antes del tratamiento en el instrumento daba como resultado que el caudal de circulación se normalizase sin ningún bloqueo de la membrana, y corregía la determinación de las concentraciones de los analitos en plasma. Se encontró que unas muestras con una alta proporción de leucocitos (que contienen ADN) daban como resultado el bloqueo de las membranas con una mayor probabilidad que unas muestras normales o que unas muestras con una alta proporción de eritrocitos (que no contienen nada de ADN).

Estas observaciones consideradas en conjunto apoyaban la hipótesis de los autores del invento de que el ADN contenido en el núcleo de los leucocitos era la fuente de los problemas para la circulación. Esto fue luego verificado adicionalmente mediante unos experimentos con métodos químicos y particularmente biológicos de digestión de ácidos nucleicos. Estos experimentos indicaron también que, además de causar un bloqueo de las membranas, unas largas cadenas de un ácido nucleico podrían proporcionar también una señal de fondo muy alta en unos

ensayos de circulación a través de membranas, causando de esta manera unos resultados falsamente positivos o simplemente inexactos.

5 En el método de ensayo del presente invento, una muestra que contiene células es lisada por tratamiento en condiciones apropiadas de manera tal que se descomponen las membranas celulares y nucleares. En una forma preferida de realización, la muestra es tratada con por lo menos un detergente para proporcionar una lisis de células y membranas, seguida por una descomposición de moléculas de ácidos nucleicos.

10 El "detergente" tal como se indica aquí, puede ser cualquier molécula anfífila capaz de facilitar la conversión de membranas de fosfolípidos en unas pequeñas estructuras tales como micelas y/o vesículas capaces de pasar a través de una membrana con poros pequeños (tal como se describe aquí). Unos detergentes apropiados incluyen agentes tensioactivos catiónicos, aniónicos, iónicos híbridos y no iónicos, pero particularmente agentes tensioactivos aniónicos. Unos ejemplos particulares incluyen: unos detergentes de colatos que incluyen colato de sodio y desoxicolato de sodio (DOC); la serie de detergentes de poli(oxietileno), tales como Triton, Tween, Genapol, Lubrol, Thesit, Brij y Lubrol; y otros detergentes que incluyen dodecilsulfato de sodio (SDS), dodecil-beta-D-maltósido y octil-beta-D-glucósido, la sal de sodio de N-lauroíl-sarcosina, óxido de lauril-dimetil-amina (LDAO), bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) y la sal de sodio de bis(2-etil-hexil)sulfosuccinato de sodio. Aunque se mencionan unas sales de sodio, evidentemente serían eficaces igualmente otros metales tales como potasio, magnesio, etc. Un detergente sumamente preferible es desoxicolato de sodio.

20 Aunque el uso de detergentes es un método preferido de lisis de células para usarse en el presente invento, el invento es igualmente idóneo para su uso con muchos otros métodos de lisis de células, incluyendo una lisis hipo- o hipertónica, una lisis caotrópica, etc. Unos reactivos apropiados para su uso en dichos métodos serán conocidos para una persona con experiencia en la especialidad técnica e incluyen: agua desionizada (para una lisis hipotónica), unos agentes ajustadores de la tonicidad, tales como unas sales que incluyen sales de sodio, magnesio y potasio (p.ej. NaCl, KCl), para una lisis hipertónica; y unos agentes caotrópicos, tales como cloroformo, fenol o unas sales caotrópicas que incluyen isotiocianato de guanidinio (GuSCN) o urea.

25 Como se usa en el presente contexto, se pretende que el término "ácido nucleico" indique unas cadenas macromoleculares de ácido ribonucleico (ARN) y/o de ácido desoxirribonucleico (ADN), tanto en una forma pura como, más corrientemente, en su forma natural en un complejo con otras moléculas que incluyen unas macromoléculas tales como polipéptidos y proteínas. En particular, un ADN genómico procedente de una muestra de un mamífero existirá generalmente en forma de un complejo de nucleosomas y regiones engarzadoras, en combinación con otros factores tales como cromatina o unas proteínas asociadas. De manera preferible, el ácido nucleico que aquí se cita es un ADN y en particular un ADN genómico.

30 En todos los aspectos del presente invento, unas condiciones apropiadas para causar una disociación de ácidos nucleicos son, tal como se indica aquí con anterioridad, típicamente unas condiciones físicas, radiativas, químicas y/o biológicas. Unas condiciones preferibles son unas condiciones químicas y/o biológicas para causar una disociación de una cadena de ácido nucleico. Una disociación química de un ADN puede ser causada por cualquier reactivo apropiado, incluyendo una diversidad de agentes dañinos para el ADN bien conocidos, tales como epóxidos, iminas, ciclopropanos activados, N-óxidos heterocíclicos, quininas, etc. Preferiblemente, estas "nucleasas químicas" serán unos compuestos complejos de coordinación activos en redox, que disocian a un ADN por una ruta de oxidación. Unos ejemplos preferidos incluyen fenantrolina de cobre, seguida por un agente oxidante, unas sales de diazonio, una fotodisociación usando unos compuestos complejos metálicos y unos sistemas de compuestos ferrosos y EDTA.

35 Los métodos "biológicos" de disociación de ácidos nucleicos se pueden realizar con cualquier nucleasa apropiada, generalmente en unas condiciones suaves. Una nucleasa apropiada para su uso en el presente invento es una enzima capaz de disociar a los enlaces de fosfodiéster existentes entre las subunidades de nucleótidos de los ácidos nucleicos. Se conocen muchos tipos de nucleasas con una actividad, una dependencia con respecto a los metales y una especificidad variables, que incluyen "las enzimas de restricción" corrientemente usadas para generar unos fragmentos de ADN en unos experimentos de manipulación genética. Éstas incluyen unas nucleasas dependientes de unos iones tales como los de magnesio y calcio. Las nucleasas dependientes del calcio son un conjunto preferido para su uso en el presente invento, igual a como lo son las nucleasas dependientes del magnesio. Cualquiera de estas nucleasas es apropiada, puesto que una disociación de la cadena de ácido nucleico en unos fragmentos con una longitud incluso moderada será generalmente suficiente para permitir un paso sin restricciones de la muestra a través de la membrana.

40 Unos ejemplos corrientes de nucleasas incluyen una nucleasa micrococcal (nucleasa de S7), la nucleasa Si, una nucleasa de haba Mung, una DNasa I, la nucleasa BAL 31 Benzonase™). Una nucleasa particularmente apropiada es la nucleasa micrococcal (también denominada nucleasa de Micrococcus puesto que ella se deriva de pirógenos de Micrococcus), una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} que preferentemente disocia a un ADN dentro de la región de engarzador situada entre los nucleosomas que tienen un diámetro de 11 nm. La degradación del ADN puede ser seguida por la reducción de la viscosidad de la solución muy viscosa de ADN no disociado.

En los Ejemplos que aparecen seguidamente, se añadieron 0,1-0,5 U/ml de la nucleasa de *Micrococcus* a unas muestras sanguíneas lisadas con un detergente, en común con 1 mM de CaCl_2 e incubadas durante 30 s (segundos) antes del análisis de circulación a través de una membrana. Los caudales de circulación de líquidos y los resultados de los ensayos fueron normalizados incluso para unas muestras de sangre con unos altos cómputos (35 x 10⁹/l) de leucocitos. La omisión del Ca^{2+} dio la misma circulación lenta y las mismas determinaciones falsamente altas de los ensayos que el testigo sin ninguna nucleasa añadida.

La mayor parte de los materiales biológicos, tales como las nucleasas, son inherentemente inestables en soluciones acuosas. Por lo tanto constituye una ventaja el hecho de que las nucleasas puedan ser estabilizadas de manera tal que ellas se puedan almacenar durante largos períodos de tiempo como una parte de los dispositivos y/o estuches del presente invento. En una forma de realización del invento, las nucleasas se proporcionan por lo tanto en una forma secada, y las enzimas se secan de esta manera antes de su incorporación en un dispositivo o estuche de ensayo para diagnóstico.

Un método preferido de secar a las nucleasas consiste en usar unos métodos clásicos de desecación por congelación (liofilización), sin embargo, otros métodos para secar reactivos se podrían emplear con facilidad por parte de los que tienen experiencia en la especialidad técnica, por ejemplo una desecación por atomización o una desecación en vacío.

En una forma de realización, la nucleasa es secada en la forma de unidades de ensayo individuales, por ejemplo es secada sobre un pocillo de reacción, tal como sobre por lo menos una parte de la superficie interna de una cámara o recipiente. En una forma de realización preferida, el reactivo de nucleasa se proporciona en forma de por lo menos una partícula de reactivo (p.ej. una perla o esfera) secada (p.ej. liofilizada). Se conocen unas partículas liofilizadas esféricas a partir de la patente de Price y colaboradores (patente de los EE.UU. nº 3.655.838). Las perlas esféricas divulgadas contienen un material para reacciones inmunológicas y son citadas corrientemente como lioesferas. Se conocen lioesferas de ciertos materiales, por ejemplo, a partir de la patente de los EE.UU. nº 3.932.943, y estos métodos conocidos pueden ser aplicados con facilidad por una persona con experiencia en la especialidad técnica a las nucleasas destinadas a usarse en el presente invento. Para la producción de lioesferas, véanse por ejemplo la cita de Wiseman, William Howard, Enero de 1958, tesis (doctoral) del instituto de Química del Papel, 1958, y la patente de los EE. UU. nº 3.655.838).

Cuando se usan unos métodos de desecación, tales como una liofilización, se pueden usar unos agentes clásicos crioprotectores, lioprotectores y/o acrecentadores de la rehidratación con el fin de aumentar las propiedades del reactivo secado. Unos agentes típicos incluyen ciertas/os sales y azúcares, particularmente trehalosa, lactosa, sacarosa, prolina, manitol, rafinosa y lactato de sodio. Es particularmente eficaz la trehalosa.

El método del presente invento puede comprender adicionalmente ensayar la muestra lisada y tratada (para romper las cadenas de ácidos nucleicos) en cuanto a por lo menos un componente o componente potencial de la muestra. Unos componentes apropiados para un ensayo incluyen uno cualquiera entre una amplia variedad de marcadores biológicos, incluyendo unas moléculas pequeñas (tales como las de aminoácidos), unas vitaminas, unos oligo- y poli-péptidos (incluyendo anticuerpos, proteínas y complejos proteínicos), unas hormonas peptídicas y no peptídicas, y muchas otras sustancias. Puesto que el ensayo es generalmente un ensayo de lisis de células mediada por detergentes, se pueden ensayar también unos componentes fijados a membranas, tales como unos receptores. Unos ensayos en cuanto a proteínas, vitaminas, aminoácidos y/o cofactores en un plasma son intensificados y mejorados particularmente por el presente método. Unos ejemplos específicos incluyen la proteína C reactiva (CRP), cobalamina, transcobalamina (especialmente holo transcobalamina), homocisteína, un folato, receptores de folatos y combinaciones de los mismos. Son particularmente apropiados unos marcadores en fase aguda tales como la CRP.

La etapa opcional pero preferible de ensayar en cuanto a un componente de una muestra se puede llevar a cabo en uno cualquiera de los muchos formatos que son bien conocidos en la especialidad técnica. Presenta un beneficio particular en el presente invento, sin embargo, un ensayo en cuanto a un componente de una muestra mediante un ensayo con membranas, especialmente un ensayo de concentración con membranas. En un ensayo de este tipo, un ligando de fijación específica, tal como un anticuerpo, un receptor o un fragmento, complejo o derivado de un anticuerpo (p.ej. un anticuerpo monocatenario), es inmovilizado sobre la membrana y sirve para capturar y concentrar el analito que interesa. Este analito capturado puede ser luego detectado directamente, o, de manera más corriente, será fijado por un agente de fijación adicional (específico o no específico) (tal como un anticuerpo), que a su vez será fijado a, o conjugado con, un resto que forma señales. Dichos restos que forman señales pueden ser radiactivos, coloreados, fluorescentes, quimio- o bio-luminiscentes, o pueden ser capaces de reaccionar con, o tratar a, un substrato para generar cualquier señal detectable. Entonces el ensayo implica típicamente detectar la señal detectable y opcionalmente comparar a ésta con unos valores o patrones previamente determinados con el fin de determinar (de una manera cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa) la concentración del componente que interesa en la muestra original.

Un formato particularmente preferido del presente invento comprende poner en contacto una muestra corporal que contiene células (preferiblemente una muestra de sangre entera) con unas condiciones de lisis, tal como con un detergente (p.ej. DOC) y una "nucleasa" biológica o química (tal como una nucleasa de *Micrococcus*) en la

presencia de cualesquiera metales o cofactores necesarios (tales como Mg^{2+} o Ca^{2+}). La muestra resultante se pone luego en contacto con una membrana que tiene unos poros no mayores que $5\ \mu m$, preferiblemente no mayores que $2\ \mu m$ (p.ej. de alrededor de $0,45\ \mu m$), que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica (tal como un anticuerpo) para un componente de la muestra (tal como CRP). Una vez que la muestra ha circulado a través de la membrana, la membrana o el soporte se trata luego con otro agente de fijación adicional (tal como otro anticuerpo) para el componente de la mezcla que está fijado a un resto que genera señales (tal como un compuesto complejo de oro). El resto que genera señales es luego detectado (p.ej. por medios colorimétricos) para dar un valor o una indicación (p.ej. cualquier combinación de baja, normal, ligeramente elevada o altamente elevada) de la concentración de un componente en la muestra que contiene células. Dicho ensayo puede incluir opcionalmente una etapa adicional de averiguar el cómputo total de células o el cómputo de células en un específico tipo de células y corregir opcionalmente por, o relacionar el valor medido con, este cómputo de células. Por ejemplo, un valor del cómputo de eritrocitos (hematocrito) y, si se desea, una corrección se puede aplicar para una muestra de sangre por medición colorimétrica de la hemoglobina usando métodos clásicos.

En cualquiera de los métodos del presente invento, la disociación de ácidos nucleicos se realizará de manera preferible antes de poner en contacto la muestra con una membrana de separación, pero alternativamente puede suceder después de que la muestra haya sido aplicada a una tal membrana. En este último caso, el ácido nucleico es disociado sobre la membrana, típicamente por adición de apropiados agentes químicos o biológicos (tal como se debaten aquí) después de la aplicación de la muestra a la membrana. Alternativamente, el reactivo de disociación puede ser colocado sobre, en, alrededor de y/o cerca de la membrana. Ésta puede estar en la forma de un revestimiento o una partícula que se ha secado.

Evidentemente, se puede ensayar en cuanto a más de un componente en la muestra por previsión de más de una membrana y/o de más de un agente de fijación específica inmovilizado, con la condición de que las señales procedentes de los diferentes componentes puedan ser identificadas, p.ej. por una separación espacial (presencia sobre diferentes membranas o regiones de membranas) o por uso de unas señales diferentes y separables (p.ej. dos fluoróforos con diferentes longitudes de onda de excitación y/o emisión).

Habiendo ensayado en cuanto a por lo menos un componente de una muestra, el valor cualitativo o (semi)cuantitativo generado se puede relacionar entonces opcionalmente con una condición o enfermedad biológica específica, o se puede usar como un factor de ponderación o contributivo en el diagnóstico de una enfermedad o condición biológica. Un alto valor de CRP, por ejemplo, se puede relacionar con una inflamación aguda, con enfermedades reumáticas inflamatorias y/o con la necesidad o la eficacia de unos tratamientos para dichas condiciones.

El presente invento proporciona el uso de unas condiciones de disociación de ácidos nucleicos para reducir el bloqueo de la membrana en un método de ensayo que comprende la circulación de una muestra que contiene células lisadas por detergentes a través de una membrana con un tamaño de poros de $5\ \mu m$ o menos (de manera preferible de $2\ \mu m$ o menos). Generalmente, se facilitan dos mejoramientos relacionados entre ellos y uno cualquiera de ellos o ambos puede(n) ser importante(s) en cualquier ensayo particular. Esencialmente, la disociación de ácidos nucleicos reduce el bloqueo de las membranas y este mejoramiento tiene dos resultados principales; se intensifica la circulación del fluido a través de la membrana, y/o se reduce el atrapamiento no específico de componentes procedentes de la muestra. Cada uno de éstos tiene entonces ventajas adicionales en el hecho de que una mejor circulación proporciona unos ensayos más rápidos y/o más confiables y/o una fijación no específica reducida permite unas señales de fondo más bajas, una sensibilidad más alta y una discriminación mayor en el ensayo. Evidentemente, el "uso" proporcionado por el presente invento puede ser el uso en cualquiera de los métodos aquí descritos y puede emplear cualquiera de los reactivos químicos o biológicos u otras técnicas que se describen aquí y en cualquier otro lugar para generar unas condiciones de disociación de ácidos nucleicos. Es particularmente favorecida una disociación mediada por nucleasas.

Tal como se cita en el presente texto, las "membranas", cuando lo permite el contexto, son unas membranas porosas que tienen un tamaño de poros no mayor que $5\ \mu m$ (p.ej. de $1\ \mu m$ o menos) y de manera más preferible de $0,5\ \mu m$ o menos. Son particularmente apropiadas unas membranas con un tamaño de poros de alrededor de $0,45\ \mu m$. Aunque el tamaño mínimo de poros de la membrana está limitado solamente por los requisitos de una suficiente circulación y por la necesidad de que unos componentes apropiados pasen a través de la membrana, unos típicos tamaños mínimos de poros serán de por lo menos $50\ nm$, de manera preferible de por lo menos $100\ nm$, de manera más preferible de por lo menos $200\ nm$. El material de la membrana puede ser cualquier material que sea estable frente al paso de una apropiada muestra, que generalmente estará basada en un sistema acuoso pero puede contener disolventes añadidos cuando esto sea procedente. Unas membranas de nitrocelulosa son particularmente apropiadas, como lo son las de vidrio, polietilenos, polipropilenos, polímeros fluorados (p.ej. un PTFE o unas/os mezclas o copolímeros de PTFE), poliamidas y mezclas y copolímeros de las mismas. Es sumamente preferida una de nitrocelulosa.

Las muestras a las que aquí se hace referencia en todos los aspectos del invento son una sangre entera, con o sin aditivos para mejorar las propiedades de almacenamiento y/o reducir la coagulación. Evidentemente, dichas muestras de sangre pueden ser tratadas como sea necesario para la realización y el rendimiento del ensayo (p.ej. liberar componentes fijados libres para ensayar o extraer analitos competitivos), pero, cuando sea posible, se

deberá llevar a cabo dentro del dispositivo el número máximo de las etapas, con el fin de reducir al mínimo el tiempo y la manipulación que se requieren.

5 El dispositivo del presente invento comprende una cámara para recibir por lo menos una muestra corporal que contiene células (o de manera opcional, pero menos preferible, una muestra que contiene células lisadas con detergentes) y contiene por lo menos una membrana como aquí se ha descrito. El dispositivo, opcionalmente puede ser cargado previamente con por lo menos un agente de lisis, tal como un detergente, para proporcionar una lisis de células, o puede comprender una membrana dentro de la que se puede añadir dicho agente. La lisis de células se llevará a cabo antes del paso a través de la membrana y el dispositivo proporciona las condiciones para la disociación de ácidos nucleicos, que de manera opcional y preferible sucederá durante o inmediatamente a continuación de una lisis de células.

10 El dispositivo comprenderá de manera preferible por lo menos un reactivo biológico y/o químico para causar una disociación de ácidos nucleicos, como aquí se describe, o comprenderá una cámara para recibir la adición de dicho reactivo. El dispositivo contendrá también o recibirá preferiblemente un agente de fijación específica para concentrar por lo menos un componente de la muestra, un segundo agente de fijación (específica o no específica) para fijar al componente concentrado y al menos un resto que genera señales, para generar de esta manera una señal correspondiente a la presencia, la ausencia o la concentración del componente que interesa. Todas estas entidades se describen aquí y serán bien conocidas por los que poseen experiencia en ensayos biológicos. La membrana comprendida en el dispositivo del invento puede servir preferiblemente para inmovilizar a por lo menos un ligando de fijación específica para por lo menos un componente o posible componente de la muestra presunta. Unos agentes de fijación apropiados se describen aquí. Alternativamente, el ligando de fijación específica puede ser inmovilizado sobre un soporte, tal como una perla o partícula insoluble, que entonces es retenida por la acción de la membrana.

25 Un dispositivo preferido comprende una cámara para recibir una muestra de sangre; una cámara para recibir un diluyente que comprende un detergente (tal como DOC), una nucleasa (tal como una nucleasa de *Micrococcus*) y cualquier metal o cofactor (tal como Ca^{2+}); una membrana que tiene unos poros no mayores que $5 \mu m$, de manera preferible que $2 \mu m$ (p.ej. de alrededor de $0,45 \mu m$) y que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica (p.ej. un anticuerpo o un fragmento, una construcción artificial o un derivado de la misma) para por lo menos un analito (p.ej. CRP, holoTC, SAH); y una cámara para recibir una solución que comprende por lo menos un agente de fijación adicional y opcionalmente un resto que genera señales. El dispositivo puede comprender adicionalmente una región, una cubeta o una ventana para averiguar una señal que se genere a partir del resto que genera señales y que corresponda (directa o indirectamente) a la presencia, la ausencia o la concentración del componente que interesa.

30 En un dispositivo relacionado y todavía más preferible, este dispositivo comprende una cámara para recibir una muestra de sangre, una cámara que o bien contiene o es apropiada para recibir un detergente y una cámara que contiene una nucleasa, secada de acuerdo con métodos conocidos y/o con los métodos que aquí se describen. Éstas pueden ser tres cámaras separadas, o preferiblemente serán una o dos cámaras, por ejemplo, una que contiene el detergente y una segunda que contiene la nucleasa secada. El dispositivo contendrá y puede contener otras características como se han descrito con anterioridad.

40 Un cierto número de formatos son apropiados para el dispositivo del presente invento, incluyendo tubos, rotores, cartuchos, viales, portaobjetos, bastoncillos, etc. Muchos de dichos formatos son bien conocidos, pero la naturaleza del formato no es crítica con la condición de que se puedan proporcionar las características esenciales del dispositivo. Unos formatos de rotores y cartuchos son altamente apropiados puesto que se pueden proporcionar con facilidad las presiones destinadas a intensificar el paso de un fluido a través del dispositivo. Cualquiera de los dispositivos del invento puede comprender una región, cubeta o ventana para determinar una señal generada durante el funcionamiento del dispositivo.

45 Los estuches del presente invento comprenderán frecuentemente por lo menos un dispositivo del invento y, por lo menos, los estuches comprenderán una membrana, y unos medios para la disociación de ácidos nucleicos (tales como un reactivo químico o biológico, que incluye los que se han descrito aquí). Típicamente se proporcionará un detergente para la lisis de células y la conversión de los lípidos de la membrana en pequeñas micelas o vesículas, igual a como se pueden proporcionar unos reactivos y/o unas instrucciones para el uso del estuche en cualquiera de los métodos que aquí se describen.

Los estuches y dispositivos del presente invento serán apropiados de manera sumamente preferible para su uso en o con un equipo automático de análisis. De manera sumamente apropiada, éste será un equipo de análisis automático en el "sitio de los cuidados".

55 Un estuche preferido comprende unos medios opcionales para obtener una muestra de sangre; un recipiente para recibir dicha muestra de sangre y un diluyente que comprende un detergente (tal como DOC), una nucleasa (tal como una nucleasa de *Micrococcus*), cualquier metal o cofactor (tal como Ca^{2+}) y opcionalmente un tampón, una membrana que tiene unos poros no mayores que $2 \mu m$ (p.ej. de alrededor de $0,45 \mu m$) y que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica (p.ej. un anticuerpo o un fragmento, una construcción artificial o un

derivado de la misma) para por lo menos un analito (p.ej. CRP, holoTC, SAH); y un recipiente o una cámara para recibir una solución que comprende por lo menos un agente de fijación adicional y opcionalmente un resto que genera señales. El estuche puede comprender de manera opcional y adicional unas instrucciones para el uso, la determinación del resultado del ensayo y/o la correlación del resultado con unas condiciones biológicas.

- 5 Un estuche particularmente preferido comprende unos medios opcionales para obtener una muestra de sangre; un recipiente para recibir dicha muestra de sangre y un diluyente que comprende un detergente (tal como DOC). El recipiente, o un segundo recipiente existente en el estuche contendrá también una nucleasa en una forma secada (tal como una nucleasa de *Micrococcus*) y cualquier metal o cofactor (tal como Ca^{2+}) que sea necesario. El estuche contendrá también: una membrana que tiene unos poros no mayores que $2\ \mu\text{m}$ (p.ej. de alrededor de $0,45\ \mu\text{m}$) y que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica (p.ej. un anticuerpo o fragmento, una construcción artificial o un derivado de la misma) para lo menos un analito (p.ej. CRP, holoTC, SAH); y un recipiente o una cámara para recibir una solución que comprende por lo menos un agente de fijación adicional y opcionalmente un resto que genera señales. El estuche puede comprender de manera opcional y adicional unas instrucciones para el uso, la determinación del resultado del ensayo y/o la correlación del resultado con unas condiciones biológicas y puede contener opcionalmente también un tampón en una forma secada o en la de una solución.

El invento será ilustrado más abajo por referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Una sangre entera procedente de un donante sano se centrifugó en el medio de gradiente de densidades Polymorphprep™ (de Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega), como se ha descrito por el productor. Los leucocitos y eritrocitos totales se recogieron en dos fracciones separadas. Los leucocitos se recontaron. Se añadieron leucocitos a una sangre entera para aumentar el número de los leucocitos desde $7 \times 10^9/\text{l}$ hasta $30 \times 10^9/\text{l}$. $12,5\ \mu\text{l}$ de la sangre enriquecida se añadieron a $1\ \text{ml}$ de un líquido de dilución (desoxicolato de Na tamponado) que contenía $1\ \text{mM}$ de CaCl_2 . Esta solución se dividió en dos partes alícuotas de $500\ \mu\text{l}$, a una de las cuales se le añadieron subsiguientemente $2,5\ \mu\text{l}$ ($0,25\ \text{U}$) de una nucleasa de *Micrococcus*. Unas partes alícuotas de $50\ \mu\text{l}$ de la solución testigo y de la solución que contenía nucleasas se aplicaron a un dispositivo de circulación a través de una membrana (Nycocard Test Device) que contenía una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poros de $0,45\ \mu\text{m}$. Se aplicaron partes alícuotas a los $0\ \text{s}$, $60\ \text{s}$ y $120\ \text{s}$ después de la adición de la nucleasa. Cuando el material lisado de células sanguíneas se hubo empapado a través de la membrana en una manera de circulación a su través, se añadieron $50\ \mu\text{l}$ de un anticuerpo conjugado con oro, seguidos por $50\ \mu\text{l}$ de una solución de lavado. Debería señalarse que el anticuerpo fijado a una membrana y el anticuerpo conjugado estaban dirigidos contra diferentes proteínas, lo que significa que no se podría formar ningún emparedado, y que el experimento solamente muestra una fijación no específica de un anticuerpo conjugado con oro a la membrana. El color rojo del anticuerpo retenido sobre la membrana se midió usando un reflectómetro (lector Nycocard Reader). Este instrumento expresa la densidad del color como K/S que es proporcional a la cantidad de anticuerpo marcado con oro atrapado sobre la membrana. Una membrana de color blanco proporcionará una K/S de aproximadamente $0,05$ mientras que una de un color rojo oscuro, muy densa, proporcionará una K/S de aproximadamente 5 .

K/S después de x segundos

	Segundos	0	60	120
40	Testigo	0,71	0,89	1,24
	Nucleasa	0,154	0,123	0,136

La tabla muestra para el testigo un alto fondo no específico que aumenta durante el período de tiempo de incubación, mientras que el fondo está disminuyendo hasta un nivel bajo normal (tan bajo como para un análisis basado en un plasma) incluso con la primera parte alícuota con una incubación durante menos que 30 segundos.

45 Ejemplo 2

En este experimento, una sangre entera se enriqueció en leucocitos sin el uso de una centrifugación de un medio de gradiente de densidades como se hizo en el Ejemplo 1. Una sangre entera procedente de un donante sano se centrifugó a $2.500 \times g$ durante 15 minutos. El plasma se retiró por pipeteo y subsiguientemente el revestimiento anteadado y una parte de la fracción de eritrocitos se retiraron por pipeteo. La fracción del revestimiento anteadado contenía unos eritrocitos enriquecidos en leucocitos. Finalmente se tomaron eritrocitos puros desde el fondo del tubo. La fracción enriquecida en leucocitos y la fracción de eritrocitos se añadieron a un plasma para dar el mismo hematocrito que el de la sangre entera y los leucocitos se recontaron en la totalidad de las tres fracciones. La hemoglobina se midió por espectrofotometría en una dilución de 200 veces en un agua destilada a $575\ \text{nm}$, usando un espectrofotómetro de Shimadzu.

55

ES 2 459 766 T3

	D.O. _{575nm} *	leucocitos/l
Sangre entera	0,672	7,5 x 10 ⁹
Enriquecida en leucocitos	0,657	34 x 10 ⁹
Eritrocitos	0,690	0

5 * Densidad óptica a 575 nm

Estas tres fracciones serán denominadas seguidamente C (sangre entera), W (sangre enriquecida en leucocitos) y R (fracción de eritrocitos).

10 5 µl de C, W y R respectivamente se mezclaron suavemente con 400 µl de un líquido de dilución, y 50 µl de cada solución se aplicaron a un dispositivo de ensayo de NycoCard, seguidos por 50 µl de un anticuerpo conjugado con oro y por 50 µl de una solución de lavado. Tal como se describe en el Ejemplo 1, el anticuerpo conjugado y el anticuerpo fijado a la membrana estaban dirigidos contra diferentes proteínas. En otras palabras, este experimento muestra solamente un fondo no específico. Las diluciones lisadas de C, W y R se agitaron luego enérgicamente durante 10 segundos, y 50 µl de cada una de ellas se trataron en el dispositivo de ensayo con membranas que se ha descrito más arriba. El fondo del conjugado se midió para ambas series usando el lector NycoCard Reader.

	K/S	K/S de la muestra agitada
15 C	1,136	0,097
W	0,422	0,112
R	0,088	0,094

20 La tabla muestra que el fondo no específico se había elevado altamente en el caso de W y se había elevado ligeramente con C en comparación con el fondo obtenido con una fracción de eritrocitos puros (R). La agitación redujo el fondo de C y W hasta el mismo nivel que para R.

25 5 µl de C, W y R se mezclaron suavemente en el siguiente experimento con 400 µl de un líquido de dilución que contenía 1 mM de CaCl₂ y 0,4 U de una nucleasa de Micrococcus y se trataron en los dispositivos de ensayo tal como más arriba se ha descrito.

	K/S
C	0,12
W	0,108
R	0,094

30 Se pone de manifiesto a partir de la tabla que una digestión con nucleasas de las muestras reducía los fondos hasta un "nivel de agitación". El mismo ventajoso fondo bajo se obtuvo con la descomposición del ADN o bien con fuerzas de cizalladura o con una digestión enzimática del ADN. La agitación de las muestras digeridas con nucleasas no disminuye más aún el fondo (cosa que no se muestra)

35 Los Ejemplos 1 y 2 demostraron cómo una digestión con nucleasas de una sangre entera solubilizada con detergentes reducía el fondo no específico en el ensayo de circulación a través de la membrana hasta llegar a un bajo nivel, que es el mismo que el fondo que se obtiene con un análisis basado en un plasma. Los siguientes dos Ejemplos muestran el efecto de un tratamiento con nucleasas cuando unas muestras de sangre diluidas y lisadas fueron analizadas en cuanto a la CRP (proteína reactiva C) en el aparato analizador automático de los autores del invento, que está basado en el mismo sistema de circulación a través de una membrana que los dispositivos de ensayo que funcionan manualmente, que se han descrito en los Ejemplos 1 y 2.

40 Deberá tenerse en cuenta que este analizador mezcla de una manera muy suave el pequeño volumen de sangre entera (1,5 µl) tomado de la yema de un dedo con el líquido de dilución (200 µl). En otras palabras, unas fuerzas de cizalladura que degraden el ADN liberado de los núcleos de leucocitos lisados están ausentes o son demasiado pequeñas para actuar de una manera eficaz.

Ejemplo 3

Las muestras de sangre C, W y R descritas en el Ejemplo 2 se analizaron usando el analizador automático. La

ES 2 459 766 T3

sangre fue lisada o bien en el líquido de dilución normal o en un líquido de dilución que contiene 5 mM de CaCl₂ y 0,2 U de una nucleasa de Micrococcus.

	Líquido de dilución testigo		Líquido de dilución + nucleasa	
	CRP, mg/l	HCT %	CRP, mg/l	HCT %
Plasma	0,93		1,37	
C	2,49	42,7	1,59	43,6
W	8,8	45,0	2,70	45,0
R	1,72	43,6	1,93	46,4

5 Se pone de manifiesto a partir de la tabla que la concentración de CRP en la muestra de sangre es de aproximadamente 1 mg/l (determinaciones basadas en un plasma). Éste es un valor típico para una persona sana. Usando sangre, se debe de esperar una ligera elevación del fondo debida al color rojo de la hemoglobina. Esto significa que los valores de CRP para la muestra R (eritrocitos y no leucocitos) son la línea de base o el valor diana para la CRP. Mirando en los resultados obtenidos con el líquido de dilución testigo, se pone de manifiesto que el resultado de la CRP era aumentado por un 45 % para la sangre entera normal y por un 512 % para el preparado
10 enriquecido con leucocitos. Usando un líquido de dilución con una nucleasa, no se observó ningún aumento de la CRP con una sangre entera y se encontró un aumento de 40 % con el preparado enriquecido en leucocitos. La conclusión de ello es que la CRP era sobreestimada de una manera significativa cuando se usaba un líquido de dilución normal para diluir a la muestra W (altos cómputos de leucocitos). Parece ser que esta muestra era ligeramente sobreestimada también cuando se usaba una nucleasa. Esto indica que debería haberse usado una
15 concentración más alta de la nucleasa en este experimento. Las determinaciones del HCT (hematocrito) muestran que éstos eran similares para la totalidad de las 3 muestras.

Ejemplo 4

20 Tres muestras de sangre con una concentración de CRP en plasma baja, mediana y alta se analizaron en el instrumento. La totalidad de las tres muestras tenían altos cómputos de células. Un cómputo normal de células es de aproximadamente 7×10^9 .

Muestra	CRP, mg/l	cómputo de leucocitos
1	1,3	$29,6 \times 10^9$
2	17,2	$23,5 \times 10^9$
3	136,8	$26,6 \times 10^9$

25 Las muestras fueron analizadas usando un líquido de dilución normal o un líquido de dilución que contenía 5 mM de CaCl₂ y 0,5 U de una nucleasa de Micrococcus. Basándose en las conclusiones sacadas en el Ejemplo 3, la concentración de nucleasa era aumentada desde 0,2 (en el Ejemplo 3) hasta 0,5 U en este experimento. El coeficiente de variación (CV) se determinó también basándose en 4-6 casos paralelos. El CV no se calculó para la muestra 1 debido al muy bajo valor de CRP.

Muestra		Líquido de dilución testigo		Líquido de dilución + nucleasa	
		CRP	CV	CRP	CV
1	Plasma	1,3		1,5	
	Sangre	23,7		2,6	
2	Plasma	17,2		19,5	
	Sangre	31,8	10,2	16,3	1,7
3	Plasma	136,8		137,3	
	Sangre	160	10,1	123,7	3,0

30

La tabla pone de manifiesto que la concentración de CRP para la totalidad de las 3 muestras de sangre es sobreestimada cuando se usa el líquido de dilución normal. Cuanto más baja era la concentración de CRP, tanto peor era la discrepancia entre la determinación que usa sangre y la que usa plasma. Las determinaciones que usan plasma se consideran como el valor correcto. Es especialmente severa la discrepancia con unas muestras que contienen bajas concentraciones de CRP. Se sobreestimaron la muestra 1 en 1.800 %, la muestra 2 en 185 % y la muestra 3 en 117 %. Esto era de esperar, si suponemos la misma contribución del fondo no específico fijado con todas las 3 muestras.

Usando un líquido de dilución que contiene una nucleasa, la situación era bastante diferente. Las determinaciones de sangre entera fueron, para la totalidad de las 3 muestras, similares a los valores con plasma.

Además, el CV de las determinaciones era significativamente más bajo cuando se incluía una nucleasa en el líquido de dilución.

La conclusión fue que unas degradaciones de ADN mediadas por nucleasas de las muestras de sangre lisada proporcionaron un notable mejoramiento de calidad del ensayo automático en cuanto a CRP.

Ejemplo 5

Una sangre entera procedente de un donante sano fue tratada como se ha descrito en el Ejemplo 2. Una sangre entera (C), una sangre enriquecida en leucocitos (W) y unos leucocitos (R) mostraron el mismo hematocrito. Los cálculos de leucocitos fueron respectivamente de $5,9 \times 10^9$ y $16,9 \times 10^9$ y $0 \times 10^9/l$. Se añadieron 25 μl de una muestra de "sangre" a 400 μl de un detergente tamponado que contenía 2 mM de $MgCl_2$ con o sin 1 U de una nucleasa. La sangre se mezcló muy suavemente con la solución de lisis con el fin de reducir hasta un mínimo las fuerzas de cizalladura. 50 μl de esta solución se añadieron a un dispositivo de circulación a través de una membrana (área de la membrana 9,4 mm^2) y se tomó el tiempo de circulación. La membrana se revistió con anticuerpos anti-CRP. Subsiguientemente, se añadieron 50 μl de un anticuerpo anti-CRP conjugado con oro, seguidos por 50 μl de una solución de lavado. El color de la membrana se midió finalmente usando un reflectómetro (lector NycoCard Reader). En este Ejemplo, el color rojo en la membrana representará una verdadera señal de CRP más una cantidad mayor o menor de una señal de fondo no específica.

Muestra	Tiempo de circulación (segundos)	Color (K/S)
C	38	0,81
C + nucleasa	22	0,313
W	188	Nd**
W + nucleasa	23	0,310
R	25	0,27
R + nucleasa	23	0,306
Plasma*	24	0,322

* se usaron 15 μl de plasma para dar la misma carga de plasma que con las muestras de sangre

** El conjugado no pasa a través de membranas debido a una obstrucción. El color era rojo oscuro.

La tabla pone de manifiesto que una sangre entera (C) dio un aumento significativo en el tiempo de circulación en comparación con la muestra tratada con una nucleasa. Con la muestra W el tiempo de circulación aumentó espectacularmente (en 8 veces) y la circulación de líquido llegó a una detención completa durante la aplicación del conjugado con oro. Todas las muestras mostraron la misma buena circulación de aproximadamente 23 s cuando se añadió una nucleasa. Éste fue el mismo tiempo de circulación que con un plasma y con la fracción de eritrocitos sin ninguna nucleasa. Con respecto a la señal, una sangre entera sin ninguna nucleasa hubiera dado como resultado una sobreestimación significativa de la CRP. Con la W la circulación llegó a una detención total debida a una obstrucción de la membrana mediada por ADN.

Después de un tratamiento con una nucleasa, todas las tres muestras dieron unas señales de CRP muy similares de aproximadamente 0,31, cercanas a la señal obtenida con un plasma (0,32) que debería ser considerada como el valor diana. Esta baja señal estaba bien por encima del color obtenido con una membrana revestida con un anticuerpo irrelevante (0,093), que representa el valor de fondo que se hubiera obtenido con una muestra que no contuviese nada de CRP. Ésta es por lo tanto una señal baja pero significativa de 0,31, y es coherente con el bajo nivel de CRP de un donante de sangre sano.

Ejemplo 6

5 Cuando se analizan unos analitos de sangre en una baja concentración, es ventajoso tratar la mayor cantidad de sangre que sea posible con el fin de compensar parcialmente la baja concentración y obtener una señal legible. Este experimento se diseñó para determinar la más alta cantidad posible de sangre que se podría tratar a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (área de circulación 9,4 mm²) después de una lisis de sangre mediada por un detergente.

Debido a la gran cantidad de sangre usada en algunas partes de este experimento, se había de usar una alta concentración del detergente para asegurar que una deficiencia de detergente no fuese la razón de una mala y escasa circulación.

10 La sangre procedente de un donante sano (cómputo de leucocitos 6,5 x 10⁹/l) se diluyó con el detergente tamponado con o sin 1 U de una nucleasa y se incubó a la temperatura ambiente durante 30 s (volumen de incubación 200 µl). 100 µl de esta solución que contenía 1,5-25 µl de sangre entera se añadieron al dispositivo de circulación a través de la membrana, seguidos por 50 µl de un anticuerpo anti-CRP conjugado con oro y por 50 µl de una solución de lavado. Se midió el tiempo total del ensayo (desde el comienzo de la aplicación de una muestra hasta el final de la de una solución de lavado).

Volumen de sangre tratada (µl)	Tiempo total del ensayo (s)
25	Nd*
25 + nucleasa	189
12,5	672
12.5 + nucleasa	142
6,25	291
6,25 + nucleasa	128
3,1	264
3,1 + nucleasa	128
1,5	150
1,5 + nucleasa	120

* bloqueo de la membrana durante la aplicación de una muestra.

20 La tabla pone de manifiesto que una digestión del ADN con una nucleasa daba como resultado una circulación mejorada en todos los niveles de carga con sangre. Observando el tiempo de ensayo se manifiesta que 12,5 µl de una sangre con digestión con una nucleasa dieron aproximadamente el mismo tiempo de ensayo que 1,5 µl de una sangre sin ninguna nucleasa, lo que constituye un factor de aproximadamente 8. Observando los resultados desde otro ángulo, si pedimos que el tiempo total de ensayo para un ensayo rápido esté por debajo de 4 minutos, este sistema tolera a 1,5 µl de sangre sin ninguna nucleasa y a 25 µl de una sangre con digestión por una nucleasa, lo que constituye un factor de 16,7.

25 Hablando en un sentido amplio, una digestión del ADN mediada por una nucleasa permite que se trate una cantidad de 10 veces mayor de sangre en este dispositivo de ensayo de concentración inmunitaria.

Ejemplo 7 – Procedimiento de liofilización de una nucleasa

Se preparó Benzonase™ en una concentración de 40 U/ml en un tampón que contenía 12 % de trehalosa, 0,1 % de BSA, 1 mM de MgCl₂ y 25 mM de Tris de pH 7,4. Unas partes alícuotas de esta solución de Benzonase™ se congelaron y luego liofilizaron a -30 grados C de una manera de por sí conocida.

30 Ejemplo 8 – Uso de una nucleasa liofilizada

Unas perlas de Benzonase™ congeladas y liofilizadas (tal como se preparan en el Ejemplo 7) se colocaron en un cartucho de analizador de CRP Afinion™ y una muestra de sangre que contenía un elevado número de leucocitos se trató usando el analizador Afinion™. La actividad relativa de la Benzonase™ se calculó usando los valores normalizados de CRP y se expresó como un porcentaje.

35 Actividad relativa de una nucleasa en un ensayo de CRP con Afinion™:

A.- La Benzonase™ se resuspendió a razón de 40 U/ml en el tampón de lisis de CRP con Afinion™ durante

ES 2 459 766 T3

diversos períodos de tiempo, hasta de 18 horas a 22 grados C, antes de analizar la muestra de sangre que contenía elevados niveles de leucocitos.

Tiempo	5 min	60 min	120 min	18 horas
Actividad relativa	100 %	104 %	94 %	61 %

- 5 Se demuestra que la Benzonase™ aparece como estable en una suspensión acuosa durante por lo menos 1 día. Se observa una disminución en la actividad después de 120 min.

B.– Unas perlas de Benzonase™ congeladas y liofilizadas, preparadas como en el Ejemplo 7 y colocadas en el cartucho de CRP con Afinion™ que se ha descrito más arriba, se incubaron durante hasta 2 meses a 4, 22 o 37 grados C durante diversos períodos de tiempo, antes de analizar una muestra de sangre que contenía elevados niveles de leucocitos.

Temperatura	Día 0	1 mes	2 meses
4 °C	100	99	96
22° C	100	100	105
37°C	102	98	99

- 10 La Benzonase™ se manifiesta como estable en la forma de una perla congelada y liofilizada durante varios meses.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de ensayo con membranas para una muestra de sangre entera, comprendiendo dicho método tratar dicha muestra en unas condiciones con las que causa una lisis de células, y someter la muestra lisada generada de este modo a unas condiciones que causan la disociación de moléculas de ácidos nucleicos, y hacer pasar la muestra a través de la membrana, en donde el tamaño de poros de dicha membrana no es mayor que 5 µm y en donde además un ligando de fijación específica para un componente de la muestra está inmovilizado sobre dicha membrana.
- 10 2. El método como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la disociación de moléculas de ácidos nucleicos es proporcionada por unas condiciones físicas, unas condiciones radiativas, unas condiciones químicas y/o unas condiciones biológicas.
3. El método como se reivindica en la reivindicación 2 en donde dichas condiciones biológicas son proporcionadas por un reactivo biológico seleccionado entre una nucleasa de *Micrococcus*, una nucleasa S1, una nucleasa de haba de Mung, una DNase I, una nucleasa BAL 31 y una Benzonase™.
- 15 4. El método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3 en donde la lisis de células es una lisis con detergentes, una lisis hipotónica, una lisis hipertónica o una lisis caotrópica.
5. El método como se reivindica en la reivindicación 4 en donde dicha lisis es proporcionada por un detergente seleccionado entre agentes tensioactivos catiónicos, agentes tensioactivos aniónicos, agentes tensioactivos iónicos híbridos y agentes tensioactivos no iónicos.
- 20 6. Un uso de una nucleasa en aumentar el rendimiento de un método de ensayo que comprende la circulación de una muestra de sangre entera lisada a través de una membrana con un tamaño de poros no mayor que 5 µm, que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica para un componente de la muestra proporcionando unas condiciones de disociación de ácidos nucleicos a la muestra de sangre entera lisada.
7. El uso como se reivindica en la reivindicación 6 en un método tal como se expone en una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 5.
- 25 8. El uso como se reivindica en la reivindicación 6 o en la reivindicación 7 para conseguir por lo menos uno de los siguientes mejoramientos:
 - a) reducir el bloqueo de la membrana,
 - b) reducir el período de tiempo de ensayo
 - c) aumentar el volumen de la muestra que se puede tratar.
- 30 9. Un dispositivo de ensayo para el ensayo de la proteína reactiva C, de cobalamina, de transcobalamina, de holo-transcobalamina, de homocisteína, de un folato, y de sus combinaciones, que comprende una cámara para recibir sangre entera y por lo menos una membrana con un tamaño de poros no mayor que 5 µm, que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica para un componente de la muestra, seleccionado entre la proteína reactiva C, la cobalamina, la transcobalamina, la holo-transcobalamina, la homocisteína, un folato y sus combinaciones, en donde dicho dispositivo contiene unos reactivos químicos y/o biológicos para causar una disociación de ácidos nucleicos y en donde dicho dispositivo es apropiado para usarse en o con un equipo de análisis automático en el "sitio de los cuidados".
- 35 10. El dispositivo como se reivindica en la reivindicación 9 en donde dicho dispositivo contiene una nucleasa.
- 40 11. El dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en donde dicho dispositivo contiene un detergente.
- 45 12. Un estuche para el ensayo de una proteína reactiva C, de cobalamina, de transcobalamina, de holo-transcobalamina, de homocisteína, de un folato, y de sus combinaciones en una sangre entera, comprendiendo dicho estuche: una membrana con un tamaño de poros de no más que 5 µm, que tiene inmovilizado sobre ella un ligando de fijación específica para un componente de la muestra seleccionado entre la proteína reactiva C, la cobalamina, la transcobalamina, la holo-transcobalamina, la homocisteína, un folato y sus combinaciones; y por lo menos unos medios químicos y/o biológicos para la disociación de ácidos nucleicos.
13. El estuche como se reivindica en la reivindicación 12 que comprende un dispositivo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 9 hasta 11.