

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 004**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007 E 11169710 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2386858**

54 Título: **Sistema de alta sensibilidad y métodos de análisis de la troponina**

30 Prioridad:

04.04.2006 US 789304 P

19.04.2006 US 793664 P

26.05.2006 US 808622 P

28.11.2006 US 861498 P

04.12.2006 US 872986 P

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

03.11.2015

73 Titular/es:

**SINGULEX, INC. (50.0%)
1650 Harbor Bay Parkway
Alameda, CA 94502, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GOIX, PHILIPPE;
PUSKAS, ROBERT;
TODD, JOHN;
LIVINGSTON, RICHARD;
HELD, DOUGLAS y
WU, ALAN H.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 004 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

Sistema de alta sensibilidad y métodos de análisis de la troponina

Antecedentes de la invención

5 Cada año en los Estados Unidos, unos seis millones de personas se presentan a los servicios de urgencias con dolor torácico. Aunque sólo del 15% al 20% de estos pacientes son diagnosticados en última instancia, con un síndrome coronario agudo (ACS), aproximadamente la mitad son admitidos para su evaluación. Por el contrario, 2% de los pacientes con ACS son erróneamente dados de alta. Como los pacientes con ACS tienen un riesgo relativamente alto de eventos cardiovasculares adversos en el corto plazo, hay una clara necesidad de herramientas objetivas precisas con los cuales se puedan identificar

10 Los marcadores utilizados actualmente para el daño cardíaco sufren desventajas que limitan su utilidad clínica. Los ensayos enzimáticos cardíacos han servido de base para determinar si hay o no daño al músculo cardíaco. Desafortunadamente, el ensayo estándar de la creatina quinasa-MB (CK-MB) no es confiable en la exclusión del infarto hasta las 10 a 12 horas después de la aparición de dolor torácico. El diagnóstico precoz tendría ventajas muy específicas con respecto a la terapia fibrinolítica y determinación de prioridades.

15 Resumen de la invención

La invención provee un método para determinar la enfermedad cardiovascular en un individuo que comprende: (a) medir la concentración en suero o plasma de la troponina cardíaca a partir de una muestra de sangre del individuo; (b) comparar la concentración medida a una concentración umbral predeterminada que representa la concentración de percentil 99º de la troponina cardíaca en un grupo de individuos normales con un correspondiente coeficiente de variación (CV) de 10% o menos, en donde la concentración umbral es menos de 10 pg/mL; (c) determinar al menos uno de los siguientes en el individuo cuando la concentración de troponina cardíaca es mayor que la concentración umbral: daño cardíaco, daño miocárdico, un evento cardíaco anterior y cardiotoxicidad. La invención también provee un método para determinar la enfermedad cardiovascular en un individuo que comprende: (a) medir la concentración en suero o plasma de la troponina I cardíaca (cTnI) en una muestra de sangre del individuo; (b) comparar la concentración con una concentración umbral de 7 pg/mL, y (c) determinar al menos uno de los siguientes en el individuo cuando la concentración de cTnI es mayor que la concentración umbral: daño cardíaco, daño miocárdico, un evento cardíaco anterior, y cardiotoxicidad.

En algunos casos, la especificación provee un método para determinar la presencia o ausencia de una única molécula de troponina o un fragmento o complejo de la misma en una muestra, incluyendo i) marcar la molécula, fragmento, o complejo, si está presente, con una etiqueta; y ii) detectar la presencia o ausencia de la etiqueta, donde la detección de la presencia de la etiqueta indica la presencia de la única molécula, fragmento, o complejo de troponina en la muestra. De acuerdo con los métodos de la invención, tal como se especifica en las reivindicaciones, la troponina es una isoforma cardíaca de la troponina. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, tal como se especifica en las reivindicaciones, la troponina puede ser troponina I cardíaca (cTnI) o troponina C cardíaca (cTnC). En algunas realizaciones de los métodos de la invención, como se especifica en las reivindicaciones, la troponina es cTnI. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, una única molécula de troponina se puede detectar a un límite de detección de menos de aproximadamente 100 pg/mL. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, una única molécula de troponina se puede detectar a un nivel de detección de menos de aproximadamente 20 pg/mL. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etiqueta incluye una unidad estructural fluorescente. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y donde la energía total dirigida en el punto por el láser no es más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual, el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente incluye un colorante. Ejemplos de colorantes incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 y Alexa Fluor 700. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente incluye Alexa Fluor 647. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etiqueta incluye además un asociado de unión de la molécula de troponina, fragmento, o complejo. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el asociado de unión incluye un anticuerpo específico para la molécula de troponina, fragmento, o complejo. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo es específico para una región específica de la molécula de troponina. En algunos casos de los métodos descritos en este

documento, el anticuerpo es específico para una región que comprende los aminoácidos desde 27-41 de la troponina I cardiaca. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, los métodos incluyen además la captura de troponina o complejo de troponina sobre un soporte sólido. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el soporte sólido puede ser una placa de microtitulación o perlas paramagnéticas. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el soporte sólido incluye un asociado de captura específico para la troponina o el complejo de troponina que está unido al soporte sólido. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión del asociado de captura con el soporte sólido es no covalente. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión del asociado de captura con el soporte sólido es covalente. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión covalente del asociado de captura es tal que el asociado de captura está unido al soporte sólido en una orientación específica. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la orientación específica sirve para maximizar la unión específica de la troponina o el complejo de troponina con el asociado de captura. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el asociado de captura comprende un anticuerpo. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 87-91 de la troponina I cardiaca. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 41-49 de la troponina I cardiaca. De acuerdo con la invención, la muestra es una muestra de sangre, suero o de plasma. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, la muestra es una muestra de suero. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etiqueta incluye una unidad estructural fluorescente, y la etapa ii) incluye hacer pasar la etiqueta por medio de un detector de una única molécula. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el detector de una única molécula incluye: a) una fuente de radiación electromagnética para estimular la unidad estructural fluorescente; b) una celda de flujo capilar para pasar la unidad estructural fluorescente; c) una fuente de fuerza motriz para mover la unidad estructural fluorescente en la celda de flujo capilar; d) un espacio de interrogación definida dentro de la celda de flujo capilar para recibir la radiación electromagnética emitida desde la fuente electromagnética; e) un detector de radiación electromagnética operativamente conectado al espacio de interrogación para medir una característica electromagnética de la unidad estructural fluorescente estimulada; y f) una lente del objetivo del microscopio situada entre el espacio de interrogación y el detector, donde la lente es una lente de alta abertura numérica.

En algunos casos, la especificación describe un método para determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en un individuo que incluye: i) determinar una concentración de troponina cardiaca en una muestra o determinar las concentraciones de troponina cardiaca en una serie de las muestras procedentes del individuo, donde la concentración se determina mediante un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en la muestra de menos de aproximadamente 50 pg/mL; y ii) determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en el individuo, basado en la concentración en la muestra, o en las concentraciones en la serie de muestras. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etapa ii) incluye un análisis tal como comparando la concentración o la serie de concentraciones con un valor normal para la concentración, comparando la concentración o la serie de concentraciones con un nivel de umbral predeterminado, comparando la concentración o series de las concentraciones con un valor de referencia, y determinar una velocidad de cambio de la concentración para la serie de concentraciones. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etapa ii) incluye comparar la concentración de troponina en la muestra con una concentración umbral predeterminada, y determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento si la concentración de la muestra es mayor que el nivel umbral. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la concentración umbral se determina por la determinación de una concentración del percentil 99º de la troponina en un grupo de individuos normales, y el establecimiento de la concentración umbral en la concentración de percentil 99º. En algunas realizaciones que caen dentro del alcance de los métodos de la invención tal como se especifica en las reivindicaciones, se toma al menos una muestra durante o después de una prueba de esfuerzo cardiaco. En algunas realizaciones de los métodos de la invención como se especifica en las reivindicaciones, la troponina cardiaca se selecciona del grupo que consiste en troponina I cardiaca y la troponina T cardiaca. En algunas realizaciones de los métodos de la invención como se especifica en las reivindicaciones, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la concentración de troponina cardiaca es una concentración de la troponina cardiaca total. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la concentración de troponina cardiaca es una concentración de un complejo de troponina cardiaca, fragmento de troponina cardiaca, la troponina cardiaca fosforilada, la troponina cardiaca oxidada, o una combinación de los mismos. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la concentración de troponina cardiaca se compara con la troponina cardiaca total. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el diagnóstico, el pronóstico, o método de tratamiento es un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento del infarto de miocardio. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el diagnóstico, el pronóstico, o método de tratamiento comprende la estratificación del riesgo para el nivel de riesgo del infarto de miocardio. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la concentración o la serie de concentraciones se determina en o cerca del momento que el individuo se presenta a un profesional de la salud con uno o más síntomas indicativos de isquemia miocárdica o infarto o la posibilidad del mismo. En algunos casos, el o los síntomas pueden ser dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, los niveles de enzimas

anormales, o falta de aire. En algunos casos, la concentración se determina por un método que incluye la detección de moléculas únicas de troponina o complejos, o fragmentos de la misma. En algunos casos, los métodos descritos en este documento implican la marcación de la troponina o un complejo de troponina con una etiqueta que comprende una unidad estructural fluorescente. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser en la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente incluye un colorante seleccionado del grupo que consiste en Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 700. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unidad estructural fluorescente comprende Alexa Fluor 647. En algunos casos las realizaciones de los métodos descritos en este documento, la etiqueta comprende además un asociado de unión para la troponina. En algunos casos, el asociado de unión comprende un anticuerpo específico para la troponina. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, los métodos incluyen además la captura de troponina o complejo de troponina sobre un soporte sólido. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el soporte sólido puede ser una placa de microtitulación o perlas paramagnéticas. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el soporte sólido incluye un asociado de captura específico para la troponina o el complejo de troponina que está unido al soporte sólido. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión del asociado de captura con el soporte sólido es no covalente. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión del asociado de captura con el soporte sólido es covalente. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la unión covalente del asociado de captura es tal que el asociado de captura está unido al soporte sólido en una orientación específica. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la orientación específica sirve para maximizar la unión específica de la troponina o el complejo de troponina con el asociado de captura. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la etapa i) implica además la evaluación de otro indicador para el individuo., y la etapa ii) implica determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en el individuo, basado en la concentración de troponina y la evaluación del otro indicador del marcador no-troponina en la muestra, o en las concentraciones en la serie de muestras. En algunos casos, el otro indicador es un indicador clínico de infarto o isquemia miocárdica. En algunos casos, el otro indicador es la concentración de uno o más marcadores no-troponina en la muestra o la serie de muestras. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, el uno o más marcadores son marcadores de isquemia cardiaca, o marcadores de inflamación y de inestabilidad de la placa. En algunos casos, el uno o más marcadores de isquemia cardiaca pueden ser creatina quinasa (CK) y su banda miocárdica (MB) de la unidad estructural miocárdica CK, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (LDH), α -hidroxibutirato deshidrogenasa, la mioglobina, el glutamato oxaloacetato transaminasa, glucógeno fosforilasa BB, ácidos grasos libres no unidos, proteína de unión a ácidos grasos de corazón (H-FABP), albúmina modificada por isquemia, miosina de cadena ligera 1, o miosina de cadena ligera 2. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, los uno o más marcadores incluyen uno o más marcadores específicos de daño miocárdico. En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el diagnóstico, el pronóstico, o método de tratamiento es un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento de una condición que no es infarto de miocardio. En algunas realizaciones, la condición es la toxicidad cardiaca. En algunas realizaciones, la toxicidad cardiaca se asocia con la administración de un fármaco para el individuo. En algunos casos de los métodos descritos en este documento, la condición se selecciona del grupo que consiste en fiebre reumática aguda, amiloidosis, trauma cardiaco (incluyendo contusión, ablación, ritmo, coacción, cardioversión, cateterización y cirugía cardiaca), lesión por reperfusión, insuficiencia cardiaca congestiva, insuficiencia renal en fase terminal, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (enfermedad de Pompe), trasplante de corazón, hemoglobinopatía con hemosiderosis transfusional, hipertensión, incluyendo la hipertensión gestacional, hipotensión, a menudo con arritmias, hipotiroidismo, miocarditis, pericarditis, la cirugía no cardiaca post-operatoria, embolia pulmonar, y la sepsis.

50 La especificación también describe las composiciones.

En algunos casos la especificación describe una composición para la detección de una isoforma de troponina incluyendo un asociado de unión con la isoforma de troponina unida a una unidad estructural fluorescente, donde la unidad estructural fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios . En algunos casos de las composiciones, el asociado de unión comprende un anticuerpo para la isoforma de troponina. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, la isoforma de troponina es una isoforma cardiaca. En algunos casos, la isoforma cardiaca se selecciona del grupo que consiste de cTnI y cTnT. En algunos casos, la isoforma cardiaca es cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de la molécula de troponina. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región que

5 comprende los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca. En algunos casos de las composiciones, la unidad estructural fluorescente comprende una molécula que comprende al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente incluye un colorante que puede ser Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 700. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende Alexa Fluor 647.

Se describe en este documento una composición que comprende un conjunto de estándares para determinar una concentración de una troponina cardiaca, donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardiaca de menos de aproximadamente 10 pg/mL.

10 Se describe en este documento un kit que contiene una composición que incluye un anticuerpo para la troponina cardiaca unido a una unidad estructural de colorante fluorescente, donde la unidad estructural es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de
15 aproximadamente 3 microjulios, donde la composición se envasa en un embalaje apropiado. En algunos casos de los kits, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca o la troponina T cardiaca. En algunos casos, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además las instrucciones. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además una composición que contiene un anticuerpo de captura para la troponina I cardiaca unido a un soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido comprende una placa de microtitulación o micropartículas
20 paramagnéticas. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además un componente seleccionado del grupo que consiste en solución reguladora de lavado, solución reguladora de ensayo, solución reguladora de elución, y el diluyente del calibrador. Algunos casos de los kits incluyen además un estándar para la troponina cardiaca.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Figuras 1A y 1B. Diagrama esquemático de la configuración de los componentes de un analizador de partícula única. La figura 3A muestra un analizador que incluye una fuente electromagnética y un detector electromagnético; La figura 3B muestra un analizador que incluye dos fuentes electromagnéticas y un detector electromagnético.

Figuras 2A y 2B. Diagramas esquemáticos de una celda de flujo capilar para un analizador de partícula única. La figura 4A muestra la celda de flujo de un analizador que incluye una fuente electromagnética; y la figura 4B muestra la celda de flujo de un analizador que incluye dos fuentes electromagnéticas.

30 Figuras 3A y 3B. Diagramas esquemáticos que muestran el posicionamiento convencional (A) y confocal (B) de la óptica del detector y el láser de un analizador de partícula única. La figura 3A muestra la configuración de un analizador que tiene una fuente electromagnética y un detector electromagnético; La figura 3B muestra la configuración de un analizador que tiene dos fuentes electromagnéticas y dos detectores electromagnéticos.

Figura 4. Curva estándar linealizada para el rango de las concentraciones de cTnI.

35 Figura 5. Umbral biológico (concentración de corte) para cTnI está en una concentración de cTnI de 7pg/mL, según lo establecido en el percentil 99º con un CV correspondiente del 10%.

Figura 6. Correlación de los resultados del ensayo de cTnI determinado utilizando el sistema de análisis de la especificación con las mediciones estándar proporcionadas por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (R2 = 0.9999).

40 Figura 7. Detección de cTnI en muestras de suero de serie de pacientes que se presentaron en la sala de urgencias con dolor torácico. Las mediciones realizadas con el sistema de análisis de la especificación se compararon con las mediciones realizadas con un ensayo disponible comercialmente.

Figura 8. Distribución de las concentraciones biológicas normales de cTnI (No isquemia) y las concentraciones de cTnI en muestras de suero de pacientes con dolor torácico.

45 Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone las realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos de los cuales:

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Resumen

- I. Introducción
- II. Troponina cardiaca
- III. Etiquetas para la troponina cardiaca
- 5 A. Asociados de unión para troponina
 - 1. Anticuerpos
 - 2. Anticuerpos de reacción con cruzamiento
- B. Unidades estructurales fluorescentes para ser utilizadas con asociados de unión
 - 1. Colorantes
 - 10 2. Puntos cuánticos
- C. Composiciones asociado de enlace-unidad estructural fluorescente
- IV. Análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca
 - A. Muestra
 - B. Preparación de la muestra
 - 15 C. Detección de la troponina y determinación de la concentración
- V. Instrumentos y sistemas apropiados para el análisis de alta sensibilidad de troponina
 - A. Aparato/Sistema
 - B. Analizador de partículas únicas
 - 1. Fuente de radiación electromagnética
 - 20 2. Celda de flujo capilar
 - 3. Fuerza motriz
 - 4. Detectores
 - C. Sistema de muestreo
 - D. Sistema de preparación de la muestra
 - 25 E. Recuperación de la muestra
- VI. Métodos que utilizan el análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca
 - A. Muestras
 - B. Determinación de diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento
 - 1. Infarto agudo de miocardio
 - 30 2. Condiciones distintas de AMI
 - a. Toxicidad cardiaca
 - C. Métodos comerciales

VII. Composiciones

VIII. Kits

I. Introducción

5 La memoria descriptiva describe composiciones y métodos para la detección altamente sensible de la troponina, por ejemplo, la troponina cardiaca. La liberación en la sangre de las isoformas cardiacas de troponina, que son únicas para el músculo cardiaco (troponina I y/o T cardiaca) es indicativa del daño al músculo cardiaco, y provee la base para su uso como marcadores de diagnóstico o pronóstico, o para ayudar en la determinación del tratamiento.

10 El complejo de troponina en el músculo se compone de troponina I, C y T. La troponina C existe como dos isoformas, una del músculo cardiaco y de contracción lenta y uno de los músculos de contracción rápida; porque se encuentra prácticamente en todos los músculos estriados, su uso como un marcador específico es limitado. Por el contrario, la troponina I y T se expresan como diferentes isoformas en músculo de contracción lenta, contracción rápida y cardiaco. Las isoformas cardiacas únicas de la troponina I y T les permiten distinguirse inmunológicamente de las otras troponinas del músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en la sangre de troponina I y T cardiaca es indicativa de daño al músculo cardiaco, y provee la base para su uso como marcadores de diagnóstico o pronóstico, o para ayudar en la determinación del tratamiento.

15 Los marcadores utilizados actualmente para el daño cardiaco sufren desventajas que limitan su utilidad clínica. Ensayos enzimáticos cardiacos han servido de base para determinar si hay o no daño al músculo cardiaco. Desafortunadamente, el ensayo estándar de la creatina quinasa-MB (CK-MB) no es confiable en la exclusión de infarto hasta las 10 a 12 horas después de la aparición de dolor torácico. El diagnóstico precoz tendría ventajas muy específicas con respecto a la terapia fibrinolítica y la determinación de prioridades.

20 Debido a que el nivel de troponina encontrado en la circulación de los individuos sanos es muy bajo, y las troponinas cardiacas específicas no proceden de fuentes extra-cardiacas, las troponinas son marcadores muy sensibles y específicos de lesión cardiaca. Además del infarto de corazón, un número de otras condiciones puede causar daño al músculo del corazón, y la detección precoz de tales daños resultaría útil para los clínicos. Sin embargo, los métodos actuales de detección y cuantificación de la troponina cardiaca no poseen suficiente sensibilidad para detectar la liberación de troponina cardiaca en la sangre, hasta que los niveles hayan alcanzado las concentraciones anormalmente altas, por ejemplo, 0.1 ng/mL o mayor.

25 Los métodos y composiciones descritos en este documento incluyen de esta manera métodos y composiciones para la detección altamente sensible y cuantificación de la troponina cardiaca, y composiciones y métodos para el diagnóstico, pronóstico y/o determinación del tratamiento basado en dicha detección y cuantificación altamente sensible.

II. Troponina cardiaca

30 Cuando las dos formas únicas de troponina cardiaca, la troponina I cardiaca (cTnI) y la troponina cardiaca (cTnT) son liberadas en la sangre a partir del músculo cardiaco, pueden existir varias especies de cada una en la sangre. Estas incluyen varios complejos de las dos formas, entre sí y/o con la troponina C cardiaca (cTnC). Además, las dos formas están sujetas a la degradación proteolítica prácticamente inmediata, resultando en una variedad de fragmentos. También, pueden existir diversas formas fosforiladas y oxidadas de las troponinas en la sangre. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,991,907. A menos que se especifique lo contrario, "troponina cardiaca", como se usa en este documento, abarca todas las formas de troponina cardiaca, incluyendo

35 En algunos casos, la especificación describe métodos y composiciones para la detección y/o determinación de la concentración de troponina cardiaca total, i.e., la suma de la totalidad o una parte sustancial de la troponina cardiaca en una muestra, por ejemplo, muestra de sangre, suero o plasma, si está libre, en complejo, un fragmento proteolítico, fosforilado, oxidado, o modificado de otro modo. En algunas realizaciones de la invención como se especifica en las reivindicaciones, la troponina cardiaca es cTnI, en otras, es cTnT, y, en incluso otras realizaciones de la invención como se especifica en las reivindicaciones, la troponina cardiaca es cTnI y cTnT. Será apreciado que una medición total absoluta no tiene por qué ser alcanzada, siempre y cuando una relación constante del total se determina, que puede ser comparado con los valores estándar. También se apreciará que si una forma de troponina es un constituyente menor de los niveles totales, bajos o ausencia de detección de esa forma no afectará apreciablemente las medidas de troponina total. Por lo tanto, como se usa en este documento, la "troponina cardiaca total" se refiere a una medición que está destinada a medir todas o sustancialmente todas las formas de una troponina cardiaca particular, por ejemplo, toda la cTnI, o toda la cTnT, en una muestra, donde la consistencia muestra-a-muestra es tal que las conclusiones clínicamente relevantes se pueden extraer de las comparaciones de las muestras con estándares, o la comparación de una muestra con otra.

En algunos casos, la memoria descriptiva describe métodos y composiciones para la detección y/o determinación de la concentración de una o más de las diversas formas de troponina en la muestra como una entidad separada, por ejemplo, cTnI en complejo, cTnI libre, cTnI turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada), o cTnT en complejo, cTnT libre, cTnT turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada), y, por lo general, puede proporcionar una concentración de esa forma en la muestra. En estos últimos casos, relaciones o valores absolutos se pueden determinar por las diferentes entidades. Por lo tanto, en algunos casos, la especificación describe métodos de detección y, por lo general, determinando la concentración de, una o más formas de troponina en complejo, o uno o más fragmentos de la troponina, o una o más formas oxidadas o fosforiladas de troponina. En algunos casos, se detecta más de una forma, y las concentraciones de las diversas formas se pueden determinar por ejemplo, mediante la realización de ensayos multiplexados en una sola muestra para las diferentes entidades, o mediante la realización de ensayos separados en alícuotas a partir de las mismas o muestras similares. Se pueden obtener las relaciones de las concentraciones de las diversas formas. Por ejemplo, una relación de la concentración de una forma particular, por ejemplo, se puede determinar, un fragmento, complejo, o forma modificada, de la troponina cardíaca con la concentración de la troponina cardíaca total. Estas relaciones y/o valores absolutos pueden proporcionar información clínica significativa. Por ejemplo la relación relativa de fragmentos de la troponina cardíaca puede indicar el tiempo transcurrido desde la liberación en la sangre y por lo tanto, indirectamente, la duración de tiempo desde, por ejemplo, un infarto de miocardio. Véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 6,991,907.

III. Etiquetas para la troponina cardíaca

En algunos casos, la especificación describe los métodos y composiciones que incluyen etiquetas para la detección altamente sensible y la cuantificación de la troponina cardíaca.

Un experto en el arte reconocerá que muchas de las estrategias se pueden utilizar para moléculas diana etiquetadas para permitir su detección o discriminación en una mezcla de partículas. Las etiquetas se pueden unir por cualquier medio conocido, incluyendo métodos que utilizan las interacciones no específicas o específicas de la etiqueta y diana. Las etiquetas pueden proporcionar una señal detectable o afectar a la movilidad de la partícula en un campo eléctrico. Además, la marcación se puede llevar a cabo directamente o a través de asociados de unión.

En algunos casos, la etiqueta comprende un asociado de unión con la troponina unida a una unidad estructural fluorescente.

A. Asociados de unión para la troponina

Se puede utilizar cualquier asociado de unión apropiado con la especificidad requerida para que la forma de troponina cardíaca sea detectada. Por ejemplo, se puede utilizar un asociado de unión específico para todas o sustancialmente todas las formas de cTnI o se puede utilizar un asociado de unión específico para todas o sustancialmente todas las formas de cTnT; por lo general, tales asociados de unión se unen a una región de la troponina cardíaca que es común a todas o la mayoría de las diferentes formas probables que se encuentren en una muestra. En algunos casos, se puede utilizar un asociado de unión específico a una o más particulares formas de troponina cardíaca, por ejemplo, un asociado de unión a una cTnI en complejo, cTnI libre, cTnI enturbiado (por ejemplo, oxidada o fosforilada), o cTnT en complejo, cTnT libre, cTnT turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada). Los asociados de unión son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aptámeros, lectinas, y los receptores. Un tipo útil y versátil del asociado de unión es un anticuerpo.

1. Anticuerpos

En algunos casos, el asociado de unión es un anticuerpo específico para la troponina cardíaca. El término "anticuerpo", como se usa en este documento, es un término amplio y se usa en su sentido ordinario, incluyendo, sin limitación, para referirse a anticuerpos de origen natural así como anticuerpos de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos bifuncionales, quiméricos y humanizados, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo es específico para cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es específico para cTnT. En algunos casos, la etiqueta incluye anticuerpos tanto para cTnI como para cTnT. El anticuerpo puede ser específico para todas o sustancialmente todas las formas de la troponina cardíaca; por ejemplo, todas o sustancialmente todas las formas de cTnI, o todas o sustancialmente todas las formas de cTnT. En algunos casos, se puede usar un anticuerpo específico para una o más formas particulares de troponina cardíaca, por ejemplo, un asociado de unión para una cTnI en complejo, cTnI libre, cTnI turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada), o cTnT en complejo, cTnT libre, cTnT turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada). Las mezclas de anticuerpos también están abarcadas por la especificación, por ejemplo, las mezclas de anticuerpos para cTnI y cTnT, o mezclas de anticuerpos para las diversas formas de la troponina (libres, en complejo, etc.), o mezclas de las mezclas.

Se apreciará que la elección del epítipo o región de troponina a la que se eleva el anticuerpo determinará su especificidad, por ejemplo, para la troponina total para ciertos fragmentos, para la troponina en complejo, para la

troponina modificada, y similares. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de aminoácidos de la troponina cardiaca. En algunos casos, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca humana. Ambos anticuerpos monoclonales y policlonales son útiles como asociados de unión. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal específico para los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca humana. En algunos casos, este anticuerpo no se ve afectado por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina, y no presentan reacción con cruzamiento con la troponina I del músculo esquelético.

Los métodos para producir anticuerpos están bien establecidos. Las secuencias específicas cardiacas para la troponina I y troponina T se describen en FEBS Lett. 270,57-61 (1990) and Genomics 21, 311-316 (1994). Un experto en el arte reconocerá que muchos procedimientos están disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en el arte apreciará también que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también se pueden preparar a partir de la información genética mediante diversos procedimientos (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149,3914-3920 (1992)). Los métodos para producir anticuerpos a las diversas formas de las troponinas en complejo, fragmentos, fosforiladas, y oxidadas se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,579,687; 6,991,907; y en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 20050164317. Un péptido sintético compuesto por 14 aminoácidos que imita una secuencia específica de troponina I cardiaca y los métodos usados para preparar anticuerpos para el péptido se describen en la Solicitud de la Patente Internacional No. PCT/US94/05468. Los anticuerpos monoclonales y policlonales para las troponinas cardiacas libres y en complejo también están disponibles comercialmente (HyTest, HyTest Ltd.,Turku Finland; Abcam Inc., Cambridge, MA, USA, Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA, USA; Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA 01742-3049 USA; BiosPacific, Emeryville, CA).

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI. El anticuerpo puede ser específico para regiones específicas de la cTnI, por ejemplo, los aminoácidos 27-41 de troponina I cardiaca humana. Pares de asociados de unión de captura y asociados de unión de detección, por ejemplo, pares de anticuerpos de captura y detección, se pueden utilizar en los casos descritos en este documento. Por lo tanto, en algunos casos, se utiliza un protocolo de ensayo heterogéneo en el cual, por lo general, se utilizan dos asociados de unión, por ejemplo, dos anticuerpos. Un asociado de unión es un asociado de captura, por lo general inmovilizado sobre un soporte sólido, y el otro asociado de unión es un asociado de unión de detección, por lo general con una etiqueta detectable unida. En algunos casos, el elemento de asociado de unión de captura de un par es un anticuerpo que es específico para todas o sustancialmente todas las formas de troponina cardiaca. Un ejemplo es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para troponina I cardiaca (cTnI) libre aa 41-49 y cTnI que forman complejos con otros componentes de troponina. Preferiblemente, este anticuerpo no se ve afectado por la formación de complejos de troponina, la heparina, la fosforilación, y la oxidación, y no presentan reacción con cruzamiento con troponina I del músculo esquelético. Por lo tanto, se piensa que el anticuerpo se une a una cTnI total. Otro ejemplo es un anticuerpo monoclonal, específico para la troponina I cardiaca (cTnI) aa 87-91 y no presentan reacción con cruzamiento con la troponina I del músculo esquelético. Tales anticuerpos están disponibles de BiosPacific, Emeryville, CA. Otros pares de anticuerpos son conocidos o pueden ser diseñados.

Anticuerpos de reacción con cruzamiento. En algunos casos es útil usar un anticuerpo que reacciona con cruzamiento con una variedad de especies, ya sea como un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, o ambas cosas. Tales casos incluyen la medición de la toxicidad del fármaco determinando, por ejemplo, la liberación de troponina cardiaca en la sangre como marcador de daño cardiaco. Un anticuerpo de reacción con cruzamiento permite que se hagan estudios de toxicidad en una especie, por ejemplo, una especie no humana, y la transferencia directa de los resultados para estudios o las observaciones clínicas de otra especie, por ejemplo, seres humanos, utilizando el mismo anticuerpo o par de anticuerpos en los reactivos de los ensayos, disminuyendo así la variabilidad entre ensayos. Por lo tanto, en algunos casos, uno o más de los anticuerpos para su uso como un asociado de unión con el marcador, por ejemplo, la troponina cardiaca, tal como la troponina I cardiaca, puede ser un anticuerpo de reacción con cruzamiento. En algunos casos, el anticuerpo reacciona con cruzamiento con el marcador, por ejemplo, troponina cardiaca, a partir de al menos dos especies seleccionadas del grupo constituido por humano, mono, perro, y ratón. En algunos casos el anticuerpo reacciona con cruzamiento con el marcador por ejemplo, troponina cardiaca, de todo el grupo constituido por humano, mono, perro, y ratón.

B. Unidades estructurales fluorescentes para ser utilizadas con asociados de unión

En algunos casos, el asociado de unión, por ejemplo, el anticuerpo, se une a una unidad estructural fluorescente. La fluorescencia de la unidad estructural, será suficiente para permitir la detección en un detector de una única molécula, tal como los detectores de una única molécula descritos en este documento. Una "unidad estructural fluorescente", como se usa ese término en este documento, incluye una o más entidades fluorescentes cuya fluorescencia total es tal que la unidad estructural se puede detectar en los detectores de una única molécula descritos en este documento. Por

lo tanto, una unidad estructural fluorescente puede comprender una única entidad (por ejemplo, un punto cuántico o molécula fluorescente) o una pluralidad de entidades (por ejemplo, una pluralidad de moléculas fluorescentes). Se apreciará que cuando "unidad estructural", como se usa ese término en este documento, se refiere a un grupo de entidades fluorescentes, por ejemplo, una pluralidad de moléculas de colorante fluorescente, cada entidad individual puede estar unida al asociado de unión por separado o las entidades pueden ser unidas entre sí, siempre y cuando las entidades como un grupo proporcionan suficiente fluorescencia para ser detectadas.

Por lo general, la fluorescencia de la unidad estructural implica una combinación de eficiencia cuántica y la falta de fotoblanqueo suficiente que la unidad estructural es detectable por encima de los niveles de fondo en un detector de una única molécula, con la consistencia necesaria para el nivel deseado de detección, la exactitud y la precisión del ensayo. Por ejemplo, en algunos casos, la fluorescencia de la unidad estructural fluorescente es tal que permite la detección y/o cuantificación de la troponina a un nivel de detección de menos de aproximadamente 10, 5, 4, 3, 2, o 1 pg/mL y con un coeficiente de variación de menos de aproximadamente 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% o menos, por ejemplo, aproximadamente 10% o menos, en los instrumentos descritos en este documento. En algunos casos, la fluorescencia de la unidad estructural fluorescente es tal que permite la detección y/o cuantificación de la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 5 pg/mL y con un coeficiente de variación de menos de aproximadamente 10%, en los instrumentos descritos en este documento. "Límite de detección", como se usa ese término en este documento, incluye la concentración más baja a la que se puede identificar una muestra como que contiene una molécula de la sustancia de interés, por ejemplo, el primer valor distinto de cero. Se puede definir por la variabilidad de ceros y la pendiente de la curva estándar. Por ejemplo, el límite de detección de un ensayo se puede determinar realizando una curva estándar, determinando el valor de cero de la curva estándar, y adicionando 2 desviaciones estándar a ese valor. Una concentración de la sustancia de interés que produce una señal igual a este valor es el "límite inferior de detección" de concentración.

Por otra parte, la unidad estructural tiene propiedades que son consistentes con su uso en el ensayo de elección. En algunos casos, el ensayo es un inmunoensayo, en donde la unidad estructural fluorescente se une a un anticuerpo; la unidad estructural debe tener propiedades tales que no se agregan con otros anticuerpos o proteínas, o experimenta no más agregación que es consistente con la exactitud y la precisión requerida del ensayo. En algunos casos, las unidades estructurales fluorescentes que son preferidas son las unidades estructurales fluorescentes, por ejemplo, moléculas de colorante que tienen una combinación de 1) coeficiente de absorción alto; 2) rendimiento cuántico alto; 3) fotoestabilidad alta (fotoblanqueo bajo); y 4) compatibilidad con la marcación de la biomolécula de interés (por ejemplo, proteína) de modo que se puede analizar usando los analizadores y sistemas descritos en este documento (por ejemplo, no causa la precipitación de la proteína de interés, o precipitación de una proteína a la cual la unidad estructural se ha unido).

Las unidades estructurales fluorescentes, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que son útiles en algunos casos descritos en este documento pueden ser definidos en términos de sus características de emisión de fotones cuando es estimulado por la radiación EM. Por ejemplo algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000, fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Se apreciará que la energía total se puede conseguir por muchas diferentes combinaciones de potencia de salida del láser y la duración del tiempo de exposición de la unidad estructural de colorante. Por ejemplo, un láser de una potencia de salida de 1 mW se puede utilizar durante 3 ms, 3 mW durante 1 ms, 6 mW durante 0.5 ms, 12 mW durante 0.25 ms, y así sucesivamente.

En algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 100 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 150 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la

energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 300 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una unidad estructural de colorante fluorescente por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 500 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios.

En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 entidades fluorescentes, por ejemplo, moléculas fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de no más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 entidades fluorescentes, por ejemplo, moléculas fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 1 a 11, o aproximadamente 2 a 10, o aproximadamente 2 a 8, o aproximadamente 2 a 6, o aproximadamente 2 a 5, o aproximadamente 2 a 4, o aproximadamente 3 a 10, o aproximadamente 3 a 8, o aproximadamente 3 a 6, o aproximadamente 3 a 5, o aproximadamente 4 a 10, o aproximadamente 4 a 8, o aproximadamente 4 a 6, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, o más de aproximadamente 6 entidades fluorescentes. En algunos casos, se unen la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 2 a 8 unidades estructurales fluorescentes. En algunos casos, una media de aproximadamente 2 a 6 entidades fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 2 a 4 entidades fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 3 a 10 entidades fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 3 a 8 entidades fluorescentes. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente comprende una media de aproximadamente 3 a 6 entidades fluorescentes. Por "media" se quiere decir que, en una muestra dada que es una muestra representativa de un grupo de etiquetas descritas en este documento, donde la muestra contiene una pluralidad de las unidades de unidades estructurales fluorescentes del asociado de unión, la relación molar de la entidad fluorescente particular de la que la unidad estructural fluorescente se comprende, con el asociado de unión, tal como se determina mediante métodos analíticos estándar, corresponde al número o rango de números especificado. Por ejemplo, en casos en los cuales la etiqueta comprende un asociado de unión que es un anticuerpo y una unidad estructural fluorescente que comprende una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes de una absorbancia específica, se puede usar un ensayo espectrofotométrico en el cual se diluye una solución de la etiqueta a un nivel apropiado y la absorbancia a 280 nm se toma para determinar la molaridad de la proteína (anticuerpo) y se toma una absorbancia a, por ejemplo, 650 nm (para Alexa Fluor 647) para determinar la molaridad de la molécula de colorante fluorescente. La relación de este última molaridad con la primera representa el número medio de entidades fluorescentes (moléculas de colorante) en la unidad estructural fluorescente unida a cada anticuerpo.

1. Colorantes

Algunos casos utilizan unidades estructurales fluorescentes que comprenden moléculas de colorantes fluorescentes. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, donde el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la molécula, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 75 fotones, cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, donde el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la molécula, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 100 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, donde el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la molécula, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 150 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene

la molécula, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la molécula, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios.

Una lista no exhaustiva de las entidades fluorescentes útiles para su uso en las unidades estructurales fluorescentes descritas en este documento se da en la Tabla 1, a continuación. En algunos casos, la entidad fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Alexa Flour 488, 532, 647, 700, 750, fluoresceína, B-ficoeritrina, alofococianina, PBXL-3, y Qdot 605.

10

TABLA 1
ENTIDADES FLUORESCENTES

colorante	Ex(nm)	E(M) -1	Em(nm)	Mw
Bímano	380	5,700	458	282.31
Dapoxil	373	22,000	551	362.83
Ácido dimetilamino cumarina-4- acético	375	22,000	470	344.32
Azul de marina	365	19,000	460	367.26
Ácido 8-anilino naftaleno-1- sulfónico	372		480	
Cascada azul	376	23,000	420	607.42
Alexa Fluor 405	402	35,000	421	1028.26
Cascada azul	400	29,000	420	607.42
Cascada amarilla	402	24,000	545	563.54
Azul Pacífico	410	46,000	455	339.21
PyMPO	415	26,000	570	582.41
Alexa 430	433	15,000	539	701.75
Atto-425	438		486	
NBD	465	22,000	535	391.34
Alexa 488	495	73,000	519	643.41
Fluoresceína	494	79,000	518	376.32
Oregon Green 488	496	76,000	524	509.38
Atto 495	495		522	
Cy2	489	150,000	506	713.78
DY-480-XL	500	40,000	630	514.60
DY-485-XL	485	20,000	560	502.59
DY-490-XL	486	27,000	532	536.58

ES 2 550 004 T3

DY-500-XL	505	90,000	555	596.68
DY-520-XL	520	40,000	664	514.60
Alexa Fluor 532	531	81,000	554	723.77
BODIPY 530/550	534	77,000	554	513.31
6-HEX	535	98,000	556	680.07
6-JOE	522	75,000	550	602.34
Rodamina 6G	525	108,000	555	555.59
Atto-520	520		542	
Cy3B	558	130,000	572	658.00
Alexa Fluor 610	612	138,000	628	
Alexa Fluor 633	632	159,000	647	ca. 1200
Alexa Fluor 647	650	250,000	668	ca. 1250
BODIPY 630/650	625	101,000	640	660.50
Cy5	649	250,000	670	791.99
Alexa Fluor 660	663	110,000	690	
Alexa Fluor 680	679	184,000	702	
Alexa Fluor 700	702	192,000	723	
Alexa Fluor 750	749	240,000	782	
B-ficoeritrina	546,565	2,410,000	575	240,000
R-ficoeritrina	480,546,565	1,960,000	578	240,000
Aloficocianina	650	700,000	660	700,000
PBXL-1	545		666	
PBXL-3	614		662	

Colorantes Atto-tec

	Nombre	Ex (nm)	Em (nm)	QY	h(ns)
	Atto 425	436	486	0.9	3.5
	Atto 495	495	522	0.45	2.4
	Atto 520	520	542	0.9	3.6
	Atto 560	561	585	0.92	3.4
	Atto 590	598	634	0.8	3.7
	Atto 610	605	630	0.7	3.3

ES 2 550 004 T3

Atto 655	665	690	0.3	1.9
Atto 680	680	702	0.3	1.8

Dyomics Fluors

Etiqueta	Ex(nm)	Absorbancia molar * [l • mol ⁻¹ • cm ⁻¹]	Em (nm)	peso molecular # [g • mol ⁻¹]
DY-495/5	495	70,000	520	489.47
DY-495/6	495	70,000	520	489.47
DY-495X/5	495	70,000	520	525.95
DY-495X/6	495	70,000	520	525.95
DY-505/5	505	85,000	530	485.49
DY-505/6	505	85,000	530	485.49
DY-505X/5	505	85,000	530	523.97
DY-505X/6	505	85,000	530	523.97
DY-550	553	122,000	578	667.76
DY-555	555	100.000	580	636.18
DY-610	609	81.000	629	667.75
DY-615	621	200.000	641	578.73
DY-630	636	200.000	657	634.84
DY-631	637	185.000	658	736.88
DY-633	637	180.000	657	751.92
DY-635	647	175.000	671	658.86
DY-636	645	190.000	671	760.91
DY-650	653	170.000	674	686.92
DY-651	653	160.000	678	888.96
DYQ-660	660	117,000	-	668.86
DYQ-661	661	116,000	-	770.90
DY-675	674	110.000	699	706.91
DY-676	674	145.000	699	807.95
DY-680	690	125.000	709	634.84
DY-681	691	125.000	708	736.88
DY-700	702	96.000	723	668.86
DY-701	706	115.000	731	770.90

ES 2 550 004 T3

DY-730	734	185.000	750	660.88
DY-731	736	225.000	759	762.92
DY-750	747	240.000	776	712.96
DY-751	751	220.000	779	814.99
DY-776	771	147.000	801	834.98
DY-780-OH	770	70.000	810	757.34
DY-780-P	770	70.000	810	957.55
DY-781	783	98.000	800	762.92
DY-782	782	102.000	800	660.88
EVOblue-10	651	101.440	664	389.88
EVOblue-30	652	102.000	672	447.51

Puntos cuánticos: 525, 565, 585, 605, 655, 705, 800

5 Los colorantes apropiados para su uso como se describe en este documento incluyen colorantes de carbocianina modificados. La modificación de colorantes de carbocianina incluye la modificación de un anillo de indolio del colorante de carbocianina para permitir un grupo reactivo o sustancia conjugada en la posición número 3. La modificación del anillo de indolio provee conjugados de colorantes que son de manera uniforme y sustancialmente más fluorescentes en las proteínas, ácidos nucleicos y otros biopolímeros, que los conjugados marcados con colorantes de carbocianina estructuralmente similares unidos a través del átomo de nitrógeno en la posición número uno. Además de tener una emisión de fluorescencia más intensa que los colorantes estructuralmente similares a longitudes de onda prácticamente idénticas, y la disminución de artefactos en sus espectros de absorción sobre la conjugación con biopolímeros, los colorantes de carbocianina modificados tienen mayor fotoestabilidad y superior absorbancia (coeficientes de extinción) en las longitudes de onda de absorbancia pico que los colorantes de estructura similar. Por lo tanto, los colorantes de carbocianina modificados resultan en una mayor sensibilidad en los ensayos que utilizan los colorantes modificados y sus conjugados. Los colorantes modificados preferidos incluyen compuestos que tienen al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o una sustancia conjugada. Otros compuestos colorantes incluyen compuestos que incorporan una unidad estructural del anillo aza-benzazolio y al menos una unidad estructural sulfonato. Los colorantes de carbocianina modificados que se pueden utilizar para detectar partículas únicas en diversos casos descritos en este documento se describen en la Patente de los Estados Unidos 6,977,305. Por lo tanto, en algunos casos las etiquetas descritas en este documento utilizan un colorante fluorescente que incluye un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas.

25 En algunos casos, la etiqueta comprende una unidad estructural fluorescente que incluye uno o más colorantes Alexa (Molecular Probes, Eugene, OR). Los colorantes Alexa se revelan en las Patentes de los Estados Unidos 6,977,305; 6,974,874; 6,130,101; y 6,974,305. Algunos casos utilizan un colorante seleccionado del grupo que consiste en Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, y Alexa Fluor 750. Algunos casos utilizan un colorante seleccionado del grupo que consiste en Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750. Algunos casos utilizan la molécula de Alexa Fluor 647, que tiene un máximo de absorción entre aproximadamente 650 y 660 nm y un máximo de emisión entre aproximadamente 660 y 670 nm. El colorante Alexa Fluor 647 se usa solo o en combinación con otros colorantes Alexa Fluor.

30 Además, los compuestos fluorescentes orgánicos disponibles en la actualidad se pueden mejorar haciéndolos menos hidrófobos mediante la adición de grupos hidrófilos tales como polietileno. Alternativamente, los compuestos fluorescentes orgánicos sulfonados actualmente como el colorante Alexa Fluor 647 pueden volverse menos ácidos haciéndolos zwitteriónicos. Las partículas tales como anticuerpos que se marcan con los compuestos fluorescentes modificados son menos propensas a unirse no específicamente a superficies y proteínas en inmunoensayos, y por lo tanto permiten que los ensayos tengan mayor sensibilidad y menor fondo. Los métodos para modificar y mejorar las propiedades de los colorantes fluorescentes con el fin de aumentar la sensibilidad de un sistema que detecta las partículas únicas son conocidos en la técnica. Preferiblemente, la modificación mejora el desplazamiento de Stokes, manteniendo un alto rendimiento cuántico.

2. Puntos cuánticos

En algunos casos, la unidad estructural de etiqueta fluorescente que se utiliza para detectar una molécula en una muestra usando los sistemas de análisis descritos en este documento es un punto cuántico. Los puntos cuánticos (QD), también conocidos como nanocristales semiconductores o átomos artificiales, son cristales de semiconductores que contienen en cualquier lugar entre 100 a 1,000 electrones y oscilan de 2-10 nm. Algunos QD pueden tener entre 10-20 nm de diámetro. Los QD tienen altos rendimientos cuánticos, que los hace particularmente útiles para aplicaciones ópticas. Los QD son fluoróforos que presentan fluorescencia formando excitones, que se pueden considerar del estado excitado de fluoróforos tradicionales, pero tienen una vida útil mucho más larga de hasta 200 nanosegundos. Esta propiedad ofrece QD con fotoblanqueo bajo. El nivel de energía de los QD se puede controlar cambiando el tamaño y la forma del QD, y la profundidad del potencial de los QD. Una de las características ópticas de QD excitónicos pequeños es la coloración, que se determina por el tamaño del punto. Cuanto mayor sea el punto, es más rojo, o más hacia el extremo rojo del espectro de la fluorescencia. Cuanto más pequeño sea el punto, más azul o más hacia el extremo azul está. La energía de banda prohibida que determina la energía y por lo tanto el color de la luz fluorescente es inversamente proporcional al cuadrado del tamaño del QD. Los QD más grandes tienen más niveles de energía están estrechamente espaciados, lo que permite al QD absorber fotones que contienen menos energía, i.e., aquellos más cerca del extremo rojo del espectro. Debido a que la frecuencia de emisión de unos puntos depende de la banda prohibida, por lo tanto, es posible controlar la longitud de onda de salida de un punto con una precisión extrema. En algunos casos, la proteína que se detecta con el sistema de análisis de una partícula única está marcada con un QD. En algunos casos, el analizador de partícula única se utiliza para detectar una proteína marcada con un QD y el uso de un filtro para permitir la detección de diferentes proteínas en diferentes longitudes de onda. Los QD tienen una amplia excitación y propiedades de emisión estrechas que cuando se utiliza con filtración del color requieren sólo una única fuente electromagnética para el análisis multiplex de múltiples dianas en una única muestra para resolver señales individuales. Por lo tanto, en algunos casos, el sistema de análisis comprende un láser de onda continua y partículas que son cada una marcadas con un solo QD. Los QD preparados de forma coloidal son de libre flotación y se puede unir a una variedad de moléculas a través de grupos funcionales de coordinación de metal. Estos grupos incluyen, pero no se limitan a tiol, amina, nitrilo, fosfina, óxido de fosfina, ácido fosfónico, ácidos carboxílicos u otros ligandos. Mediante la unión de moléculas apropiadas a la superficie, los puntos cuánticos se pueden dispersar o disolver en casi cualquier solvente o incorporar en una variedad de películas inorgánicas y orgánicas. Los puntos cuánticos (QD) pueden ser acoplados a estreptavidina directamente a través de una reacción de acoplamiento de éster de maleimida o a anticuerpos a través de una reacción de acoplamiento maleimida-tiol. Esto produce un material con una biomolécula unida covalentemente en la superficie, que produce conjugados con actividad específica alta. En algunos casos, la proteína que se detecta con el analizador de partícula única se marca con un punto cuántico. En algunos casos el punto cuántico tiene entre 10 y 20 nm de diámetro. En otros casos, el punto cuántico tiene entre 2 y 10 nm de diámetro. Los puntos cuánticos útiles incluyen QD 605, QD 610, QD 655 y QD 705. Un punto cuántico preferido particularmente es QD 605.

C. Composiciones de asociado de unión-unidad estructural fluorescente (etiquetas)

Las etiquetas descritas en este documento contienen generalmente un asociado de unión, por ejemplo, anticuerpo, unido a una unidad estructural fluorescente para proporcionar la fluorescencia requisito para la detección y cuantificación en los instrumentos descritos en este documento. Cualquier combinación apropiada de asociado de unión y unidad estructural fluorescente en los detectores de una única molécula descrita en este documento se pueden usar como una etiqueta como se describe en este documento. Algunos casos proporcionan una etiqueta para una molécula de troponina cardiaca, o fragmento, complejo, forma fosforilada, u oxidada del mismo, donde la etiqueta incluye un anticuerpo a una troponina cardiaca y una unidad estructural fluorescente. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, un anticuerpo para cTnT o cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo para cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de la troponina cardiaca, por ejemplo, específica a los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan composiciones que comprenden una unidad estructural fluorescente unida a un anticuerpo anti-cTnI, por ejemplo, un anticuerpo policlonal tal como un anticuerpo policlonal de cabra de los designados G129C disponible de BiosPacific, Emeryville. Una unidad estructural fluorescente puede estar unida de tal manera que la etiqueta sea capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000, fotones cuando se simula por un emisor de luz láser en la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la etiqueta, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser no es más que aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos, la unidad estructural fluorescente puede ser una unidad estructural fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50, 100, 150, o 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, donde el láser se centra en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. La unidad estructural fluorescente puede ser una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante con una estructura que incluye un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo

químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas del grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 647, 700, o 750. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas del grupo constituido por Alexa Fluor 488, 532, 700, o 750. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 488. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 555. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 610. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 647. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 680. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 700. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 750.

Algunos ejemplos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una molécula de AlexFluor, por ejemplo, una molécula de Alexa Fluor seleccionada de los grupos descritos, tales como una molécula de Alexa Fluor 647 unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de troponina I cardiaca que incluye una media de 1 a 11, o aproximadamente 2 a 10, o aproximadamente 2 a 8, o aproximadamente 2 a 6, o aproximadamente 2 a 5, o aproximadamente 2 a 4, o aproximadamente 3 a 10, o aproximadamente 3 a 8, o aproximadamente 3 a 6, o aproximadamente 3 a 5, o aproximadamente 4 a 10, o aproximadamente 4 a 8, o aproximadamente 4 a 6, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, o más de aproximadamente 6 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de troponina I cardiaca que incluye una media de 1 a 11, o aproximadamente 2 a 10, o aproximadamente 2 a 8, o aproximadamente 2 a 6, o aproximadamente 2 a 5, o aproximadamente 2 a 4, o aproximadamente 3 a 10, o aproximadamente 3 a 8, o aproximadamente 3 a 6, o aproximadamente 3 a 5, o aproximadamente 4 a 10, o aproximadamente 4 a 8, o aproximadamente 4 a 6, o aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, o más de aproximadamente 6 Alexa Fluor 647 moléculas unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 2 a 10 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 2 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 2 a 4 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 3 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 3 a 6 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye una media de aproximadamente 4 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana.

La unión de la unidad estructural fluorescente, o entidades fluorescentes que componen la unidad estructural fluorescente, con el asociado de unión, por ejemplo, anticuerpo, puede ser por cualquier medio apropiado; tales métodos son bien conocidos en la técnica y métodos de ejemplo se dan en los Ejemplos. En algunos casos, después de la unión de la unidad estructural fluorescente con el asociado de unión para formar una etiqueta para su uso en los métodos descritos en este documento, y antes de la utilización de la etiqueta para la marcación de la proteína de interés, es útil llevar a cabo una etapa de filtración. Por ejemplo, una etiqueta de anticuerpo-colorante se puede filtrar antes de su uso, por ejemplo, a través de un filtro de 0.2 micras, o cualquier filtro apropiado para la eliminación de los agregados. Otros reactivos para su uso en los ensayos descritos en este documento también se pueden filtrar, por ejemplo, a través de un filtro de 0.2 micras, o cualquier filtro apropiado. Sin pretender estar ligado a ninguna teoría, se cree que dicha filtración elimina una parte de los agregados de, por ejemplo, las etiquetas anticuerpo-colorante. Como tales agregados se unirán como una unidad a la proteína de interés, pero en caso de liberación en solución reguladora de elución que probablemente desagregar, pueden resultar los falsos positivos; i.e., varias etiquetas se detectan a partir

de un agregado que se ha unido a una única molécula de proteína de interés. Independientemente de la teoría, se ha encontrado que la filtración reduce los falsos positivos en el posterior ensayo y mejora la exactitud y precisión.

IV. Análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca

5 La especificación provee un método para determinar la presencia o ausencia de una única molécula de troponina cardiaca o un fragmento o complejo de la misma en una muestra, mediante i) la marcación de la molécula, fragmento, o complejo, si está presente, con una etiqueta; y ii) la detección de la presencia o ausencia de la etiqueta, donde la detección de la presencia de la etiqueta indica la presencia de la única molécula, fragmento, o complejo de troponina cardiaca en la muestra. Como se usa en este documento, "molécula de troponina cardiaca" incluye una molécula que contiene sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de origen natural del tipo particular de troponina cardiaca, incluyendo formas modificadas después de la traducción, por ejemplo, formas fosforiladas, así como formas oxidadas o de otra manera alteradas químicamente. Como se usa en este documento, un "fragmento" de una molécula incluye una molécula de troponina cardiaca que contiene menos de la secuencia de aminoácidos de origen natural completa, incluyendo modificaciones como para la molécula completa. Como se usa en este documento, un "complejo" de una molécula de troponina cardiaca incluye una molécula de troponina cardiaca o un fragmento que se asocia con una o más otras moléculas o sustancias, por ejemplo, que se asocia con una o más otras moléculas de troponina cardiaca. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 o 0.1 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 100 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 50 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 20 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 10 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 5 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 3 pg/mL. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 1 pg/mL. Los límites de detección se pueden determinar mediante el uso del apropiado material estándar de referencia del Instituto Nacional de Estándares y de Tecnología, por ejemplo, cTnI estándar.

30 Los métodos también proporcionan métodos para determinar una concentración de troponina cardiaca en una muestra mediante la detección de moléculas únicas de la troponina en la muestra. La "detección" de una única molécula de troponina incluye la detección de la molécula directamente o indirectamente. En el caso de detección indirecta, las etiquetas que corresponden a moléculas únicas de troponina cardiaca, por ejemplo, se puede detectar una etiqueta que se ha unido a las moléculas únicas de la troponina cardiaca.

35 Los tipos de troponina cardiaca para la detección son como se describen en este documento, por ejemplo, cTnT, cTnI, la troponina cardiaca total (por ejemplo, cTnI total o cTnT total) o libre, en complejo, o fragmentos de la troponina cardiaca. En algunas realizaciones, se detecta y/o cuantifica la troponina cardiaca total. En algunas realizaciones, se detecta cTnT total. En algunas realizaciones, se detecta y/o cuantifica cTnI total.

A. Muestra

40 La muestra puede ser cualquier muestra apropiada. Por lo general, la muestra es una muestra biológica, por ejemplo, un fluido biológico. Tales fluidos incluyen, sin limitación, condensado de aire exhalado (EBC), líquido de lavado broncoalveolar (BAL), sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, líquido gástrico, líquido linfático, líquido intersticial, homogeneizado de tejido, extractos de células, saliva, esputo, heces, secreciones fisiológicas, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, líquido seminal, secreciones vaginales, líquido de úlceras y otras erupciones superficiales, ampollas y abscesos, y extractos de tejidos, incluyendo biopsias de tejidos normales, malignas y sospechosas o cualesquier otros constituyentes del cuerpo que pueden contener la partícula diana de interés. Otras muestras similares, tales como cultivo de células o tejidos o caldo de cultivo también son de interés.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de plasma. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de suero.

B. Preparación de la muestra

50 En general, cualquier método de preparación de la muestra se puede usar para producir una etiqueta que corresponde a una molécula de troponina cardiaca que se desea medir, donde la etiqueta es detectable en los instrumentos descritos en este documento. Como se conoce en la técnica, la preparación de muestras en la cual se adiciona una etiqueta a una o más partículas se puede realizar en un formato homogéneo o heterogéneo. En algunos casos, la preparación de la muestra se establece en un formato homogéneo. En el sistema de análisis que emplea un formato homogéneo, la

etiqueta no unida no se elimina de la muestra. Véase, por ejemplo, la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1. En algunos casos, la partícula o partículas de interés se etiquetan mediante la adición de anticuerpo o anticuerpos marcados que se unen a la partícula o partículas de interés.

5 En algunos casos, se utiliza un formato de ensayo heterogéneo, donde, por lo general, se emplea una etapa para retirar la etiqueta no unida. Tales formatos de ensayo son bien conocidos en la técnica. Un formato de ensayo particularmente útil es un ensayo de tipo sándwich, por ejemplo, un inmunoensayo de tipo sándwich. En este formato, la molécula de interés, por ejemplo, marcador de un estado biológico, es capturado, por ejemplo, sobre un soporte sólido, utilizando un asociado de unión de captura. Las moléculas no deseadas y otras sustancias pueden entonces opcionalmente ser lavadas, seguido por la unión de una etiqueta que comprende un asociado de unión de detección y una etiqueta detectable, por ejemplo, unidad estructural fluorescente. Otras lavados eliminan la etiqueta no unida, luego se libera la etiqueta detectable, por lo general, aunque no necesariamente todavía unida al asociado de unión de detección. En casos alternativos, se adicionan la muestra y la etiqueta al asociado de unión de captura sin un lavado en el medio, por ejemplo, al mismo tiempo. Otras variaciones serán evidentes para un experto en el arte.

15 En algunos casos, el método para la detección de partículas de troponina utiliza un ensayo de sándwich con anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales como asociados de unión de captura. El método comprende la unión de moléculas de troponina en una muestra con un anticuerpo de captura que está inmovilizado en una superficie de unión, y la unión del anticuerpo de detección con la molécula de troponina para formar un complejo "sándwich". El anticuerpo de detección comprende una etiqueta fluorescente detectable, tal como se describe en este documento, que se detecta, por ejemplo, usando los analizadores de una única molécula descritos en este documento. Tanto los anticuerpos de captura como de detección se unen específicamente a la troponina. Muchos ejemplos de inmunoensayos sándwich son conocidos, y algunos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 4,168,146 de Grubb et al. y la Patente de los Estados Unidos No. 4,366,241 de Tom et al.. Otros ejemplos específicos para la troponina cardíaca se describen en los Ejemplos.

25 El asociado de unión de captura puede estar unido a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o perlas paramagnéticas. En algunos casos, la invención provee un asociado de unión para una troponina cardíaca unido a una perla paramagnética. Se puede utilizar cualquier asociado de unión apropiado que es específico para el tipo de troponina cardíaca que se desea capturar. El asociado de unión puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser específico para troponina cardíaca (cTnI o cTnT) libre o para la troponina cardíaca que forma complejo, troponina cardíaca modificada, o fragmentos de la troponina cardíaca, como se describe en este documento, o específico a todas o prácticamente todas las formas de troponina cardíaca, por ejemplo, cTnI o cTnT, que probablemente se encuentran en la muestra de interés. La producción y fuentes de anticuerpos para la troponina cardíaca se describen en este documento. Los anticuerpos preferidos para medir la troponina total son aquellos que no se afectan sustancialmente por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina, y que no presentan reacción con cruzamiento con troponina del músculo esquelético, por ejemplo, la troponina I. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de una troponina cardíaca. En algunos casos, la región incluye los aminoácidos 41 - 49 de la troponina I cardíaca humana. En algunos casos, la región incluye los aminoácidos 87 - 91 de la troponina I cardíaca humana. Tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están disponibles en, por ejemplo, BiosPacific, Emeryville, CA. Un ejemplo de un anticuerpo de captura útil en los casos de la invención es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que reacciona con la troponina I cardíaca (cTnI) libre aa de 41 - 49 y cTnI formar complejos con otros componentes de troponina. Preferiblemente, este anticuerpo no se ve afectada por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina, y no presentan reacción con cruzamiento con troponina del músculo esquelético I. Un anticuerpo a modo de ejemplo de este tipo es el Clon de Anticuerpo Monoclonal Número A34650228P, disponible de BiosPacific, Emeryville, CA. Otro ejemplo de un anticuerpo de captura útil en los casos de la invención es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que reacciona con la troponina I cardíaca (cTnI) libre aa 87-91 y cTnI que forma complejos con otros componentes de troponina. Preferiblemente, este anticuerpo no se ve afectado por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina, y no presenta reacción con cruzamiento con troponina I del músculo esquelético. Un anticuerpo a modo de ejemplo de este tipo es el Clon de Anticuerpo Monoclonal Número A34440228P, disponible de BiosPacific, Everyville, CA. Se apreciará que los anticuerpos identificados en este documento, tan útiles como un anticuerpo de captura también pueden ser útiles como anticuerpos de detección, y viceversa.

55 La unión del asociado de unión, por ejemplo, anticuerpo, al soporte sólido puede ser covalente o no covalente. En algunos casos, la unión es no covalente. Un ejemplo de una unión no covalente bien conocida en la técnica es las interacciones con biotina-avidina/estreptavidina. Por lo tanto, en algunos casos, un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o una perla paramagnética, se une al asociado de unión de captura, por ejemplo, el anticuerpo, a través de unión covalente, por ejemplo, interacciones de biotina-avidina/estreptavidina. En algunos casos, la unión es covalente. Por lo tanto, en algunos casos, un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o una perla paramagnética, se une al asociado de unión de captura, por ejemplo, el anticuerpo, a través de unión covalente. La unión covalente en la cual la orientación del anticuerpo de captura es tal que es especialmente útil, que la captura de la molécula de interés sea optimizada. Por ejemplo, en algunos casos un soporte sólido, por ejemplo, se puede utilizar una

placa de microtitulación o una micropartícula paramagnética, en donde la unión del asociado de unión, por ejemplo, anticuerpo, es una unión orientada, por ejemplo, una unión orientada covalente.

5 Un protocolo de ejemplo para la unión orientada de un anticuerpo a un soporte sólido es de la siguiente manera: IgG se disuelve en solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M, pH 5.5 a una concentración final de 1 mg/mL. Se adiciona un volumen igual de peryodato de sodio 20 mM enfriado con hielo en acetato de sodio 0.1 M, pH 5.5. La IgG se deja oxidar por ½ hora en hielo. El exceso de reactivo de peryodato se inactivó mediante la adición de un volumen de 0.15 de glicerol 1M. Los subproductos de bajo peso molecular de la reacción de oxidación se eliminan por ultrafiltración. La unidad estructural IgG oxidada se diluyó a una concentración apropiada (por lo general de 0.5 microgramos de IgG por mL) y se hizo reaccionar con placas multipozos activadas con hidrazina durante al menos dos horas a temperatura ambiente. La IgG sin unir se elimina por medio del lavado de la placa multipozos con solución salina regulada con borato u otra solución reguladora apropiada. La placa se puede secar durante el almacenamiento, si se desea. Un protocolo similar se puede seguir para microperlas si el material de la microperla es apropiado para dicha unión.

15 En algunos casos, el soporte sólido es una placa de microtitulación. En algunos casos, el soporte sólido es una perla paramagnética. Una perla paramagnética de ejemplo es la estreptavidina C1 (Dynal, 650.01-03). Otras perlas apropiadas serán evidentes para los expertos en el arte. Los métodos para la unión de anticuerpos con las perlas paramagnéticas son bien conocidos en la técnica. En los Ejemplos se da una ilustración.

20 La troponina cardiaca de interés se pone en contacto con el asociado de unión de captura, por ejemplo, el anticuerpo de captura inmovilizado sobre un soporte sólido. Alguna preparación de la muestra se puede utilizar; por ejemplo, preparación de suero de muestras de sangre o procedimientos de concentración antes de que la muestra se ponga en contacto con el anticuerpo de captura. Los protocolos para la unión de las proteínas en inmunoensayos son bien conocidos en la técnica y se incluyen en los Ejemplos.

25 El tiempo permitido para la unión variará dependiendo de las condiciones; será evidente que los tiempos más cortos de unión son deseables en algunos entornos, especialmente en un entorno clínico. El uso de, por ejemplo, perlas paramagnéticas puede reducir el tiempo requerido para la unión. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menor que aproximadamente 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, o 1 hora, o menos de aproximadamente 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menor que aproximadamente 60 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menor que aproximadamente 40 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 20 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 15 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 10 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 5 minutos.

35 En algunos casos, después de la unión de las partículas de troponina con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo de captura, las partículas que se pueden haber unido inespecíficamente, así como otras sustancias no deseadas en la muestra, se retiran lavando, dejando sustancialmente sólo partículas de troponina unidas específicamente. En otros casos, no se utiliza el lavado entre las adiciones de la muestra y la etiqueta; se apreciará que esto reduce aún más el tiempo de preparación de la muestra. Por lo tanto, en algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de aproximadamente 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, o 1 hora, o menos de aproximadamente 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de 60 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de 40 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de aproximadamente 20 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de 15 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de aproximadamente 10 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el asociado de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, y la unión de la etiqueta con la proteína de interés, es menos de aproximadamente 5 minutos.

Algunos reactivos de diagnóstico de inmunoensayo incluyendo los anticuerpos de captura y de señal utilizados para medir los analitos diana se pueden derivar de los sueros de animales. Los anticuerpos heterófilos humanos endógenos, o anticuerpos anti-humanos de animales, que tienen la capacidad de unirse a las inmunoglobulinas de otras especies, están presentes en el suero o plasma de más del 10% de los pacientes. Estos anticuerpos heterófilos circulantes pueden interferir con las mediciones de inmunoensayo. En inmunoensayos de tipo sándwich, estos anticuerpos heterófilos pueden tender a unirse a los anticuerpos de captura y detección (diagnóstico), produciendo de este modo una señal de falsos positivos, o pueden bloquear la unión de los anticuerpos de diagnóstico, produciendo de ese modo una señal de falsos negativos. En inmunoensayos competitivos, los anticuerpos heterófilos se pueden unir al anticuerpo analítico e inhibir su unión a la troponina. También se pueden ya sea bloquear o aumentar la separación del complejo de troponina-anticuerpo de la troponina libre, especialmente cuando se utilizan anticuerpos antiespecies en los sistemas de separación. Por lo tanto, el impacto de estas interferencias de anticuerpos heterófilos es difícil de predecir. Por lo tanto, sería ventajoso bloquear la unión de cualquier anticuerpo heterófilo. En algunos casos, el inmunoensayo incluye la etapa de caída de la muestra de anticuerpos heterófilos usando uno o más bloqueadores de anticuerpos heterófilos. Los métodos para la eliminación de anticuerpos heterófilos a partir de muestras que se van a probar en inmunoensayos son conocidos e incluyen: el calentamiento de la muestra en una solución reguladora de acetato de sodio, pH 5.0, durante 15 minutos a 90 °C y centrifugación a 1200g durante 10 minutos, o los anticuerpos heterófilos se pueden precipitar utilizando polietilenglicol (PEG); inmunoeextracción de la interferencia de las inmunoglobulinas heterófilas a partir de la muestra utilizando la proteína A o proteína G; o la adición de IgG de ratón no inmune. Los casos de los métodos descritos en este documento contemplan la preparación de la muestra antes del análisis con el detector de única molécula. La idoneidad del método de tratamiento previo se puede determinar. Los bioquímicos para minimizar la interferencia del inmunoensayo causada por los anticuerpos heterófilos están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un producto llamado MAK33, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 para h-CK-MM, se puede obtener de Boehringer Mannheim. El producto MAK33 plus contiene una combinación de IgG1 e IgG1-Fab. El polyMAK33 contiene IgG1-Fab polimerizada con IgG1 y el Polymac 2b/2a contiene IgG2a-Fab polimerizada con IgG2b. Una segunda fuente comercial de productos bioquímicos para neutralizar los anticuerpos heterófilos es un reactivo inhibidor de la inmunoglobulina comercializado por Bioreclamation Inc, East Meadow, NY. Este producto es una preparación de inmunoglobulinas (IgG e IgM) de múltiples especies, principalmente IgG2a murino, IgG2b, e IgG3 de ratones Balb/c. En algunos casos el anticuerpo heterófilo puede ser inmunoeextraído de la muestra utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo caída de la muestra del anticuerpo heterófilo mediante la unión del anticuerpo que interfiere con la proteína A o G. En algunos casos, el anticuerpo heterófilo se neutraliza usando uno o más bloqueadores de anticuerpos heterófilos. Los bloqueadores de los heterófilos se pueden seleccionar del grupo que consiste de bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-isotipo, bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-idiotipo, y bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-anti-idiotipo. En algunos casos se puede utilizar una combinación de bloqueadores de anticuerpos heterófilos.

La etiqueta se adiciona ya sea con o después de la adición de la muestra y el lavado. Los protocolos para la unión del anticuerpo y otras inmunoetiquetas con las proteínas y otras moléculas son bien conocidos en la técnica. Si la etapa de unión de la etiqueta es independiente de unión de captura, el tiempo permitido para la unión de la etiqueta puede ser importante, por ejemplo, en el ámbito clínico. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 12, 10, 8, 6, 4, 3, 2, o 1 hora, o menos de aproximadamente 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 60 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 40 minutos.

En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 20 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 15 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 10 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con la etiqueta, por ejemplo, anticuerpo-colorante, es menos de aproximadamente 5 minutos. El exceso de etiqueta se elimina mediante el lavado.

La etiqueta luego se eluye de la proteína de interés. Las soluciones reguladoras de elución preferidas son eficaces en la liberación de la etiqueta sin generar un fondo significativo. También es útil si la solución reguladora de elución es bacteriostática. Las soluciones reguladoras de elución de uso incluyen un agente caotrópico, por ejemplo, urea o un compuesto de guanidinio; una solución reguladora, por ejemplo, solución salina regulada con borato; un portador de proteína, por ejemplo, una albúmina, tal como albúmina humana, bovina, o pescado, o una IgG, para recubrir la pared del tubo capilar en el instrumento de detección; y un surfactante, por ejemplo, un detergente iónico o no iónico, seleccionado de manera que produzca un fondo relativamente bajo, por ejemplo, Tween 20, Triton X-100, o SDS.

La alícuota de elución de solución reguladora/etiqueta que es muestreada en el detector de una única molécula se conoce como la "muestra en procesamiento", para distinguirla de la muestra original que se obtuvo de un individuo.

En otro ejemplo, el ensayo de unión en fase sólida puede emplear un formato de ensayo de unión competitiva. Uno de dichos métodos comprende a) unión competitiva con un anticuerpo de captura inmovilizado sobre una superficie de unión i) una partícula de troponina en una muestra y ii) un análogo marcado de la partícula de troponina que comprende un marcador detectable (el reactivo de detección) y b) medir la cantidad de la etiqueta utilizando un analizador de partícula única. Otro de tales métodos comprende a) unión competitiva con un anticuerpo que tiene un marcador detectable (el reactivo de detección) i) una partícula de troponina en una muestra y ii) un análogo de la partícula de troponina que está inmovilizado sobre una superficie de unión (el reactivo de captura) y b) medir la cantidad de la etiqueta utilizando un analizador de partícula única. Un "análogo de una troponina" se refiere, en este documento, a una especie que compite con la troponina por la unión con un anticuerpo de captura. Ejemplos de inmunoensayos competitivos se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 4,235,601 de Deutsch et al., la Patente de los Estados Unidos No. 4,442,204 de Liotta, y la Patente de los Estados Unidos No. 5,208,53 de Buechler et al.

C. Detección de la troponina y determinación de la concentración

Después de la elución, la etiqueta se pasa a través de un detector de una única molécula en, por ejemplo, la solución reguladora de elución. Una muestra en procesamiento puede contener no etiqueta, una sola etiqueta, o una pluralidad de etiquetas. El número de etiquetas corresponde o es proporcional (si se utilizan diluciones de muestras o unidades estructurales) al número de moléculas de troponina cardíaca capturada durante la etapa de captura.

Puede ser utilizado cualquier detector apropiado de una única molécula capaz de detectar la etiqueta utilizada con la proteína de interés. Los detectores apropiados de una única molécula se describen en este documento. Normalmente, el detector será parte de un sistema que incluye un muestreador automático para el muestreo de las muestras preparadas, y, opcionalmente, un sistema de recuperación para recuperar las muestras.

En algunos casos, la muestra en procesamiento se analiza en un analizador de molécula única que utiliza un sistema de flujo capilar, y que incluye una celda de flujo capilar, un láser para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, un detector para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una fuente de fuerza motriz para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación. En algunos casos, el analizador de molécula única comprende además una lente objetivo del microscopio que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación, por ejemplo, una alta apertura numérica del objetivo del microscopio. En algunos casos, el láser y el detector están en una configuración confocal. En algunos casos, el láser es un láser de onda continua. En algunos casos, el detector es un detector de fotodiodos en avalancha. En algunos casos, la fuente de fuerza motriz es una bomba para proporcionar la presión. Algunos casos proporcionan un sistema de análisis que incluye un sistema de muestreo capaz de muestrear automáticamente una pluralidad de muestras proporcionando una comunicación del líquido entre un recipiente de muestra y el espacio de interrogación. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.001 y 500 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 100 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 10 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 5 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 0.5 pL, o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 300 pL, o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 50 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 5 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 0.5 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 2 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 50 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 5 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 0.5 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 0.2 pL, o entre aproximadamente 0.1 pL y aproximadamente 25 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.004 pL y 100 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.02 pL y 50 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.001 pL y 10 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.001 pL y 10 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.01 pL y 5 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 5 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.05 pL y 5 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.05 pL y 10 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.5 pL y aproximadamente 5 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 0.5 pL.

En algunos casos, el detector de molécula única utilizado en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una celda de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 50 pL. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una celda de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta

5 abertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0.8, un detector de fotodiodos en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0.004 pL y aproximadamente 100 pL. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una celda de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta abertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0.8, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 10 pL. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una celda de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta abertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0.8, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 5 pL. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una celda de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta abertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0.8, un detector de fotodiodos en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación, y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0.5 pL y aproximadamente 5 pL.

30 En algunos casos, el detector de una única molécula es capaz de determinar una concentración de una molécula de interés en una muestra donde la muestra puede variar en concentración en un intervalo de al menos aproximadamente 100 veces, o 1000 veces, o 10,000 veces, o 100,000 veces, o 300,00 veces, o 1,000,000 veces, o 10,000,000 veces, o 30,000,000 veces.

35 En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, o 10% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 femtomolar. En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 50% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 100 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 100 femtomolar. En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 40% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 50 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 50 femtomolar. En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 20% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 20 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 20 femtomolar. En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 20% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 10 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 10 femtomolar. En algunos casos, los métodos de la invención utilizan un detector de una única molécula capaz de detectar una diferencia de menos de aproximadamente 20% en la concentración de un analito entre una primera muestra y una segunda muestra que se introducen en el detector, cuando el volumen de la primera muestra y dicha segunda muestra introducida en el analizador es menos de aproximadamente 5 ul, y en donde el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 5 femtomolar.

Los sistemas y detector de única molécula se describen con más detalle a continuación. Otros casos de analizadores de una única molécula útiles en los métodos de la invención, tales como detectores con más de una ventana de interrogación, los detectores utilizan flujo electrocinético o electroforético, y similares, se pueden encontrar en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1.

5 El instrumento se puede lavar entre los ensayos. Se puede utilizar una solución reguladora de lavado que mantiene las concentraciones de sal y de surfactante de la muestra, en algunos casos para mantener el acondicionamiento del capilar; i.e., para mantener la superficie del capilar relativamente constante entre las muestras para reducir la variabilidad.

10 Una característica que contribuye a la sensibilidad extremadamente alta de los instrumentos y los métodos de la invención es el método de detección y de recuento de etiquetas, que, en algunos casos, están unidas a moléculas únicas para ser detectadas o, más generalmente, corresponden a una única molécula que se detecta. En resumen, la muestra en procesamiento que fluye a través del capilar se divide de manera efectiva en una serie de eventos de detección, sometiendo un espacio de interrogación dado del capilar a la radiación EM a partir de un emisor de luz láser a una longitud de onda de excitación apropiada para la unidad estructural fluorescente utilizada en la etiqueta durante un período de tiempo predeterminado, y la detección de fotones emitidos durante ese tiempo. Cada período de tiempo predeterminado es un "intervalo". Si el número total de fotones detectado en un intervalo dado excede un nivel de umbral predeterminado, se registra un evento de detección para ese intervalo, i.e., se ha detectado una etiqueta. Si el número total de fotones no está en el nivel de umbral predeterminado, ningún evento de detección se registra. En algunos casos, concentración de la muestra en procesamiento es suficientemente diluida que, para un gran porcentaje de eventos de detección, el evento de detección representa sólo una etiqueta que pasa a través de la ventana, que corresponde a una única molécula de interés en la muestra original, es decir, pocos eventos de detección representan más de una etiqueta en un solo intervalo. En algunos casos, otros refinamientos se aplican para permitir mayores concentraciones de etiqueta en la muestra en procesamiento para que sea detectada con precisión, i.e., concentraciones en las que la probabilidad de que dos o más etiquetas se detecten como un único evento de detección ya no es insignificante.

A pesar de que otros tiempos del intervalo se pueden utilizar, en algunos casos se seleccionan en el rango de aproximadamente 1 microsegundo a aproximadamente 5 ms. En algunos casos, el tiempo del intervalo es más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, o 5000 microsegundos.. En algunos casos, el tiempo del intervalo es menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,90, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, o 5000 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 1000 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 750 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 40 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 50microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 6 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 7 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 8 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 9 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 11 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 12 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 13 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 14 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 15 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 16 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 17

- microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 18 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 19 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 25 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 40 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 750 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1000 microsegundos.
- 5
- 10 En algunos casos, el nivel de ruido de fondo se determina a partir de la media del nivel de ruido, o la media cuadrática del ruido. En otros casos, se elige un valor de ruido típico o un valor estadístico. En la mayoría de los casos, se espera que el ruido siga una distribución de Poisson. Por lo tanto, en algunos casos, determinar la concentración de un complejo de partículas de etiqueta en una muestra comprende determinar el nivel de ruido de fondo.
- 15 Por lo tanto, a medida que una etiqueta fluye a través de la celda de flujo capilar, es irradiada por el haz de láser para generar una ráfaga de fotones. Los fotones emitidos por la etiqueta se discriminan de la luz de fondo o emisión de ruido de fondo, considerando que sólo las ráfagas de fotones tienen energía por encima de un nivel de energía umbral predeterminado que representa la cantidad de ruido de fondo que está presente en la muestra. El ruido de fondo comprende por lo general baja emisión de frecuencia producida, por ejemplo, por la fluorescencia intrínseca de las partículas no etiquetadas que están presentes en la muestra, la solución reguladora o diluyente usados en la
- 20 preparación de la muestra para el análisis, la dispersión Raman y el ruido electrónico. En algunos casos, el valor asignado al ruido de fondo se calcula como la media de la señal de ruido de fondo detectado en una pluralidad de intervalos, que son mediciones de las señales de fotones que son detectadas en un espacio de interrogación durante un período de tiempo predeterminado. Así, en algunos casos, el ruido de fondo se calcula para cada muestra como un número específico para esa muestra.
- 25 Teniendo en cuenta el valor del ruido de fondo, se puede asignar el nivel de energía de umbral. Como se discutió anteriormente, el valor umbral se determina para discriminar señales verdaderas (debido a la fluorescencia de una etiqueta) del ruido de fondo. Se debe tener cuidado en la elección de un valor de umbral de tal manera que, se reduce al mínimo el número de falsas señales positivas de ruido aleatorio, mientras que el número de señales verdaderas que se rechazan también se minimiza. Los métodos para elegir un valor de umbral incluyen determinar un valor fijo por encima
- 30 del nivel de ruido y calcular un valor de umbral basado en la distribución de la señal de ruido. En un caso, el umbral se fija en un número fijo de desviaciones estándar por encima del nivel de fondo. Suponiendo una distribución de Poisson del ruido, usando este método se puede estimar el número de señales de falsos positivos durante el transcurso de tiempo del experimento. En algunos casos, el nivel de umbral se calcula como un valor de 4 sigma por encima del ruido de fondo. Por ejemplo, dado un nivel medio de ruido de fondo de 200 fotones, el sistema de análisis establece un nivel
- 35 de umbral de $4\sqrt{200}$ por encima de la media del nivel de fondo/ruido de 200 fotones, que es 256 fotones. Por lo tanto, en algunos casos, determinar la concentración de una etiqueta en una muestra incluye establecer el nivel de umbral por encima del cual las señales de fotones representan la presencia de una etiqueta. Por el contrario, las señales de fotones que tienen un nivel de energía que no es mayor que la del nivel de umbral indican la ausencia de una etiqueta.
- 40 Se toman muchas mediciones de intervalo para determinar la concentración de una muestra, y la ausencia o presencia de una etiqueta se confirma para cada medición de intervalo. Normalmente, 60,000 mediciones o más se pueden hacer en un minuto (por ejemplo, en los casos en los que el tamaño del intervalo es de 1 ms para tamaños del intervalo más pequeños el número de mediciones es proporcionalmente mayor, por ejemplo, 6,000,000 mediciones por minuto para un tamaño intervalo de 10 microsegundos). Por lo tanto, ninguna medición única es crucial y el método provee un alto margen de error. Los intervalos que se determinan como que no contienen una etiqueta ("no" intervalos) se descuentan
- 45 y sólo las mediciones hechas en los intervalos que se determinan como que contienen etiqueta ("sí" intervalos) se cuentan para determinar la concentración de la etiqueta en la muestra en procesamiento. Descontando las mediciones realizadas en el "no" intervalos o intervalos que están desprovistos de etiqueta, aumenta la relación señal-ruido y la exactitud de las mediciones. Por lo tanto, en algunos casos, determinar la concentración de una etiqueta en una muestra comprende detectar las mediciones de intervalo que reflejan la presencia de una etiqueta.
- 50 La relación de señal-ruido o la sensibilidad del sistema de análisis se pueden aumentar minimizando el tiempo que se detecta el ruido de fondo, durante una medición del intervalo en la que se detecta un complejo de partícula-etiqueta. Por ejemplo, en una medición del intervalo que dura 1 milisegundo, durante el cual se detecta un complejo de partícula-etiqueta cuando pasa a través de un espacio de interrogación en 250 microsegundos, 750 microsegundos del 1 milisegundo se gastan para detectar la emisión de ruido de fondo. La relación señal-ruido se puede mejorar
- 55 disminuyendo el tiempo del intervalo. En algunos casos, el tiempo del intervalo es 1 milisegundo. En otros casos, el tiempo del intervalo es de 750, 500, 250 microsegundos, 100 microsegundos, 50 microsegundos, 25 microsegundos o 10 microsegundos. Otros tiempos del intervalo son como se describen en este documento.

Otros factores que afectan las medidas son el brillo o penumbra de la unidad estructural fluorescente, la velocidad de flujo, y la potencia del láser. Varias combinaciones de los factores relevantes que permiten la detección de la etiqueta serán evidentes para los expertos en el arte. En algunos casos, el tiempo del intervalo se ajusta sin cambiar la velocidad de flujo. Se apreciará por los expertos en el arte que a medida que disminuye el tiempo del intervalo, la salida de potencia del láser dirigida al espacio de interrogación debe aumentar para mantener una energía total constante aplicada al espacio de interrogación durante el tiempo del intervalo. Por ejemplo, si el tiempo del intervalo se disminuye de 1000 microsegundos a 250 microsegundos, como una primera aproximación, la salida de potencia del láser se debe aumentar aproximadamente cuatro veces. Estos ajustes permiten para la detección del mismo número de fotones en unos 250 ms como el número de fotones contados durante los 1000 ms, dados los ajustes anteriores, y permiten un análisis más rápido de la muestra con menores fondos y por lo tanto una mayor sensibilidad. Además, las velocidades de flujo se pueden ajustar con el fin de acelerar el procesamiento de la muestra. Estos números son meramente ejemplares, y el profesional experto puede ajustar los parámetros según sea necesario para lograr el resultado deseado.

En algunos casos, el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de la corriente de muestra. Cuando el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de la corriente de muestra, sólo se necesitan el número de etiquetas contado y el volumen que pasa a través de una sección transversal de la corriente de muestra en una longitud fija de tiempo, para calcular la concentración de la etiqueta en la muestra en procesamiento. En algunos casos, el espacio de interrogación se puede definir para que sea menor que el área de la sección transversal de corriente de la muestra, por ejemplo, mediante el espacio de interrogación que se define por el tamaño del punto iluminado por el rayo láser. En algunos casos, el espacio de interrogación se puede definir mediante el ajuste de las aberturas 306 (Figura 1A) o 358 y 359 (Figura 1B) del analizador y la reducción del volumen iluminado que es reflejado por la lente del objetivo al detector. En los casos en los que el espacio de interrogación se define para ser más pequeño que el área de la sección transversal de la corriente de la muestra, la concentración de la etiqueta se puede determinar por interpolación de la señal emitida por el complejo a partir de una curva estándar que se genera usando una o más muestras de concentraciones estándar conocidas. En aún otros casos, la concentración de la etiqueta se puede determinar mediante la comparación de las partículas medidas con un estándar de etiqueta interno. En casos, en los que se analiza una muestra diluida, el factor de dilución se tiene en cuenta en el cálculo de la concentración de la molécula de interés en la muestra de partida.

Como se discutió anteriormente, cuando el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de la corriente de muestra, sólo el número de etiquetas contado que pasa a través de una sección transversal de la corriente de muestra en una longitud fija de tiempo (intervalo) y el volumen de la muestra que fue interrogado en el intervalo, se necesitan para calcular la concentración de la muestra. El número total de etiquetas contenidas en los "sí" intervalos se determina y se relaciona con el volumen de la muestra representada por el número total de intervalos utilizados en el análisis para determinar la concentración de etiquetas en la muestra en procesamiento. Por lo tanto, en un caso, determinar la concentración de una etiqueta en una muestra en procesamiento comprende determinar el número total de etiquetas detectadas "sí" intervalos y relacionar el número total de etiquetas detectadas con el volumen total de la muestra que se analizó. El volumen total de la muestra que se analiza es el volumen de la muestra que se pasa a través de la celda de flujo capilar y a través del espacio de interrogación en un intervalo de tiempo especificado. Alternativamente, la concentración del complejo de etiqueta en una muestra se determina por interpolación de la señal emitida por la etiqueta en un número de intervalos a partir de una curva estándar que se genera determinando la señal emitida por las etiquetas en el mismo número de intervalos de muestras estándar que contiene concentraciones conocidas de la etiqueta.

En algunos casos, el número de etiquetas individuales que se detecta en un intervalo está relacionado con la concentración relativa de la partícula en la muestra en procesamiento. A concentraciones relativamente bajas, por ejemplo a concentraciones inferiores a cerca de 10-16 M el número de etiquetas es proporcional a la señal de fotones que se detecta en un intervalo. Por lo tanto, a bajas concentraciones de etiqueta se provee la señal de fotones como una señal digital. A concentraciones relativamente altas, por ejemplo a concentraciones mayores de aproximadamente 10⁻¹⁶ M, la proporcionalidad de la señal de fotones con una etiqueta se pierde como la probabilidad de dos o más etiquetas que cruzan el espacio de interrogación en aproximadamente el mismo momento y que se cuenta como uno se vuelve significativa. Por lo tanto, en algunos casos, las partículas individuales en una muestra de una concentración mayor que aproximadamente 10⁻¹⁶ M se resuelven por la disminución de la longitud de tiempo de la medición del intervalo.

Alternativamente, en otros casos, el total de la señal de fotón que es emitida por una pluralidad de partículas que están presentes en cualquier intervalo se detecta. Estos ejemplos permiten detectores de una única molécula de la invención en donde el rango dinámico es al menos 3, 3.5, 4, 4.5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, o más de 8 logs.

El "rango dinámico", tal como se usa ese término en este documento, se refiere al rango de concentraciones de la muestra que puede ser cuantificado por el instrumento sin necesidad de dilución u otro tratamiento para alterar la concentración de las muestras sucesivas de diferentes concentraciones, donde las concentraciones se determinan con una precisión apropiada para el uso previsto. Por ejemplo, si una placa de microtitulación contiene una muestra de una

5 concentración 1 femtomolar para un analito de interés en un pozo, una muestra de concentración 10,000 femtomolar para un analito de interés en otro pozo, y una muestra de concentración 100 femtomolar para el analito en un tercer pozo, así, un instrumento con un rango dinámico de al menos 4 logs y un límite inferior de cuantificación de 1 femtomolar es capaz de cuantificar con precisión la concentración de todas las muestras sin la necesidad de tratamiento adicional para ajustar la concentración, por ejemplo, la dilución. La precisión se puede determinar por métodos estándar, por ejemplo, usando una serie de estándares de concentraciones que abarcan todo el rango dinámico y la construcción de una curva estándar. Las medidas estándar de ajuste de la curva estándar resultante se puede usar como una medida de precisión, por ejemplo, un r^2 mayor que aproximadamente 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.91, 0.92, 0.93, 0.94, 0.95, 0.96, 0.97, 0.98, o 0.99.

10 El aumento de rango dinámico se logra mediante la alteración de la forma en que se analizan los datos procedentes del detector, y/o mediante el uso de un atenuador entre el detector y el espacio de interrogación. En el extremo inferior del rango, en donde la muestra en procesamiento es suficientemente diluida tal que cada evento de detección, i.e., cada ráfaga de fotones por encima de un nivel de umbral en un intervalo (los "fotones de eventos"), probablemente representa sólo una etiqueta, se analizan los datos para contar eventos de detección como moléculas únicas. Es decir, cada intervalo se analiza como un simple "sí" o "no" por la presencia de etiqueta, como se describió anteriormente. Para 15 una muestra en procesamiento más concentrada, donde la probabilidad de que dos o más etiquetas que ocupan un solo intervalo llega a ser significativa, el número de fotones de eventos en un número significativo de intervalos se encuentra que es sustancialmente mayor que el número esperado para una sola etiqueta, por ejemplo, el número de fotones de eventos en un número significativo de intervalos corresponde a dos veces, tres veces, o más, que el número de fotones de eventos esperados para una sola etiqueta. Para estas muestras, el instrumento cambia su método de análisis de datos a uno que integra el número total de fotones de eventos para los intervalos de la muestra en procesamiento. Este total será proporcional al número total de etiquetas que estaba en todos los intervalos. Para una muestra en procesamiento aún más concentrada, donde muchas etiquetas están presentes en la mayoría de los intervalos, el ruido de fondo se convierte en una porción insignificante de la señal total de cada intervalo, y el instrumento cambia su método de análisis de datos a uno que cuenta los fotones totales por intervalo (incluyendo el fondo). Un aumento aún 25 más en el rango dinámico se puede lograr mediante el uso de un atenuador entre la celda de flujo y el detector, cuando las concentraciones son tales que la intensidad de luz que llega al detector de otra manera supera la capacidad del detector para contar los fotones con precisión, i.e., saturan el detector.

30 El instrumento puede incluir un sistema de análisis de datos que recibe la entrada del detector y determina el método de análisis apropiado para la muestra que se está realizando, y los valores de salidas basados en dicho análisis. El sistema de análisis de datos puede promover instrucciones de salida a usar o no usar un atenuador, si un atenuador está incluido en el instrumento.

35 Utilizando dichos métodos, el rango dinámico del instrumento se puede aumentar claramente. Por lo tanto, en algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un rango dinámico de más de aproximadamente 1000 (3 log), 10,000 (4 log), 100,000 (5 log), 350,000 (5.5 log), 1,000,000 (6 log), 3,500,000 (6.5 log), 10,000,000 (7 log), 35,000,000 (7.5 log), o 100,000,000 (8 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un rango dinámico de más de aproximadamente 100,000 (5 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un rango dinámico de más de aproximadamente 1,000,000 (6 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un rango dinámico de más de aproximadamente 10,000,000 (7 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un rango dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 1000; 10,000; 100,000; 350,000; 1,000,000; 3,500,000; 10,000,000, o 35,000,000 femtomolar.. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un rango dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 10,000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un rango dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 100,000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un rango dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 1,000,000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un rango dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 10,000,000. 50

55 En algunos casos, un sistema de análisis o analizador descrito en este documento es capaz de detectar un analito, por ejemplo, un biomarcador en un límite de detección de menos de 1 nanomolar o 1 picomolar, o 1 femtomolar, o 1 attomolar, o 1 zeptomolar. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito, o de múltiples analitos, por ejemplo, un biomarcador o biomarcadores, de una muestra a otra muestra de menos de aproximadamente 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, o 80% cuando el biomarcador está presente a una concentración de menos de 1 nanomolar o 1 picomolar, o 1 femtomolar, o 1 attomolar, o 1 zeptomolar, en las muestras, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, 0.001, o 0.0001 ul. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente

20%, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 1 picomolar, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μL . En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente 20%, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 100 femtomolar, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μL . En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente 20%, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 50 femtomolar, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μL . En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente 20%, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 5 femtomolar, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 5 μL . En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente 20%, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 1 femtomolar, y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 5 μL .

20 V. Instrumentos y sistemas apropiados para el análisis de alta sensibilidad de troponina

Los métodos de la invención utilizan instrumentos analíticos de alta sensibilidad, por ejemplo, detectores de una única molécula. Dichos detectores de una única molécula incluyen ejemplos como se describen más adelante.

A. Aparato/Sistema

25 En un aspecto, los métodos descritos en este documento utilizan un sistema de análisis capaz de detectar una partícula única en una muestra. En un caso, el sistema de análisis es capaz de detectar una partícula única de una partícula marcada con fluorescencia en donde el sistema de análisis detecta la energía emitida por una etiqueta fluorescente excitada en respuesta a la exposición por una fuente de radiación electromagnética cuando la partícula única está presente en un espacio de interrogación definido dentro de una celda de flujo capilar conectado de forma fluida al sistema de muestreo del sistema de análisis. En un caso adicional del sistema de análisis, la partícula única se mueve a través del espacio de interrogación de la celda de flujo capilar por medio de una fuerza motriz. En otro caso del sistema de análisis, un sistema de muestreo automático puede ser incluido en el sistema de análisis para la introducción de la muestra en el sistema de análisis. En otro caso del sistema de análisis, un sistema de preparación de la muestra puede ser incluido en el sistema de análisis para la preparación de una muestra. En un caso adicional, el sistema de análisis puede contener un sistema de recuperación de la muestra para la recuperación de al menos una porción de la muestra después de que el análisis se completa.

En un caso, el sistema de análisis consta de una fuente de radiación electromagnética para excitar una partícula única marcada con una etiqueta fluorescente. En un caso, la fuente de radiación electromagnética del sistema de análisis es un láser. En un caso adicional, la fuente de radiación electromagnética es un láser de onda continua.

40 En un caso típico, la fuente de radiación electromagnética excita una unidad estructural fluorescente unida a una etiqueta a medida que la etiqueta pasa a través del espacio de interrogación de la celda de flujo capilar. En algunos casos, la unidad estructural de etiqueta fluorescente incluye una o más moléculas de colorante fluorescente. En algunos casos, la unidad estructural de etiqueta fluorescente es un punto cuántico. Cualquier unidad estructural fluorescente como se describe en este documento se puede utilizar en la etiqueta.

45 Una etiqueta se expone a la radiación electromagnética cuando la etiqueta pasa a través de un espacio de interrogación situado dentro de la celda de flujo capilar. El espacio de interrogación está conectado por lo general de manera fluida a un sistema de muestreo. En algunos casos, la etiqueta pasa a través del espacio de interrogación de la celda de flujo capilar debido a una fuerza motriz para avanzar la etiqueta a través del sistema de análisis. El espacio de interrogación se posiciona de tal manera que recibe la radiación electromagnética emitida desde la fuente de radiación. En algunos casos, el sistema de muestreo es un sistema de muestreo automatizado capaz de muestrear una pluralidad de muestras sin la intervención de un operador humano.

50 La etiqueta pasa a través del espacio de interrogación y emite una cantidad detectable de energía cuando es excitado por la fuente de radiación electromagnética. En una realización, un detector de radiación electromagnética está conectado operativamente al espacio de interrogación. El detector de radiación electromagnética es capaz de detectar la energía emitida por la etiqueta, por ejemplo, por la unidad estructural fluorescente de la etiqueta.

En un caso adicional del sistema de análisis, el sistema incluye además un mecanismo de preparación de la muestra, donde una muestra se puede preparar parcial o completamente para el análisis por el sistema de análisis. En algunos casos del sistema de análisis, la muestra se desecha después de que se analiza por el sistema. En otros casos, el sistema de análisis incluye además un mecanismo de recuperación de la muestra mediante el cual al menos una parte, o, alternativamente, la totalidad o sustancialmente la totalidad, de la muestra se puede recuperar después del análisis. En tal caso, la muestra se puede devolver al origen de la muestra. En algunos casos, la muestra puede ser devuelta a pozos de microtitulación en una placa de microtitulación de la muestra. Por lo general, el sistema de análisis además consiste en un sistema de adquisición de datos para la recopilación y notificación de la señal detectada.

B. Analizador de partículas únicas

Como se muestra en la figura 1A, se describe en este documento un ejemplo de un sistema 300 de análisis. El sistema 300 de análisis incluye una fuente 301 de radiación electromagnética, un espejo 302, una lente 303, una celda 313 de flujo capilar, una lente 305 de objetivo microscópico, una abertura 306, una lente 307 del detector, un filtro 308 del detector, un detector 309 de fotón único, y un procesador 310 conectado operativamente al detector.

En funcionamiento, la fuente 301 de radiación electromagnética está alineada de manera que su salida 311 se refleja fuera de una superficie 312 frontal del espejo 302. La lente 303 enfoca el haz 311 en un solo espacio de interrogación (un ejemplo ilustrativo de un espacio 314 de interrogación se muestra en la figura 2A) en la celda 313 de flujo capilar. La lente 305 de objetivo del microscopio recoge la luz a partir de partículas de la muestra y forma imágenes del haz sobre la abertura 306. La abertura 306 afecta la unidad estructural de luz emitida por la muestra en el espacio de interrogación de la celda 313 de flujo capilar que se puede recoger. La lente 307 del detector recoge la luz que pasa a través de la abertura 306 y enfoca la luz sobre un área activa del detector 309 después de su paso por los filtros 308 del detector. Los filtros 308 del detector minimizan las señales de ruido aberrantes debido a la dispersión de la luz o la luz ambiental mientras maximiza la señal emitida por la unidad estructural fluorescente excitada unida a la partícula. El procesador 310 procesa la señal de luz, procedente de la partícula de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

En un caso, la lente 305 del objetivo del microscopio tiene una alta apertura numérica del objetivo del microscopio. Como se usa en este documento, "lente de alta apertura numérica" incluye una lente con una apertura numérica de igual o mayor que 0.6. La apertura numérica es una medida del número de rayos de luz de formación de imágenes altamente difractadas capturadas por el objetivo. Una apertura numérica más alta permite que los rayos oblicuos cada vez más entren en la lente del objetivo y por lo tanto producen una imagen más altamente resuelta. Además, el brillo de una imagen aumenta con una apertura numérica superior. En el sistema de análisis, se puede utilizar lentes de alta apertura numérica están disponibles comercialmente de una variedad de vendedores, y cualquier lente que tenga una apertura numérica igual o mayor que aproximadamente 0.6. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.6 a aproximadamente 1.3. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.6 a aproximadamente 1.0. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 1.2. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 1.0. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.7 a aproximadamente 0.9. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 1.3. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 1.2. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 1.0. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0.6. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0.7. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0.8. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0.9. En algunos casos, la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 1.0. En algunos casos, la apertura de la lente 305 de objetivo del microscopio es aproximadamente 1.25. En un caso, donde se utiliza una lente 305 de objetivo del microscopio de 0.8, se puede utilizar una lente Nikon 60X/0.8 NA Achromat (Nikon, Inc., USA)..

En algunos casos, la fuente 301 de radiación electromagnética es un láser que emite luz en el espectro visible. En todos los casos, la fuente de radiación electromagnética se ajusta de tal manera que la longitud de onda del láser se ajuste de manera que sea de una longitud de onda suficiente para excitar la etiqueta fluorescente unida a la partícula. En algunos casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 639 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 532 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 422 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 405 nm. Se puede utilizar cualquier láser de onda continua con una longitud de onda apropiada para excitar una unidad estructural fluorescente tal como se utiliza en los métodos y composiciones descritos en este documento.

En un sistema 300 de análisis de partícula única, ya que cada partícula pasa a través del haz 311 de la fuente de radiación electromagnética, la partícula entra en un estado excitado. Cuando la partícula se relaja de su estado excitado, se emite una ráfaga detectable de luz. El ciclo de excitación-emisión se repite muchas veces por cada partícula en la longitud de tiempo que toma para que pase a través del haz permitiendo que el sistema 300 de análisis

detecte decenas a miles de fotones para cada partícula a medida que pasan a través de un espacio 314 de interrogación. Los fotones emitidos por partículas fluorescentes son registrados por el detector 309 (Figura 1A) con un retardo de tiempo indicativo del tiempo para que el complejo de etiqueta de partículas pase a través del espacio de interrogación. La intensidad de fotones se registra por el detector 309 y el tiempo de muestreo se divide en intervalos, que son, segmentos de tiempo, arbitrarios, uniformes con anchos de canal de tiempo libremente seleccionables. El número de señales contenidas en cada intervalo evaluado. Uno o una combinación de varios métodos de análisis estadísticos se emplean con el fin de determinar cuando una partícula se encuentra presente. Tales métodos incluyen determinar el ruido de línea de base del sistema de análisis y el ajuste de una intensidad de señal para la etiqueta fluorescente en un nivel estadístico por encima del ruido de línea de base para eliminar falsas señales positivas a partir del detector.

La fuente 301 de radiación electromagnética se enfoca sobre una celda 313 de flujo capilar del sistema 300 de análisis, donde la celda 313 de flujo capilar está conectada de forma fluida al sistema de muestra. Un espacio 314 de interrogación se muestra en la figura 2A. El haz 311 de la fuente 301 de radiación electromagnética de longitud continua de la figura 1A es ópticamente enfocada a una profundidad especificada dentro de la celda 313 de flujo capilar. El haz 311 se dirige hacia la celda 313 de flujo capilar llena de muestra en un ángulo perpendicular a la celda 313 de flujo capilar. El haz 311 se opera a una longitud de onda predeterminada que se selecciona para excitar una etiqueta fluorescente particular, utilizada para marcar la partícula de interés. El tamaño o el volumen del espacio 314 de interrogación se determina por el diámetro del haz 311 junto con la profundidad a la que el haz 311 se centra. Alternativamente, el espacio de interrogación se puede determinar mediante el análisis de una muestra de calibración de concentración conocida a través del sistema de análisis.

Cuando se detectan moléculas únicas en la concentración de la muestra, el tamaño del haz y la profundidad de foco necesario para la detección de moléculas únicas se fija y de esta manera definen el tamaño del espacio 314 de interrogación. El espacio 314 de interrogación está configurado de tal manera que, con una concentración de la muestra apropiada, sólo una partícula se encuentra presente en el espacio 314 de interrogación durante cada intervalo de tiempo durante el cual se hacen las observaciones en tiempo. Se apreciará que el volumen de interrogación de detección tal como se define por el haz no es de forma perfectamente esférica, y por lo general tiene una forma de "pajarita". Sin embargo, para los fines de definición, "volúmenes" de espacios de interrogación se definen en este documento como el volumen abarcado por una esfera de un diámetro igual al diámetro de punto enfocado del haz. El punto enfocado del haz 311. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, 10, 15, o 20 micras, o aproximadamente 5 a aproximadamente 10, 15, o 20 micras, o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 micras, o aproximadamente 10 a aproximadamente 15 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 5 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 10 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 12 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 13 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 14 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 15 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 16 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 17 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 18 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 19 micras. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 20 micras.

En una instancia alternativa del sistema de análisis de partícula única, puede usarse más de una fuente de radiación electromagnética para excitar las partículas marcadas con marcadores fluorescentes de diferentes longitudes de onda. En otro caso alternativo, se puede utilizar más de un espacio de interrogación en la celda de flujo capilar. En otro caso alternativo, se pueden emplear múltiples detectores para detectar longitudes de onda de emisión diferentes de las etiquetas fluorescentes. Una ilustración que incorpora cada uno de estos casos alternativos de un sistema de análisis se muestra en la figura 1B. Estos ejemplos se muestran en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/078998 A1.

En algunos casos del sistema 300 de análisis, se requiere una fuerza motriz para mover una partícula a través de la celda 313 de flujo capilar del sistema 300 de análisis. En un caso, la fuerza motriz puede ser una forma de presión. La presión usada para mover una partícula a través de la celda de flujo capilar puede ser generada por una bomba. En algunas realizaciones, se puede utilizar una bomba de HPLC Scivex, Inc. En algunos casos donde se utiliza una bomba como una fuerza motriz, la muestra puede pasar a través de la celda de flujo capilar a una velocidad de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a aproximadamente 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, o aproximadamente 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a aproximadamente 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la celda de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la celda de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la celda de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la celda de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunos casos, se puede utilizar una fuerza electrocinética para mover la partícula a

través del sistema de análisis. Este método ha sido descrito previamente en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/078998 A1.

5 En un caso del sistema 300 de análisis, el detector 309 del sistema de análisis detecta los fotones emitidos por la etiqueta fluorescente. En un caso, el detector de fotones es un fotodiodo. En un caso adicional, el detector es un detector de fotodiodo en avalancha. En algunos casos, los fotodiodos pueden ser fotodiodos de silicio con una longitud de onda de detección de 190 nm y 1100 nm. Cuando se utilizan fotodiodos de germanio, la longitud de onda de la luz detectada es entre 400 nm a 1700 nm. En otros casos, cuando se utiliza un fotodiodo de arseniuro de indio y galio, la longitud de onda de la luz detectada por el fotodiodo es entre 800 nm y 2600 nm. Cuando se utilizan como detectores fotodiodos de sulfuro de plomo, la longitud de onda de la luz detectada es entre 1000 nm y 3500 nm.

10 En algunos casos, la óptica de la fuente 301 de radiación electromagnética y la óptica del detector 309 están dispuestas en una configuración óptica convencional. En tal configuración, la fuente de radiación electromagnética y el detector están alineados en diferentes planos focales. La configuración del láser y la óptica del detector del sistema de análisis como se muestra en las Figuras 1A y 1B es la de una configuración óptica convencional.

15 En algunos casos, la óptica de la fuente de radiación electromagnética y la óptica del detector están dispuestas en una configuración óptica confocal. En tal configuración, la fuente 301 de radiación electromagnética y el detector 309 están alineadas en el mismo plano focal. La configuración confocal hace el analizador más robusto debido a que la fuente 301 de radiación electromagnética y la óptica del detector 309 no necesitarían ser realineadas si el sistema de análisis se mueve. Esta configuración también hace el uso del analizador más simplificado, ya que elimina la necesidad de volver a alinear los componentes del sistema de análisis. La configuración confocal para el analizador 300 (Figura 1A) y el
20 analizador 355 (Figura 1B) se muestran en las Figuras 3A y 3B respectivamente. La figura 3A muestra que el haz 311 a partir de una fuente 301 de radiación electromagnética se enfoca por el objetivo 315 del microscopio, para formar un espacio 314 de interrogación (Figura 2A) dentro de la celda 313 de flujo capilar. Para separar la luz fluorescente de la luz láser, se utiliza un espejo 316 dicróico, que refleja la luz láser, pero deja pasar la luz fluorescente. El filtro 317 que se coloca en frente del detector elimina cualquier luz no fluorescente en el detector. En algunos casos, un sistema de
25 análisis configurado en una configuración confocal puede comprender dos o más espacios de interrogación. Dicho método se ha revelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/078998 A1.

30 El láser puede ser un láser de colorante sintonizable, tal como un láser de helio-neón. El láser se puede configurar para emitir una longitud de onda de 632.8 nm. Alternativamente, la longitud de onda del láser se puede configurar para emitir una longitud de onda de 543.5 nm o 1523 nm. Alternativamente, el láser electromagnético puede ser un láser de iones de argón. En tal caso, el láser de iones de argón puede ser operado como un láser de gas continuo en aproximadamente 25 diferentes longitudes de onda en el espectro visible, la longitud de onda ajustada entre 408.9 y 686.1 nm, pero en su ajuste de rendimiento óptimo entre 488 y 514.5 nm.

1 Fuente de radiación electromagnética

35 En algunos casos, se puede utilizar el sistema de análisis de una etiqueta quimioluminiscente. En tal caso, puede que no sea necesario utilizar una fuente de EM para la detección de la partícula. En otro caso, la etiqueta extrínseca o característica intrínseca de la partícula es una característica o etiqueta que interactúa con la luz, tal como una etiqueta fluorescente o una etiqueta de dispersión de luz. En tal caso, una fuente de radiación EM se utiliza para iluminar la etiqueta y/o la partícula. Se prefieren las fuentes de radiación EM para la excitación de las etiquetas fluorescentes.

40 En algunos casos, el sistema de análisis consta de una fuente 301 de radiación electromagnética. Cualquier número de fuentes de radiación se puede usar en cualquier sistema 300 de análisis. Múltiples fuentes de radiación electromagnética se han descrito previamente en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1. En algunos casos, todas las fuentes de radiación continua de onda electromagnética (EM) emiten radiación electromagnética a las mismas longitudes de onda. En otros casos, diferentes
45 fuentes emiten diferentes longitudes de onda de radiación EM.

50 En un caso, la(s) fuente(s) de EM 301, 351, 352 son láseres de onda continua que producen longitudes de onda de entre 200 nm y 1000 nm. Tales fuentes EM tienen la ventaja de ser pequeñas, duraderas y relativamente económicas. Además, por lo general tienen la capacidad de generar señales fluorescentes más grandes que otras fuentes de luz. Ejemplos específicos de fuentes EM de onda continua apropiadas incluyen, pero no se limitan a: los láseres de los tipos de argón, criptón, helio-neón, helio-cadmio, así como, los láseres de diodo sintonizables (regiones de rojo a infrarrojos), cada uno con la posibilidad de duplicación de frecuencia. Los láseres proporcionan iluminación continua con ningún accesorio electrónico o dispositivo mecánico, tales como obturadores, para interrumpir su iluminación. En un caso donde se utiliza un láser de onda continua, una fuente de radiación electromagnética de 3 mW puede ser de energía suficiente para excitar una etiqueta fluorescente. Un haz de un láser de onda continua de dicha salida de energía puede
55 tener entre 2 a 5 μm de diámetro. El tiempo de exposición de la partícula al haz de láser con el fin de ser expuesto a

5 recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 20 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 30 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 40 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 50 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 60 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 70 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 80 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 90 microjulios. En algunos casos, la combinación de potencia del láser y tiempo de iluminación es tal que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación es aproximadamente 100 microjulios.

20 En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 1 mW, 2 mW, 3mW, 4mW, 5 mW, 6, mW, 7 mW, 8 mW, 9 mW, 10 mW, 13 mW, 15 mW, 20 mW, 25 mW, 30 mW, 40 mW, 50 mW, 60 mW, 70 mW, 80 mW, 90 mW, 100 mW, o más de 100 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 1 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 3 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 5 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 10 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 20 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 30 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 40 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 50 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 60 mW. En algunos casos, la salida de potencia del láser se establece en al menos aproximadamente 90 mW.

30 El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede establecer en no menos de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 150, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede establecer en no más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 150, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, o 2000 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 1 y 1000 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre 5 y 500 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 5 y 100 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 10 y 100 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 10 y 50 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 10 y 20 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre 5 y 50 microsegundos. El tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar entre aproximadamente 1 y 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 1 microsegundo. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de unos 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de unos 25 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de unos 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación es de aproximadamente 1000 microsegundos.

55 Por ejemplo, el tiempo que el láser ilumina el espacio de interrogación se puede ajustar a 1 milisegundo, 250 microsegundos, 100 microsegundos, 50 microsegundos, 25 microsegundos o 10 microsegundos con un láser que provee una potencia de salida de 3 mW, 4 mW, 5 mW, o más de 5 mW. En algunos casos, una etiqueta se ilumina con un láser que provee una potencia de salida de 3 mW e ilumina la etiqueta durante unos 1000 microsegundos. En otros casos, una etiqueta es iluminada por menos de 1000 milisegundos con un láser que provee una potencia de salida de no más de aproximadamente 20 mW. En otros casos, la etiqueta se ilumina con una salida de potencia del láser de 20 mW por menos de o igual a aproximadamente 250 microsegundos. En algunos casos, la etiqueta se ilumina con una potencia de salida del láser de aproximadamente 5 mW por menos de o igual a aproximadamente 1.000 microsegundos.

2. Celda de flujo capilar

La celda de flujo capilar está conectada de forma fluida al sistema de muestra. En un caso, el espacio 314 de interrogación de un sistema de análisis, se determina por el área de la sección transversal del haz 311 correspondiente y por un segmento del haz dentro del campo de visión del detector 309. En un caso del sistema de análisis, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen, como se define en este documento, entre aproximadamente 0.01 y 500 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 100 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 10 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 1 pL, o entre aproximadamente 0.01 pL y 0.5 pL, o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 300 pL, o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 50 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 5 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 0.5 pL o entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 2 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 50 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 5 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 0.5 pL, o entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 0.2 pL, o entre aproximadamente 0.1 pL y aproximadamente 25 pL. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.01 pL y 10 pL. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.01 pL y 1 pL. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 5 pL. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.02 pL y aproximadamente 0.5 pL. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0.05 pL y aproximadamente 0.2 pL. Otros volúmenes de espacio útil de interrogación son como se describen en este documento. Se debe entender por un experto en el arte que el espacio 314 de interrogación se puede seleccionar para un máximo rendimiento del analizador. Aunque se han mostrado muy pequeños espacios de interrogación para minimizar el ruido de fondo, los grandes espacios de interrogación tienen la ventaja de que las muestras de baja concentración se pueden analizar en un plazo de tiempo razonable. En casos en los que se utilizan dos espacios de interrogación 370 y 371, se pueden utilizar volúmenes tales como los descritos en este documento para un único espacio 314 de interrogación.

En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que varían de aproximadamente 1000 femtomolar (fM) a aproximadamente 1 zeptomolar (zM). En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que van desde aproximadamente 1000 fM a aproximadamente 1 attomolar (aM). En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que van desde aproximadamente 10 fM a aproximadamente 1 attomolar (aM). En muchos casos, los grandes espacios de interrogación permiten la detección de partículas en concentraciones de menos de aproximadamente 1 fM sin dispositivos o técnicas de pre-concentración adicional. Un experto en el arte reconocerá que el tamaño del espacio de interrogación más apropiado depende de la luminosidad de las partículas para ser detectado, el nivel de señal de fondo, y la concentración de la muestra que se va a analizar.

El tamaño del espacio 314 de interrogación puede ser limitado por el ajuste de la óptica del analizador. En un caso, el diámetro del haz 311 se puede ajustar para variar el volumen del espacio 314 de interrogación. En otro caso, el campo de visión del detector 309 se puede variar. Por lo tanto, la fuente 301 y el detector 309 se pueden ajustar de manera que las partículas únicas se iluminarán y se detectan dentro del espacio 314 de interrogación. En otro caso, la anchura de la abertura 306 (Figura 1A) que determina el campo de visión del detector 309, es variable. Esta configuración permite alterar el espacio de interrogación, en tiempo casi real, para compensar las muestras más o menos concentradas, lo que garantiza una baja probabilidad de que dos o más partículas estén a la vez dentro de un espacio de interrogación. Se pueden realizar alteraciones similares para dos o más espacios 370 y 371 de interrogación.

En otro caso, el espacio de interrogación se puede definir mediante el uso de una muestra de calibración de concentración conocida que se pasa a través de la celda de flujo capilar antes de que la muestra real sea analizada. Cuando se detecta sólo una partícula única a la vez en la muestra de calibración como la muestra se pasa a través de la celda de flujo capilar, la profundidad de foco junto con el diámetro del haz de la fuente de radiación electromagnética determina el tamaño del espacio de interrogación en la celda de flujo capilar.

Las limitaciones físicas a los espacios de interrogación también se pueden proporcionar por una pared sólida. En un caso, la pared es una o más de las paredes de una celda 313 de flujo (Figura 2A), cuando el líquido de muestra está contenida dentro de un capilar. En un caso, la celda está hecha de vidrio, pero se pueden utilizar otras sustancias transparentes a la luz en el rango de aproximadamente 200 a aproximadamente 1,000 nm o superior, tal como cuarzo, sílice fundida, y materiales orgánicos tales como teflón, nylon, plásticos, tales como cloruro de polivinilo, poliestireno y polietileno, o cualquier combinación de los mismos. Aunque otras formas de sección transversal (por ejemplo, rectangular, cilíndrica) se pueden usar, en un caso la celda 313 de flujo capilar tiene una sección transversal cuadrada. En otro ejemplo, el espacio de interrogación puede ser definida al menos en parte por un canal (no mostrado) grabado en un chip (no mostrado). Consideraciones similares se aplican a los casos en los que se utilizan dos espacios de interrogación (370 y 371 en la Fig. 2B).

El espacio de interrogación está bañado en un líquido. En un caso, el líquido es acuoso. En otros casos, el líquido es no acuoso o una combinación de líquidos acuosos y no acuosos. Además el líquido puede contener agentes para ajustar el pH, composición iónica, o agentes de tamizado, tales como macropartículas solubles o polímeros o geles. Se contempla

que las válvulas u otros dispositivos pueden estar presentes entre los espacios de interrogación para interrumpir temporalmente la conexión del líquido. Los espacios de interrogación interrumpidos temporalmente se considera que están conectados por líquido.

5 En otro caso de la invención, un espacio de interrogación es el espacio de interrogación solo presente dentro de la celda 313 de flujo que está limitada por el tamaño de un flujo laminar del material de muestra dentro de un volumen de diluyente, también llamado flujo de cubierta. En estos y otros ejemplos, el espacio de interrogación puede ser definido por el flujo de cubierta solo o en combinación con las dimensiones de la fuente de iluminación o el campo de visión del detector. El flujo de cubierta se puede configurar de muchas maneras, incluyendo: El material de la muestra es el material interior en un flujo laminar concéntrico, con el volumen del diluyente en el exterior; el volumen del diluyente está en un lado del volumen de muestra; el volumen de diluyente está en dos lados del material de la muestra; el volumen de diluyente está en varios lados del material de muestra, pero no encierra completamente el material de muestra; el volumen de diluyente rodea completamente el material de muestra; el volumen de diluyente rodea completamente el material de muestra concéntricamente; el material de muestra es el material interior en una serie discontinua de gotas y el volumen diluyente rodea completamente cada gota de material de la muestra.

15 En algunos casos, los detectores de una única molécula de la invención comprenden no más de un espacio de interrogación. En algunos casos, se utilizan múltiples espacios de interrogación. Múltiples espacios de interrogación se han descrito previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1. Un experto en el arte reconocerá que en algunos casos el analizador contendrá 2, 3, 4, 5, 6 o más espacios de interrogación distintos.

20 3. Fuerza motriz

En un caso del sistema de análisis, las partículas se mueven a través del espacio de interrogación por una fuerza motriz. En algunos casos, la fuerza motriz para las partículas en movimiento es la presión. En algunos casos, la presión es suministrada por una bomba, y la fuente de presión de aire, una fuente de vacío, una centrífuga, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la fuerza motriz para las partículas en movimiento es una fuerza electrocinética. El uso de una fuerza electrocinética como una fuerza motriz ha sido revelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1.

En un caso, la presión se puede utilizar como una fuerza motriz para mover las partículas a través del espacio de interrogación de la celda de flujo capilar. En un caso adicional, la presión se suministra para mover la muestra por medio de una bomba. Bombas apropiadas son conocidas en la técnica. En un caso, las bombas fabricadas para aplicaciones de HPLC, como las fabricadas por Scivax, Inc., se pueden utilizar como fuerza motriz. En otros casos, las bombas fabricadas para aplicaciones de microfluidos se pueden utilizar cuando se bombean volúmenes más pequeños de muestra. Tales bombas se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,094,594,5,730,187,6,033,628, y 6,533,553, que revelan los dispositivos que pueden bombear volúmenes de líquido en el rango de nanolitros o picolitros. Preferiblemente todos los materiales dentro de la bomba que entran en contacto con la muestra están hechos de materiales altamente inertes, por ejemplo, polieteretercetona (PEEK), sílice fundida, o zafiro.

Una fuerza motriz es necesaria para mover la muestra a través de la celda de flujo capilar para empujar la muestra a través del espacio de interrogación para el análisis. También se requiere una fuerza motriz para empujar una muestra de lavado a través de la celda de flujo capilar después de que la muestra se ha pasado a través. También se requiere una fuerza motriz para empujar la muestra de vuelta a cabo en un recipiente de recuperación de la muestra, cuando se emplea la recuperación de la muestra. Las bombas estándar vienen en una variedad de tamaños, y el tamaño apropiado se puede elegir para adaptarse a los requisitos esperados de tamaño de la muestra y el flujo. En algunos casos, se utilizan bombas separadas para el análisis de la muestra y para el lavado del sistema. La bomba de análisis puede tener una capacidad de aproximadamente 0.000001 mL a aproximadamente 10 mL, o aproximadamente 0.001 mL a aproximadamente 1 mL, o aproximadamente 0.01 mL a aproximadamente 0.2 mL, o aproximadamente 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, o 0.5 mL. Las bombas de lavado pueden ser de mayor capacidad que las bombas de análisis. Las bombas de lavado pueden tener un volumen de aproximadamente 0.01 mL a aproximadamente 20 mL, o aproximadamente 0.1 mL a aproximadamente 10 mL, o aproximadamente 0.1 mL a aproximadamente 2 mL, o aproximadamente 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, o 10 mL. Estos tamaños de bomba son sólo ilustrativos, y los expertos en el arte apreciarán que el tamaño de la bomba puede ser elegido de acuerdo con la aplicación, tamaño de la muestra, la viscosidad de líquido que se va a bombear, las dimensiones de tubos, velocidad de flujo, temperatura y otros factores bien conocidos en la técnica. En algunos casos, las bombas del sistema son impulsados por motores paso a paso, que son fáciles de controlar con mucha precisión con un microprocesador.

En los casos preferidos, las bombas de lavado y análisis se utilizan en serie, con válvulas de retención especiales para controlar la dirección del flujo. La tubería está diseñada de modo que cuando la bomba de análisis extrae la muestra máxima, la muestra no alcanza la propia bomba. Esto se logra mediante la elección del ID y la longitud de la tubería

entre la bomba de análisis y el capilar de análisis tal que el volumen del tubo sea mayor que el volumen de eyección de la bomba de análisis.

4. Detectores

5 En un caso, se detecta la luz (por ejemplo, la luz en el rango ultravioleta, visible o infrarrojo) emitida por una etiqueta fluorescente después de la exposición a la radiación electromagnética. El detector 309 (Figura 1A), o detectores (364, 365, Figura 1B), es capaz de capturar la amplitud y duración de las ráfagas de fotones a partir de un complejo de unidad estructural-etiqueta fluorescente, y convertir adicionalmente la amplitud y la duración de la ráfaga de fotones a señales eléctricas. Los dispositivos de detección, tales como cámaras CCD, cámaras del módulo de entrada de vídeo y cámaras Streak se pueden utilizar para producir imágenes con señales contiguas. En otro caso, se pueden utilizar dispositivos 10 tales como un bolómetro, un fotodiodo, una matriz de fotodiodos, fotodiodos en avalancha, y fotomultiplicadores que producen señales secuenciales. También se puede utilizar cualquier combinación de los detectores anteriormente mencionados. En un caso, se utilizan fotodiodos en avalancha para la detección de fotones.

15 Utilizando la óptica específica entre un espacio 314 de interrogación (Figura 2A) y su correspondiente detector 309 (Figura 1A), pueden ser detectadas varias características distintivas de la radiación electromagnética emitida incluyendo: longitud de onda de emisión, intensidad de emisión, tamaño de ráfaga, duración de la ráfaga, y la polarización de fluorescencia. En algunos casos, el detector 309 es un fotodiodo que se utiliza en polarización inversa. Un fotodiodo situado en polarización inversa por lo general tiene una resistencia muy alta. Esta resistencia se reduce cuando la luz de una frecuencia apropiada brilla en la unión P/N. Por lo tanto, un diodo polarizado en sentido inverso se puede utilizar como un detector mediante el control de la ejecución actual a través de este. Los circuitos basados en 20 este efecto son más sensibles a la luz que los basados en el sesgo cero.

En un caso del sistema de análisis, el fotodiodo puede ser un fotodiodo en avalancha, que puede ser operado con mucho mayor polarización inversa de fotodiodos convencionales, permitiendo así que cada portador de foto-generado para ser multiplicado por ruptura en avalancha, lo que resulta en el aumento de intervalo dentro del fotodiodo, lo que aumenta la capacidad de respuesta efectiva (sensibilidad) del dispositivo. La elección del fotodiodo se determina por la 25 longitud de onda de energía o emisión emitida por la partícula marcada con fluorescencia. En algunos casos, el fotodiodo es un fotodiodo de silicio que detecta la energía en el rango de 190 - 1100 nm; en otro caso, el fotodiodo es un fotodiodo de germanio que detecta la energía en el rango de 800 - 1700 nm; en otro caso, el fotodiodo es un fotodiodo de arseniuro de indio y galio que detecta la energía en el rango de 800 - 2600 nm; y aún en otros casos, el fotodiodo es un fotodiodo sulfuro de plomo que detecta la energía en el rango de entre menos de 1000 nm a 3500 nm. En algunos casos, el fotodiodo en avalancha es un detector de fotón único diseñado para detectar energía en el rango de longitud de onda 400 nm a 1100 nm. Los detectores de fotón único están disponibles comercialmente (por ejemplo, Perkin Elmer, Wellesley, MA).

35 En algunos casos el detector es un detector de fotodiodo en avalancha que detecta energía entre 300 nm y 1700 nm. En un caso, los fotodiodos en avalancha de silicio se pueden utilizar para detectar las longitudes de onda entre 300 nm y 1100 nm. Los fotodiodos de indio arseniuro de galio se pueden utilizar para detectar longitudes de onda entre 900 nm y 1700 nm. En algunos casos, un sistema de análisis puede comprender al menos un detector; en otros casos, el sistema de análisis puede comprender al menos dos detectores, y cada detector puede ser elegido y configurado para detectar energía de la luz en un rango de longitud de onda específica. Por ejemplo, dos detectores separados se pueden utilizar para detectar partículas que han sido etiquetadas con diferentes etiquetas, que tras la excitación con una fuente de EM, 40 emitirán fotones con energía en diferentes espectros. En un caso, un sistema de análisis puede comprender un primer detector que puede detectar energía fluorescente en el rango de 450-700 nm, tal como la emitida por un colorante verde (por ejemplo, Alexa 546); y un segundo detector que puede detectar energía fluorescente en el rango de 620-780 nm, tal como la emitida por un colorante rojo lejano (por ejemplo, Alexa 647). También se puede utilizar, los detectores de detección de la energía fluorescente en el rango de 400-600 nm tal como la emitida por los colorantes azules (por ejemplo, Hoechst 33342), y para la detección de energía en el rango de 560-700 nm, tal como la emitida por los colorantes rojos (Alexa 546 y Cy3).

45 Un sistema que comprende dos o más detectores se puede utilizar para detectar partículas únicas que son cada una etiquetadas con dos o más etiquetas que emiten luz en diferentes espectros. Por ejemplo, dos detectores diferentes pueden detectar un anticuerpo que ha sido etiquetado con dos etiquetas de colorantes diferentes. Alternativamente, un sistema de análisis que comprende dos detectores se puede utilizar para detectar partículas de diferentes tipos, cada tipo se etiqueta con moléculas de colorante diferentes, o con una mezcla de dos o más moléculas de colorante. Por ejemplo, dos detectores diferentes se pueden usar para detectar dos tipos diferentes de anticuerpos que reconocen dos proteínas diferentes, cada tipo que se está etiquetado con una etiqueta de colorante diferente o con una mezcla de dos o más moléculas de colorante de la etiqueta. Mediante la variación de la relación de las dos o más moléculas de 50 colorante de la etiqueta, dos o más tipos de partículas diferentes se pueden detectar individualmente utilizando dos detectores. Se entiende que tres o más detectores se pueden utilizar.

Se debe entender por un experto en el arte que uno o más detectores se pueden configurar en cada espacio de interrogación, ya sea uno o más espacios de interrogación se definen dentro de una celda de flujo, y que cada detector puede estar configurado para detectar cualquiera de las características de la radiación electromagnética emitida enumeradas anteriormente. El uso de múltiples detectores, por ejemplo, para múltiples espacios de interrogación, se ha revelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1. Una vez que una partícula se etiqueta para que sea detectable (o si la partícula posee una característica intrínseca que la haga detectable), cualquier mecanismo de detección apropiado conocido en la técnica se puede utilizar, por ejemplo una cámara CCD, una cámara de módulo de entrada de vídeo, una cámara Streak, un bolómetro, un fotodiodo, una matriz de fotodiodos, fotodiodos en avalancha, y fotomultiplicadores que producen señales secuenciales, y combinaciones de los mismos. Diferentes características de la radiación electromagnética se pueden detectar incluyendo: longitud de onda de emisión, intensidad de emisión, tamaño de ráfaga, duración de la ráfaga, la polarización de fluorescencia, y cualquier combinación de los mismos.

C. Sistema de muestreo

En un caso adicional, el sistema de análisis puede incluir un sistema de muestreo para preparar la muestra para su introducción en el sistema de análisis. El sistema de muestreo incluido es capaz de muestrear automáticamente una pluralidad de muestras y proporcionar una comunicación de líquido entre un recipiente de muestra y un primer espacio de interrogación.

En algunos casos, el sistema de análisis de la invención incluye un sistema de muestreo para la introducción de una alícuota de una muestra en el analizador de partícula única para el análisis. Se puede utilizar cualquier mecanismo que pueda introducir una muestra. Las muestras se pueden elaborar utilizando ya sea una succión de vacío creado por una bomba o por la presión aplicada a la muestra que empujaría el líquido en el tubo, o por cualquier otro mecanismo que sirve para introducir la muestra en el tubo de muestreo. Generalmente, pero no necesariamente, el sistema de muestreo introduce una muestra de volumen de muestra conocido en el analizador de partícula única; en algunos casos donde se detecta la presencia o ausencia de una partícula o partículas, el conocimiento preciso del tamaño de la muestra no es crítico. En casos preferidos el sistema de muestreo provee muestreo automatizado para una sola muestra o una pluralidad de muestras. En los casos donde se introduce una muestra de volumen conocido en el sistema, el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis de más de aproximadamente 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, o 2000 μL . En algunos casos el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis de menos de aproximadamente 2000, 1000, 500, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0.1, 0.01, o 0.001 μL . En algunos casos el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis de entre aproximadamente 0.01 y 1500 μL , o aproximadamente 0,1 y 1000 μL , o aproximadamente 1 y 500 μL , o aproximadamente 1 y 100 μL , o aproximadamente 1 y 50 μL , o aproximadamente 1 y 20 μL . En algunos casos, el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis de entre aproximadamente 5 μL y 200 μL , o aproximadamente 5 μL y aproximadamente 100 μL , o aproximadamente 5 μL y 50 μL . En algunos casos, el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis de entre aproximadamente 10 μL y 200 μL , o entre aproximadamente 10 μL y 100 μL , o entre aproximadamente 10 μL y 50 μL . En algunos casos, el sistema de muestreo provee una muestra para el análisis entre aproximadamente 0.5 μL y aproximadamente 50 μL .

En algunos casos, el sistema de muestreo provee un tamaño de la muestra que se puede variar de muestra a muestra. En estos casos, el tamaño de la muestra puede ser cualquiera de los tamaños de las muestras descritos en este documento, y se pueden cambiar con cada muestra, o con conjuntos de muestras, si se desea.

Exactitud del volumen de la muestra, y precisión del volumen muestra a muestra del sistema de muestreo, se requiere para el análisis que nos ocupa. En algunos casos, la precisión del volumen de muestreo se determina por las bombas utilizadas, por lo general representados por un CV de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, o 0.01% de volumen de muestra. En algunos casos, la precisión muestra a muestra del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, o 0.01% de volumen de muestra. En algunos casos, la precisión intra-ensayo del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente 10, 5, 1, 0,5, o 0.1%. En algunos casos, la precisión intraensayo del sistema de muestreo muestra un CV de menos de aproximadamente 5%. En algunos casos, la precisión inter-ensayo del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente 10, 5, o 1%. En algunos casos, la precisión inter-ensayo del sistema de muestreo muestra un CV de menos de aproximadamente 5%.

En algunos casos, el sistema de muestreo provee el traslado de la muestra, la ventaja de que no se requiere una etapa de lavado adicional entre muestras. Por lo tanto, en algunos casos, el traslado de muestra es menos de aproximadamente 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.005, o 0.001%. En algunos casos, el traslado de la muestra es menos de aproximadamente 0.02%. En algunos casos, el traslado de la muestra es menos de aproximadamente 0.01%.

En algunos casos el muestreador provee un bucle de muestra. En estos casos, múltiples muestras se toman en tubos de forma secuencial y cada uno se separa de los demás por un "tapón" de solución reguladora. Las muestras por lo general se leen una tras otra sin drenaje intermedio. El drenaje se realiza una vez al final del bucle. En los casos donde se utiliza un "tapón" de solución reguladora, el tapón se puede recuperar expulsando el tapón de solución reguladora en un pozo separado de una placa de microtitulación.

El sistema de muestreo se puede adaptar para su uso con equipos de ensayo estándar, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pozos, o, preferiblemente, una placa de 384 pozos. En algunos casos el sistema incluye un posicionador de una placa de 96 pozos y un mecanismo para sumergir el tubo de muestra dentro y fuera de los pozos, por ejemplo, un mecanismo que provee el movimiento a lo largo de los ejes X, Y, y Z. En algunos casos, el sistema de muestreo provee múltiples tubos de muestreo a partir del cual las muestras se pueden almacenar y extraer de, cuando se inició la prueba. En algunos casos, todas las muestras de los múltiples tubos se analizan en un detector. En otros casos, múltiples detectores de una única molécula pueden estar conectados a los tubos de muestra. Las muestras se pueden preparar mediante las etapas que incluyen operaciones realizadas en la muestra en los pozos de la placa antes del muestreo por el sistema de muestreo, o de la muestra se pueden preparar dentro del sistema de análisis, o alguna combinación de ambos.

D. Sistema de preparación de la muestra

La preparación de la muestra incluye las etapas necesarias para preparar una muestra cruda para su análisis. Estas etapas pueden incluir, a modo de ejemplo, una o más etapas de: etapas de separación tales como centrifugación, filtración, destilación, cromatografía; concentración, lisis celular, alteración del pH, adición de solución reguladora, adición de diluyentes, adición de reactivos, calentamiento o enfriamiento, adición de etiqueta, unión de etiqueta, la reticulación con la iluminación, separación de etiqueta no unida, inactivación y/o eliminación de compuestos que interfieren y cualquier otra de las etapas necesarias para que la muestra sea preparada para el análisis mediante el analizador de partículas únicas. En algunos casos, la sangre se trata para separar plasma o suero. Las etapas adicionales de etiquetado, eliminación de etiqueta no unida, y/o de dilución también se pueden realizar en la muestra de suero o plasma.

En algunos casos, el sistema de análisis incluye un sistema de preparación de la muestra que lleva a cabo todos o algunos de los procesos necesarios para proporcionar una muestra lista para el análisis por el analizador de partícula única. Este sistema puede realizar cualquiera o todas las etapas indicadas anteriormente para la preparación de la muestra. En algunos casos las muestras se procesan parcialmente por el sistema de preparación de la muestra del sistema de análisis. Por lo tanto, en algunos casos, una muestra puede ser parcialmente procesada fuera del primer sistema de análisis. Por ejemplo, la muestra se puede centrifugar primero. Entonces, la muestra puede ser parcialmente procesada en el interior del analizador por un sistema de preparación de la muestra. El procesamiento en el interior del analizador incluye la marcación de la muestra, mezclando la muestra con una solución reguladora y otras etapas de procesamiento que serán conocidas para alguien en el arte. En algunos casos, una muestra de sangre se procesa fuera del sistema de análisis para proporcionar una muestra de suero o plasma, que se introduce en el sistema de análisis y, además se procesa por un sistema de preparación de la muestra para etiquetar la partícula o partículas de interés y, opcionalmente, para eliminar la etiqueta no unida. En otros casos la preparación de la muestra puede incluir inmunocaída de la muestra para eliminar las partículas que no son de interés o para eliminar las partículas que pueden interferir con el análisis de la muestra. En aún otros casos, la muestra se puede someter a caída de partículas que pueden interferir con el análisis de la muestra. Por ejemplo, la preparación de muestras puede incluir la caída de los anticuerpos heterófilos, que son conocidos para interferir con inmunoensayos que utilizan anticuerpos no humanos para detectar directa o indirectamente una partícula de interés. Del mismo modo, otras proteínas que interfieren con las mediciones de las partículas de interés pueden ser retiradas de la muestra usando anticuerpos que reconocen las proteínas que interfieren.

En algunos casos, la muestra se puede someter a extracción en fase sólida antes de ser ensayadas y analizadas. Por ejemplo, una muestra de suero que se ensayó para cAMP primera se puede someter a extracción en fase sólida usando una columna C18 al que se une. Otras proteínas tales como proteasas, lipasas y fosfatasas se lavan de la columna, y la cAMP se eluye esencialmente libre de proteínas que pueden degradar o interferir con las mediciones de cAMP. La extracción en fase sólida se puede utilizar para eliminar la matriz básica de una muestra, lo que puede disminuir la sensibilidad del ensayo. En aún otros casos, las partículas de interés presentes en una muestra pueden ser concentradas por secado o liofilización de una muestra y la solubilización de las partículas en un volumen menor que el de la muestra original. Por ejemplo, una muestra de aliento condensado exhalado (EBC) se puede secar y se resuspenden en un pequeño volumen de una solución reguladora apropiado para mejorar la detección de la partícula de interés.

En algunos casos el sistema de análisis provee un sistema de preparación de la muestra que provee la preparación completa de la muestra a ser analizada en el sistema, tales como la preparación completa de una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de orina, una muestra de líquido cerebrospinal, una muestra de linfa, una muestra

de BAL, una muestra de condensado de aire exhalado (EBC), una muestra de biopsia, una muestra forense, una muestra de bioterrorismo, y similares. En algunos casos el sistema de análisis provee un sistema de preparación de la muestra que provee algunas o la totalidad de la preparación de la muestra. En algunos casos, la muestra inicial es una muestra de sangre que se procesa adicionalmente por el sistema de análisis. En algunos casos, la muestra es una muestra de suero o plasma que se procesa adicionalmente por el sistema de análisis. La muestra de suero o plasma se puede procesar adicionalmente, por ejemplo, poniéndola en contacto con una etiqueta que se une a una partícula o partículas de interés; la muestra puede entonces ser utilizada con o sin eliminación de etiqueta no unida.

En algunos casos, se lleva a cabo la preparación de muestras, ya sea fuera del sistema de análisis o en el componente de la preparación de muestras del sistema de análisis, en una o más placas de microtitulación, tal como una placa de 96 pozos. Depósitos de reactivos, soluciones reguladoras, y similares pueden estar en comunicación fluida intermitente con los pozos de la placa por medio de tubos u otras estructuras apropiadas, como son bien conocidos en la técnica. Las muestras se pueden preparar por separado en placas de 96 pozos o tubos. El aislamiento de la muestra, la unión de la etiqueta y, si fuera necesario, etapas de separación de la etiqueta, se pueden hacer en una placa. En algunos casos, las partículas preparadas entonces son liberadas de la placa y las muestras se mueven en tubos para el muestreo en el sistema de análisis de muestras. En algunos casos, todas las etapas de la preparación de la muestra se realizan en una placa y el sistema de análisis adquiere muestra directamente de la placa. Aunque este caso se describe en términos de una placa de 96 pozos, se apreciará que cualquier recipiente se puede utilizar para contener una o más muestras y apropiados para la preparación de la muestra. Por ejemplo, se pueden utilizar placas de microtitulación estándar de 384 o 1536 pozos. De manera más general, en algunos casos, el sistema de preparación de la muestra es capaz de contener y preparar más de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 500, 1000, 5000, o 10,000 muestras. En algunos casos, se pueden tomar muestras de múltiples muestras para su análisis en múltiples sistemas analizadores. Por lo tanto, en algunos casos, 2 muestras, o más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 50, o 100 muestras son muestreadas desde el sistema de preparación de la muestra y se ejecutan en paralelo en múltiples sistemas de análisis de la muestra.

Los sistemas de microfluidos también se pueden usar para la preparación de la muestra y como sistemas de preparación de muestras que son parte de sistemas de analizadores, especialmente para muestras sospechosas de contener concentraciones suficientes altas de partículas, que la detección requiera muestras más pequeñas. Los principios y técnicas de manipulación de microfluidos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,979,824; 5,770,029; 5,755,942; 5,746,901; 5,681,751; 5,658,413; 5,653,939; 5,653,859; 5,645,702; 5,605,662; 5,571,410; 5,543,838; 5,480,614, 5,716,825; 5,603,351; 5,858,195; 5,863,801; 5,955,028; 5,989,402; 6,041,515; 6,071,478; 6,355,420; 6,495,104; 6,386,219; 6,606,609; 6,802,342; 6, 749,734; 6,623,613; 6,554,744; 6,361,671; 6,143,152; 6,132,580; 5,274,240; 6,689,323; 6,783,992; 6,537,437; 6,599,436; 6,811,668 y solicitud de patente PCT publicada No. WO9955461(A1). Las muestras se pueden preparar en serie o en paralelo, para usar en un sistema de análisis único o múltiple.

Preferiblemente, la muestra comprende una solución reguladora. La solución reguladora se puede mezclar con la muestra fuera del sistema de análisis, o puede ser proporcionada por el mecanismo de preparación de la muestra. Mientras que cualquier solución reguladora apropiada se puede utilizar, la solución reguladora preferible tiene un fondo bajo de fluorescencia, es inerte a la partícula marcada de forma detectable, puede mantener el pH de trabajo y, en los casos en donde la fuerza motriz es electrocinética, tiene la fuerza iónica apropiada para electroforesis. La concentración de la solución reguladora puede ser cualquier concentración apropiada, tal como en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mM. Cualquier sistema de solución reguladora se puede utilizar siempre y cuando se provea la solubilidad, la función y la capacidad de detección de las moléculas de interés. Preferiblemente, para la aplicación mediante bombeo, la solución reguladora se selecciona del grupo que consiste en fosfato, glicina, acetato, citrato, acidulado, carbonato/bicarbonato, imidazol, trietanolamina, amida de glicina, borato, MES, Bis-Tris, ADA, aces, PIPES, MOPSO, Bis-Tris propano, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO, Trizma, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Tricina, Gly-Gly, Bicina, HEPBS, TAPS, AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS, y CABS. La solución reguladora también se puede seleccionar entre el grupo que consiste en Gly-Gly, bicina, tricina, ácido 2-morfolina etanosulfónico (MES), ácido 4-morfolina propanosulfónico (MOPS) y 2-amino-2-metil-1-propanol clorhidrato (AMP). Una solución reguladora útil es Tris/borato 2 mM a pH 8.1, pero también son aceptables Tris/glicina y Tris/HCl. Otras soluciones reguladoras son como se describen en este documento.

Las soluciones reguladoras útiles para la electroforesis se revelan en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 11/048,660, publicada como US2006/0078998 A1

E. Recuperación de la muestra

Una característica muy útil de los casos de los analizadores y sistemas de análisis descritos en este documento es que la muestra se puede analizar sin consumirla. Esto puede ser especialmente importante cuando los materiales de muestra son limitados. La recuperación de la muestra también permite hacer otros análisis o volver a analizarla. Las ventajas de esta característica para aplicaciones donde el tamaño de la muestra es limitado y/o donde es deseable la

capacidad para volver a analizar la muestra, por ejemplo, aplicaciones de diagnóstico clínico, forenses, detección de fármacos, y aplicaciones de diagnóstico clínico, serán evidentes para los expertos en el arte.

5 Por lo tanto, en algunos casos, el sistema de análisis descrito en este documento provee un sistema de recuperación de la muestra para la recuperación de la muestra después del análisis. En estos casos, el sistema incluye mecanismos y métodos por los cuales la muestra se introduce en el analizador, se analiza y luego regresa, por ejemplo, por el mismo camino, hasta el portador de la muestra, por ejemplo, el tubo de muestra. Debido a que ninguna de las muestras se destruye y puesto que no entra en ninguna de las válvulas u otros tubos, sigue sin contaminar. Además, debido a que todos los materiales en el trayecto de la muestra son altamente inertes, por ejemplo, PEEK, sílice fundida, o zafiro, hay poca contaminación de la trayectoria de la muestra. El uso de las bombas controladas con motor de pasos (en particular la bomba de análisis) permite un control preciso de los volúmenes extraídos e impulsados de regreso. Esto permite la recuperación completa o casi completa de la muestra con poca o ninguna dilución por la solución reguladora de lavado. Por lo tanto, en algunos casos, más de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, o 99.9% de la muestra se recuperó después del análisis. En algunos casos, la muestra recuperada es sin diluir. En algunos casos, la muestra recuperada se diluye menos de aproximadamente 1.5 veces, 1.4 veces, 1.3 veces, 1.2 veces, 1.1 veces, 1.05 veces, 1.01 veces, 1.005 veces o 1.001 veces.

20 Para el muestreo y/o recuperación de la muestra, se puede utilizar cualquier mecanismo para el transporte de una muestra de líquido de un recipiente de muestra al analizador. En algunos casos el extremo de entrada del capilar de análisis se ha conectado a una longitud corta de tubo, por ejemplo, tubo de PEEK que puede ser sumergido en un recipiente de muestra, por ejemplo, un tubo de ensayo o pozo de muestra, o puede ser mantenido por encima de un recipiente de residuos. Cuando se lava, para limpiar la muestra anterior del aparato, este tubo se coloca por encima del recipiente de residuos para atrapar los residuos de lavado. Cuando se extrae una muestra, el tubo se introduce en el pozo de muestra o tubo prueba. Normalmente la muestra se extrae de forma rápida, y luego se expulsa lentamente mientras se observan las partículas dentro de la muestra. Alternativamente, en algunos casos, la muestra se extrae lentamente durante al menos parte del ciclo de extracción; la muestra puede ser analizada mientras se extrae lentamente. Esto se puede seguir por un rápido retorno de la muestra y un lavado rápido. En algunos casos, la muestra puede ser analizada tanto en el ciclo de entrada (introducción) como de salida (extracción), lo que mejora la estadística de recuento, por ejemplo, de muestras pequeñas y diluidas, así como confirman los resultados, y similares. Si se desea guardar la muestra, puede ser impulsada hacia atrás hacia el mismo pozo de la muestra de donde viene, o a otro. Si no se desea guardar la muestra, el tubo se coloca sobre el recipiente de residuos.

30 VI. Métodos que utilizan el análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca

Los métodos de la presente invención hacen posible la medición de los niveles de troponina cardiaca en concentraciones muy inferiores que las medidas previamente. Aunque la troponina cardiaca es un marcador aceptado para el daño del músculo cardiaco, su utilidad ha sido limitada por el hecho de que, con los métodos actuales de análisis, sólo es detectable después de haberse producido un daño considerable en el músculo cardiaco, debido a la falta de sensibilidad de los métodos actuales. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the Redefinition of Myocardial Infarction ha recomendado que un aumento de la concentración de troponina cardiaca se define como una medida superior del percentil 99^o de la distribución de las concentraciones de troponina cardiaca en el grupo de referencia, un umbral muy bajo. Se recomienda una imprecisión total de (CV) en el límite de decisión de <10%. Sin embargo, la imprecisión analítica obtenida con inmunoensayos actualmente disponibles para las troponinas cardiacas no es uniforme, sobre todo en el rango de baja concentración. Además, los ensayos que están disponibles actualmente carecen de sensibilidad suficiente para detectar los niveles de troponina en sujetos no clínicos (normales), y no se ha definido un verdadero valor de referencia o un nivel de troponina definido en una población normal. Los sistemas de análisis descritos en este documento han demostrado ser capaces de detectar sistemáticamente los niveles de cTnl a concentraciones de menos de 10 pg/mL con una imprecisión total de menos de 10% (ver ejemplos). Por lo tanto, la invención provee, según se especifica en las reivindicaciones, los métodos para el diagnóstico, pronóstico o métodos de tratamiento basados en la detección de alta sensibilidad de troponina cardiaca en las personas.

50 Algunos ejemplos proveen un método para determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en un individuo mediante i) la determinación de una concentración de troponina cardiaca en una muestra o determinar las concentraciones de troponina cardiaca en una serie de muestras del individuo, donde la concentración se determina mediante un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en dicha muestra de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/mL; y ii) la determinación de un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en dicho individuo, basado en la concentración en la muestra, o en las concentraciones en la serie de muestras. El método para determinar la concentración de troponina cardiaca incluye cualquier método apropiado con la sensibilidad requerida, por ejemplo, los métodos descritos en este documento. En algunos casos, los métodos utilizan un método para determinar una concentración de troponina cardiaca en la muestra, donde el método comprende detectar moléculas únicas de troponina o complejos, o fragmentos de la misma.

5 En algunos casos, la concentración umbral de la troponina se determina por análisis de muestras, por ejemplo, muestras de sangre, suero, o plasma, a partir de una población aparentemente sana para la troponina cardiaca, por ejemplo, troponina I cardiaca, y determinar el nivel en el cual 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, o 99.9% de la caída de la población por debajo de ese nivel (concentración). Este valor es el valor umbral. En algunas realizaciones, tal como se especifica en las reivindicaciones, el valor umbral se fija en el percentil 99°. En algunos casos, el análisis se realiza usando un método con un nivel de detección para la troponina cardiaca de menos de aproximadamente 50, 20, 10, 5, o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 5 pg/mL.

10 En algunos casos, la invención provee un método para determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en un individuo mediante la comparación de un valor para una concentración de troponina cardiaca en una muestra del individuo con un valor normal o un rango de los valores normales para la troponina cardiaca, donde el valle normal o rango de valores normales se determina mediante un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en dicha muestra de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/mL; y ii) determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento en dicho individuo, basada en la comparación.

15 En algunas realizaciones, tal como se especifica en las reivindicaciones, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca o troponina T cardiaca. En algunas realizaciones, la troponina cardiaca es la troponina T cardiaca. En algunas realizaciones, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca. El método puede utilizar la troponina total de, por ejemplo, cTnI total, o cTnT, o cTnI total + cTnT, como se describe en la presente memoria, para determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento. En algunos casos, el método puede utilizar la concentración de la troponina
20 cardiaca libre, en complejo, o fragmentos de la troponina cardiaca, o una comparación de estos (por ejemplo, una relación), para determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento.

A. Muestras

25 La muestra o una serie de muestras puede ser cualquier muestra apropiada; como se especifica en las reivindicaciones, la(s) muestra(s) será(n) sangre, suero o plasma. En algunas realizaciones, la muestra o una serie de muestras son muestras de suero. El individuo puede ser un animal, por ejemplo, mamífero, por ejemplo, humano.

30 Una sola muestra se puede tomar, o se pueden toma una serie de muestras. Si se toma una serie de muestras, se pueden tomar en cualquier intervalo apropiado, por ejemplo, intervalos de minutos, horas, días, semanas, meses o años. En un marco clínico agudo, por lo general se tomará una serie de muestras en el transcurso de horas y días, con las muestras separadas por una cuestión de horas. Cuando un individuo es seguido por períodos más largos, intervalos de muestra pueden ser meses o años. El diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento se puede determinar a partir de una sola muestra, o de una o más de una serie de muestras, o de cambios en la serie de muestras, por ejemplo, un aumento en la concentración a una cierta velocidad puede indicar una condición severa mientras que aumento a un ritmo más lento o ningún aumento puede indicar una condición relativamente benigna o menos graves. La velocidad de cambio se puede medir en el transcurso de las horas, días, semanas, meses o años. La velocidad de cambio en un individuo dado, en algunos casos, puede ser más relevante que un valor absoluto. En un contexto agudo, una velocidad de cambio extremadamente rápida, por ejemplo, un "pico", puede indicar un evento cardiaco inminente, en progreso o reciente. En otros contextos, el aumento de los valores en un período de días, semanas, meses o años en un individuo puede indicar el progreso y el empeoramiento de daño cardiaco, por ejemplo, daño cardiaco debido a una condición cardiaca (por ejemplo, la hipertrofia cardiaca o insuficiencia cardiaca congestiva) o daño cardiaco debido a una
35 condición no cardiaca (por ejemplo, la toxicidad de la exposición al fármaco).

40 En algunas realizaciones, se toma al menos una muestra durante o después de una prueba de esfuerzo cardiaco. Por ejemplo, una muestra se puede tomar antes de la prueba de esfuerzo, y una o más muestras tomadas durante la prueba. Las desviaciones en los niveles de troponina cardiaca entre la muestra antes de la prueba y la(s) muestra(s) tomada(s) durante la prueba puede proporcionar información de diagnóstico o pronóstico, por ejemplo, indican la probabilidad de enfermedad de arteria coronaria u otra patología asociada con el músculo cardiaco. Se pueden realizar otras comparaciones, así como las comparaciones de ninguna de las muestras a niveles normales o de umbral, o determinación de una velocidad de cambio en la concentración de troponina cardiaca en las muestras, todos los cuales pueden proporcionar información útil con respecto a la salud cardiaca y cardiovascular, así como otras condiciones como se describe en este documento.

45 En algunos casos, se toma al menos una muestra en o cerca del momento en el cual, los individuos están presentes con un profesional de la salud con uno o más síntomas indicativos de una condición que puede implicar daño cardiaco. Los contextos en los cuales un individuo puede estar presente con un profesional de la salud incluyen, pero no se limitan a, la atención ambulatoria, cuidados de urgencia, cuidados críticos, cuidados intensivos, unidad de vigilancia, paciente ingresado en el hospital, paciente no hospitalizado, consultorio médico, clínica médica, contexto de respuesta de emergencia, incluyendo una ambulancia y situaciones de detección de salud. En algunos casos, una o más muestras se toman del individuo y se someten a ensayo para la troponina cardiaca localmente, i.e., en o cerca del entorno en
50

donde se toman las muestras. Por ejemplo, un individuo que se presenta a un hospital puede tener una o más muestras tomadas que se someten a ensayo para la troponina cardiaca en el hospital. En algunos casos, una o más muestras se toman a partir del individuo y se someten al análisis de troponina cardiaca en un laboratorio CLIA. En algunos casos, el individuo muestra uno o más síntomas compatibles con el síndrome coronario agudo. En algunos casos, el individuo muestra uno o más síntomas compatibles con AMI. Estos síntomas incluyen, pero no se limitan a, dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, niveles de enzimas anormales, y falta de aliento.

B. Determinación de diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento

En algunos casos, la etapa ii) incluye la comparación de dicha concentración o una serie de concentraciones con un valor normal para dicha concentración, comparar dicha concentración o serie de concentraciones con un nivel de umbral predeterminado, comparar dicha concentración o serie de concentraciones con un valor de referencia, o determinar una velocidad de cambio de la concentración de dicha serie de concentraciones.

En algunos casos, la etapa ii) comprende la comparación de dicha concentración de troponina en dicha muestra con una concentración umbral predeterminada, y determinar un diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento si la concentración de la muestra es mayor que el nivel de umbral. La concentración umbral se puede determinar, por ejemplo, determinando la concentración de percentil 99^o de la troponina en un grupo de individuos, y el establecimiento de dicha concentración umbral en dicha concentración de percentil 99^o. Un ejemplo de esto se da en los Ejemplos.

Los valores normales, los valores de umbral, la velocidad de cambio, las relaciones de los valores, y otros indicadores de diagnóstico y pronóstico útiles pueden ser establecidos por métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, estos valores se pueden determinar mediante la comparación de muestras de una población del estudio y una población de control, donde la población del estudio muestra el estado biológico para el cual el diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento, se desea y la población de control no presenta el estado biológico. En algunos casos, un estudio longitudinal se puede realizar, por ejemplo, la población del estudio puede ser un subconjunto de la población de control que, con el tiempo, muestra el estado biológico. Se apreciará que los datos de una pluralidad de estudios se pueden usar para determinar un valor de consenso o rango de valores para el normal, y para los niveles de pronóstico o de diagnóstico.

En el desarrollo de la prueba de diagnóstico o pronóstico, los datos para uno o más marcadores potenciales se pueden obtener a partir de un grupo de sujetos. El grupo de sujetos se divide en al menos dos grupos, y preferiblemente el primer grupo y el segundo grupo cada uno tiene un número aproximadamente igual de sujetos. El primer grupo incluye a sujetos que han sido confirmados como que tienen una enfermedad o, más en general, que están en un primer estado de condición. Por ejemplo, este primer grupo de pacientes puede ser aquellos que han tenido recientemente una incidencia de la enfermedad, o pueden ser los que tienen un tipo específico de enfermedad, como AMI. La confirmación del estado de condición se puede hacer a través de una prueba más rigurosa y/o costosa, como la MRI o CT. A partir de ahora, los sujetos en este primer grupo se conocen como "enfermos". El segundo grupo de sujetos no es más que aquellos que no entran en el primer grupo. Los sujetos en este segundo grupo pueden ser "no enfermos"; es decir, sujetos normales. Alternativamente, los sujetos en este segundo grupo se pueden seleccionar por mostrar un síntoma o una constelación de síntomas que imitan los síntomas presentados por los sujetos "enfermos". En incluso otra alternativa, este segundo grupo puede representar los que están en un momento diferente de incidencia de la enfermedad. Preferiblemente, los datos para el mismo grupo de marcadores están disponibles para cada paciente. Este grupo de marcadores puede incluir todos los marcadores candidatos que pueden ser sospechosos de ser relevante para la detección de una enfermedad o condición particular. No se requiere relevancia actual conocida. Ejemplos de las composiciones, los métodos y sistemas descritos en este documento pueden ser usados para determinar cuál de los marcadores candidatos son más relevantes para el diagnóstico de la enfermedad o condición. Los niveles de cada marcador en los dos grupos de sujetos pueden ser distribuidos a través de un amplio rango, por ejemplo, en forma de una distribución gaussiana. Sin embargo, no se requiere un ajuste de distribución.

1. Infarto agudo de miocardio

Los métodos de la invención son especialmente útiles en el diagnóstico, pronóstico y/o la selección del tratamiento en pacientes con sospecha de infarto agudo de miocardio (AMI). Las mediciones de troponina cardiaca individuales o en serie en pacientes con sospecha de AMI proporcionan información de pronóstico creciente que mejora el pronóstico e indica la intervención terapéutica temprana y apropiada para minimizar el riesgo de resultados adversos.

Por lo tanto, la especificación describe un método para diagnosticar, predecir y/o prevenir o tratar AMI en un individuo mediante el análisis de una muestra del individuo, por ejemplo, una muestra de sangre, muestra de plasma, y/o muestra de suero, para troponina cardiaca, por ejemplo, cTnI, y la detección de una concentración de troponina cardiaca en la muestra a un límite de detección de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/mL, en donde la concentración de troponina cardiaca en la muestra indica o predice AMI. La troponina cardiaca puede ser cTnI o cTnT, y puede ser troponina, total o una medida de una

5 forma particular, por ejemplo, libre, en forma de complejo, o fragmento; en algunas realizaciones, se utiliza una relación de una o más formas de la troponina, como se describe en este documento. En algunos casos, la cTnI total se mide en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, la cTnT total se mide en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, la cTnI total + cTnT se mide en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, el nivel de troponina cardiaca se determina en o cerca del momento en que el individuo está presente con a un profesional de la salud con síntomas indicativos de AMI. Estos síntomas incluyen, pero no se limitan a, dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, los niveles de enzimas anormales, y falta de aliento.

10 En algunos casos, se toma una serie de medidas, y un aumento en la concentración de troponina cardiaca en las muestras indica, predice, o provee una base para el pronóstico del AMI. En algunos casos, un aumento de más del 50%, más de 100%, más de 150%, más de 200%, más de 250%, más de 300%, más de 400%, o más de 500% del valor de referencia indica, predice, o provee una base para pronóstico del AMI. En algunos casos, un nivel de troponina cardiaca de por encima de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 pg/mL en una sola muestra indica, predice, o provee una base para el pronóstico del AMI, independientemente de los niveles de referencia, si se obtienen. En algunos casos, un nivel de troponina cardiaca de aproximadamente 1-10, o aproximadamente 5-15, o aproximadamente 10-50, aproximadamente de 10-200, aproximadamente 10-100, o aproximadamente 10-40, o aproximadamente 15-50, o aproximadamente 15-40, o aproximadamente de 20-200, aproximadamente 20-150, aproximadamente 20-100, aproximadamente 20-50, o aproximadamente 20-40, o aproximadamente 20-30 pg/mL indica, predice, o provee una base para el pronóstico de AMI.

20 En algunos casos el diagnóstico o pronóstico incluye la estratificación para el individuo, basada en la concentración de troponina cardiaca en la muestra o una serie de muestras. Tal estratificación puede estar basada en la concentración de troponina cardiaca en muestras individuales, la presencia de aumentos y/o el tamaño de los aumentos a partir de los valores de referencia en una serie de muestras, las relaciones de las diferentes formas de la troponina cardiaca, los valores absolutos para las diferentes formas de troponina cardiaca, la velocidad de cambio en la concentración para la troponina cardiaca o para una o más formas de la troponina cardiaca en una serie de muestras, el cambio en relaciones de las diferentes formas de troponina cardiaca en el tiempo en una serie de muestras, y cualquier otra información basada al menos en parte de la concentración de troponina cardiaca en la muestra o una serie de muestras. La estratificación puede estar basada en los valores obtenidos a partir de poblaciones de sujetos normales y enfermos, como se describe en este documento. El tratamiento apropiado también se puede determinar basándose en la estratificación del individuo.

30 En algunos casos, la concentración de troponina cardiaca se determina en combinación con uno o más otros marcadores, por ejemplo, se considera que los marcadores de isquemia miocárdica, infarto de miocardio o marcadores de accidente cerebrovascular, y las concentraciones de cada marcador determinan el diagnóstico, pronóstico, o método de tratamiento. Como será evidente para los expertos en el arte, otras indicaciones clínicas por lo general también se tendrán en cuenta, por ejemplo, EKG, los síntomas, la historia, y similares. Se pueden construir algoritmos apropiados para el diagnóstico, pronóstico, o tratamiento con base en las combinaciones de tales marcadores y las indicaciones clínicas en combinación con niveles de troponina.

40 Los marcadores útiles en combinación con la troponina cardiaca en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a la creatina quinasa (CK) y su banda miocárdica (MB) de la unidad estructural miocárdica CK, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (LDH), α -hidroxibutirato deshidrogenasa, mioglobina, transaminasa glutamato oxaloacetato, glucógeno fosforilasa BB, ácidos grasos libres no unidos, proteína de unión de ácidos grasos del corazón (H-FABP), la albúmina modificada por isquemia, la miosina de cadena ligera 1, la miosina de cadena ligera 2. Los marcadores de la inflamación y la inestabilidad de la placa útil en combinación con la troponina cardiaca en los métodos de la invención incluyen pero no se limitan a la proteína C-reactiva, recuento de glóbulos blancos, ligando CD40 soluble, mieloperoxidasa, proteína-1 quimioatrayente de monocitos, colina de sangre total, y proteína plasmática A asociada con el embarazo. Otros marcadores de la inflamación se pueden detectar, e incluyen combinaciones de IL-8, IL-1 β , IL6, IL10, TNF, e IL-12p70, así como otras citoquinas o marcadores que serán evidentes para los expertos en el arte.

50 En algunos casos, la troponina cardiaca, por ejemplo, cTnI, se mide conjuntamente, por ejemplo, en la misma muestra, o en muestras del mismo individuo tomadas en o cerca del mismo momento, con un marcador seleccionado del grupo que consta de creatina quinasa (CK) y su banda miocárdica (MB) de la unidad estructural miocárdica CK, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (LDH), α hidroxibutirato deshidrogenasa, mioglobina, transaminasa oxaloacetato glutamato, glucógeno fosforilasa BB, ácidos grasos libres no unidos, proteína de unión a ácidos grasos de corazón (H-FABP), albúmina modificada por isquemia, miosina de cadena ligera 1, y miosina de la cadena ligera 2. En algunos casos la troponina cardiaca, por ejemplo, cTnI, se mide junto con CK-MB, por ejemplo, en la misma muestra, o en muestras procedentes del mismo individuo tomadas en o cerca del mismo momento.

55 En algunos casos, la troponina cardiaca, sola o en combinación con otros marcadores o signos clínicos, medidos como se describe en este documento, se utiliza para determinar el reinfarcto. En algunos casos, la troponina cardiaca, sola o en combinación con otros marcadores o signos clínicos, medidos como se describe en este documento, se utiliza para

determinar las características de un infarto, por ejemplo, el tamaño, o la duración desde el infarto. En este último caso, los fragmentos de la troponina producidos por proteólisis en la sangre pueden ser comparados con la troponina total, cuanto mayor es la relación de fragmentos, mayor es el tiempo transcurrido desde el infarto.

2. Condiciones distintas de AMI

- 5 Los métodos de la invención también incluyen métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento con base en la concentración de troponina cardiaca en una muestra que son útiles en condiciones distintas de AMI.

Muchas condiciones incluyen daño cardiaco potencial o real, y la capacidad de medir la troponina cardiaca en los niveles descritos en este documento permite la detección temprana de dicho daño y la intervención temprana. El conocimiento de la concentración de troponina cardiaca como se mide por los métodos y composiciones de la invención es útil en el diagnóstico, el pronóstico, y la determinación del tratamiento para tales condiciones. Las condiciones incluyen intervenciones percutáneas coronarias, cirugía cardiaca, insuficiencia cardiaca, fiebre reumática aguda, la amiloidosis, trauma cardiaco (incluyendo contusión, ablación, ritmo, interrupción, cardioversión, cateterismo y la cirugía cardiaca), lesión por reperfusión, cardiotoxicidad de la terapia del cáncer, insuficiencia cardiaca congestiva, la insuficiencia renal crónica, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II (enfermedad de Pompe), trasplante de corazón, hemoglobinopatía con hemosiderosis por transfusión, hipertensión, incluyendo hipertensión gestacional, hipotensión, a menudo con arritmias, hipotiroidismo, miocarditis, pericarditis, cirugía no cardiaca post-operatoria, embolia pulmonar, y sepsis.

En estos casos, los niveles de troponina se pueden determinar de forma concomitante con los niveles de marcador(es) que son específicos para la enfermedad no cardiaca u otros síntomas o signos clínicos de la enfermedad; la concentración y/o información de marcador(es) con respecto a otros síntomas o signos clínicos se combina con la información con respecto a las concentraciones de troponina cardiaca, determinaron como se describe en este documento, para determinar un diagnóstico, pronóstico y/o método de tratamiento. Por ejemplo, los casos de la invención pueden emplear, además de la determinación de la concentración de troponina cardiaca, determinación de la concentración de uno o más de los polipéptidos anteriormente mencionados, u otros marcadores de proteínas útiles en el diagnóstico, pronóstico, o la diferenciación de la enfermedad. En algunos casos, se provee un panel de marcadores para la enfermedad, en donde el panel incluye la concentración de troponina cardiaca, como se describe en este documento, y al menos en otro marcador para la enfermedad. El panel puede incluir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o más o marcadores individuales, que incluyen uno o más troponinas cardiacas, por ejemplo, la cTnl total. El análisis de un marcador individual o subconjuntos de marcador se puede llevar a cabo por un experto en el arte para optimizar la sensibilidad o especificidad clínica en diversos entornos clínicos. Estos incluyen, pero no se limitan a, la atención ambulatoria, cuidados de urgencia, cuidados intensivos, terapia intensiva, unidad de supervisión, paciente internado en el hospital, paciente no hospitalizado, consultorio médico, clínica médica, y situaciones de detección de salud. Además, un experto en el arte puede utilizar un solo marcador o un subconjunto de los marcadores en combinación con un ajuste del umbral de diagnóstico en cada uno de los ajustes antes mencionados para optimizar la sensibilidad y especificidad clínicas.

a. La toxicidad cardiaca Los métodos de la invención son especialmente útiles en la determinación y el seguimiento de la toxicidad cardiaca que resulta de un tratamiento, por ejemplo, toxicidad cardiaca del tratamiento farmacológico. Así, por ejemplo, la especificación provee un método de evaluación de la toxicidad cardiaca de un tratamiento mediante la medición de troponina cardiaca en un individuo mediante i) la determinación de una concentración de troponina cardiaca en una muestra o determinar las concentraciones de troponina cardiaca en una serie de muestras procedentes del individuo, donde al menos una de las muestras se toma de la persona durante o después de un tiempo cuando el individuo está recibiendo el tratamiento, donde la concentración o concentraciones se determina mediante un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en dicha muestra de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 10, 5, 4,3,2 o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/mL; y ii) la evaluación del grado de toxicidad cardiaca del tratamiento en base a dicha concentración o concentraciones. En algunos casos, el tratamiento es un tratamiento farmacológico. En algunos casos, el tratamiento es un tratamiento no farmacológico. El método para determinar la concentración de troponina cardiaca incluye cualquier método apropiado con la sensibilidad requerida, por ejemplo, los métodos descritos en este documento. En algunos casos, los métodos utilizan un método para determinar una concentración de troponina cardiaca en la muestra, donde el método comprende detectar moléculas individuales de troponina o complejos, o fragmentos de los mismos.

Especialmente útiles son los métodos de determinación de la toxicidad cardiaca utilizando los anticuerpos de reacción con cruzamiento descritos en este documento, i.e., los anticuerpos que reaccionan con troponina a partir de al menos dos especies, tales como humanos y otras especies, tales como rata, perro, ratón, o mono. Tales anticuerpos se pueden usar en estudios con animales de la toxicidad del fármaco, donde el individuo para el que se evaluó la toxicidad es, por ejemplo, un mamífero, tal como una rata, ratón, perro, mono, u otro animal utilizado en tales estudios. La toxicidad en varias especies se puede comparar directamente cuando el anticuerpo utilizado en el ensayo es el mismo anticuerpo, reduciendo así la variabilidad.

Se apreciará que los métodos de la invención pueden ser usados en conjunción con fármacos específicos cuyos efectos secundarios incluyen la cardiotoxicidad con el fin de controlar la toxicidad cardiaca. Por lo tanto, la especificación provee métodos para el seguimiento de la toxicidad cardiaca en un individuo que está recibiendo un fármaco que se sabe que causa toxicidad cardiaca determinando la concentración de troponina cardiaca en una o más muestras obtenidas del individuo, donde la concentración o concentraciones se determina por un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en dicha muestra o muestras de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 10, 5, 4, 3, 2 o 1 pg/mL, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/mL; y ii) evaluar el grado de toxicidad cardiaca del tratamiento con fármacos en base a dicha concentración o concentraciones. En algunos casos el método incluye además una etapa iii) determinar si continuar o no con el tratamiento farmacológico basado en la evaluación de la etapa ii). Los fármacos cuyos efectos secundarios incluyen toxicidad cardiaca son bien conocidos en la técnica.

C. Métodos comerciales

Se describen en este documento sistemas y métodos (incluyendo métodos comerciales) para el establecimiento de los marcadores de la troponina cardiaca que se pueden usar para diagnosticar, pronosticar, o determinar un método de tratamiento de un estado biológico o una condición en un organismo, la preparación de diagnósticos basados en tales marcadores y diagnósticos de mercadeo/comercialización y servicios que utilizan tales diagnósticos. El estado biológico puede ser de infarto agudo de miocardio, o daño cardiaco debido a la toxicidad de los fármacos, o los estados no-AMI como se describe en este documento.

En un caso, los métodos comerciales en el presente documento comprenden: el establecimiento de uno o más marcadores de troponina cardiaca utilizando un método que comprende: el establecimiento de un rango de concentraciones para dicho marcador o marcadores en muestras biológicas obtenidas a partir de una primera población mediante la medición de las concentraciones del marcador o marcadores en las muestras biológicas mediante la detección de moléculas únicas del marcador o marcadores en un nivel de detección de menos de aproximadamente 50, 20, 10, 5, o 1 pg/mL; y la comercialización del uno o más marcadores establecidos en la etapa anterior, por ejemplo, en un producto de diagnóstico. El producto de diagnóstico en este documento puede incluir uno o más anticuerpos que se une específicamente al marcador de la troponina cardiaca y una unidad estructural fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios.

En un caso, los métodos comerciales en el presente documento comprenden: el establecimiento de un rango de valores normales para un marcador de troponina cardiaca utilizando un sistema que comprende: el establecimiento de un rango de concentraciones para dicho marcador de troponina cardiaca en muestras biológicas obtenidas a partir de una primera población mediante la medición de las concentraciones del marcador de las muestras biológicas mediante la detección de moléculas únicas del marcador a un nivel de detección menos de aproximadamente 50, 20, 10, 5, o 1 pg/mL; y proporcionar un servicio de diagnóstico para determinar si un organismo tiene o no tiene un estado o condición de interés, por ejemplo, el AMI, la toxicidad cardiaca debido al tratamiento farmacológico, o una condición no-AMI. Un servicio de diagnóstico en este documento puede ser proporcionado por un laboratorio aprobado por CLIA que está autorizado en la empresa o el negocio en sí. Los servicios de diagnóstico en este documento pueden ser prestados directamente a un proveedor del cuidado de la salud, un asegurador del cuidado de la enfermedad, o un paciente. Así, los métodos comerciales en este documento pueden generar ingresos por la venta, por ejemplo, de servicios de diagnóstico o productos de diagnóstico.

Los métodos comerciales en este documento también contemplan la prestación de servicios de diagnóstico, por ejemplo, para proveedores de cuidados de salud, aseguradores, pacientes, etc. El negocio en este documento puede proporcionar servicios de diagnóstico a través de un contrato con un laboratorio de servicios o el establecimiento de un laboratorio de servicio (bajo Clinical Laboratory Improvement Amendment (CLIA) u otra aprobación reglamentaria). Dicho laboratorio de servicio, entonces se puede llevar a cabo los procedimientos revelados en este documento para identificar si un marcador de troponina cardiaca se encuentra dentro de una muestra.

VII. Composiciones

La memoria descriptiva describe composiciones útiles en la detección y cuantificación de la troponina cardiaca. Las composiciones incluyen asociados de unión con la troponina cardiaca que se marcan con etiquetas apropiadas para la detección por los métodos de la invención, pares de asociados de unión en donde uno o ambos de los asociados de unión se marcan con etiquetas apropiadas para la detección por medio de los métodos de la invención, soportes sólidos a los que asociados unión de captura están unidos, en algunos casos también con asociados de unión de detección.

Los casos de ejemplo incluyen una composición para la detección de la troponina cardiaca que incluye un asociado de unión con la troponina cardiaca unida a una unidad estructural fluorescente, donde la unidad estructural fluorescente es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se simula por un emisor de luz láser a la

longitud de onda de excitación de la unidad estructural, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micras de diámetro que contiene la unidad estructural, y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos, el asociado de unión incluye un anticuerpo para la troponina cardíaca. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de reacción con cruzamiento, por ejemplo, un anticuerpo que reacciona con cruzamiento con troponina cardíaca de por lo menos dos especies, por ejemplo, al menos dos especies seleccionadas del grupo que consiste de humano, mono, perro, y ratón. En algunos casos el anticuerpo reacciona con cruzamiento con troponinas cardíacas de todos humanos, mono, perro, y ratón. En algunos casos, la troponina cardíaca se selecciona del grupo que consiste de cTnI y cTnT. En algunos casos, la troponina cardíaca es cTnI. En algunos casos, la troponina cardíaca es cTnT. El anticuerpo puede ser específico a una región específica de la molécula de troponina, por ejemplo, específico para una región que comprende los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardíaca. La unidad estructural fluorescente puede contener una o más moléculas que comprende al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en donde el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancia conjugada. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas del grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 647, 700, o 750. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas del grupo constituido por Alexa Fluor 488, 532, 700, o 750. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 488. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 555. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 610. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 647. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 680. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 700. La composición de etiqueta puede incluir una unidad estructural fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 750.e

En algunos casos, la especificación describe una composición que incluye un conjunto de estándares para la determinación de una concentración de una troponina cardíaca, en donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardíaca menos de aproximadamente 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 pg/mL. En algunos casos, la especificación describe una composición que incluye un conjunto de estándares para determinar una concentración de una troponina cardíaca, en donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardíaca de menos de aproximadamente 20 pg/mL. En algunos casos, la especificación describe una composición que incluye un conjunto de estándares para la determinación de una concentración de una troponina cardíaca, en donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardíaca menos de aproximadamente 10 mg/mL. En algunos casos, la especificación describe una composición que incluye un conjunto de estándares para la determinación de una concentración de una troponina cardíaca, en donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardíaca de menos de aproximadamente 5 pg/mL. En algunos casos, la especificación describe una composición que incluye un conjunto de estándares para determinar una concentración de una troponina cardíaca, en donde al menos uno de los estándares está a una concentración de troponina cardíaca de menos de aproximadamente 1 pg/mL.

Otras composiciones son como se describen en este documento.

VIII. Kits

La especificación describe adicionalmente kits. Los kits descritos en este documento incluyen una o más composiciones útiles para la detección sensible de la troponina cardíaca, como se describe en este documento, en un embalaje apropiado. En algunos casos los kits descritos en este documento proporcionan etiquetas, por ejemplo, asociado de unión tal como un anticuerpo que es específico para troponina cardíaca, donde el asociado de unión está unido a una unidad estructural fluorescente. En algunos casos los kits descritos en este documento proporcionan pares de asociados de unión, por ejemplo, pares de anticuerpos, que son específicos para la troponina cardíaca, donde al menos uno de los asociados de unión es una etiqueta para una troponina cardíaca, como se describe en este documento. En algunos casos, los asociados de unión, por ejemplo, anticuerpos, se proporcionan en recipientes separados. En algunos casos, los asociados de unión, por ejemplo, anticuerpos, se proporcionan en el mismo recipiente. En algunos casos, uno de los asociados de unión, por ejemplo, anticuerpo, se inmoviliza sobre un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o una perla paramagnética. En algunos de estos casos, el otro asociado de unión, por ejemplo, anticuerpo, se marca con una unidad estructural fluorescente tal como se describe en este documento.

Los asociados de unión, por ejemplo, anticuerpos, soportes sólidos, y etiquetas fluorescentes para los componentes de los kits puede ser cualquier tipo de componentes apropiados tal como se describe en este documento.

Los kits pueden incluir adicionalmente reactivos útiles en los métodos descritos en este documento, por ejemplo, soluciones reguladoras y otros reactivos usados en las reacciones, lavados, soluciones reguladoras u otros reactivos de unión para el preacondicionamiento del instrumento en el cual se realizarán los ensayos, y las soluciones reguladoras de elución u otros reactivos para realizar las muestras a través del instrumento.

- 5 Los kits pueden incluir uno o más estándares, por ejemplo, los estándares para el uso en los ensayos descritos en este documento, tales como los estándares altamente purificados de por ejemplo, recombinante, cTnI humana o cTnT humana, o diversos fragmentos, complejos, y similares, de los mismos. Los kits pueden incluir además instrucciones.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitar la divulgación restante.

- 10 A menos que se especifique lo contrario, se analizaron muestras de procesamiento en los Ejemplos en un detector de molécula única (SMD) como se describe en este documento, con los siguientes parámetros: Láser: láser diodo de arsenito de galio de onda continua de longitud de onda de 639 nm (Blue Sky Research, Milpitas, CA), enfocado a un tamaño de punto de aproximadamente 2 micras (espacio de interrogación de 0.004 pL como se define en este documento); velocidad de flujo = 5 microlitros/min a través de un capilar de sílice fundida de ID de 100 micras cuadradas y OD de 300 micras cuadradas; configuración no confocal de lentes (véase, por ejemplo, la Fig. 1A); centrando la lente de apertura numérica 0.8 (Olympus); detector de fotodiodos en avalancha de silicio (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Ejemplo 1. Ensayos sándwich de biomarcadores: troponina I cardiaca (cTnI)

- 20 El ensayo: El propósito de este ensayo fue detectar la presencia de Troponina I cardiaca (cTnI) en suero humano. El formato de ensayo fue un inmunoensayo de tipo sándwich de dos etapas basado en un anticuerpo de captura monoclonal de ratón y un anticuerpo de detección policlonal de cabra. Se requieren diez microlitros de muestra. El intervalo de trabajo del ensayo es de 0 - 900 pg/mL con un límite analítico típico de detección de 1 - 3 pg/mL. El ensayo requiere aproximadamente cuatro horas de tiempo de banco para completarlo.

- 25 Materiales: los siguientes materiales se utilizan en el procedimiento descrito a continuación: Placa de ensayo: Nunc Maxisorp, producto 464718, 384 pozos, claro, recubiertos de forma pasiva con anticuerpo monoclonal, BiosPacific A34440228P Lote # A0316 (5 µg/mL en carbonato de sodio 0.05 M pH 9.6, durante la noche a temperatura ambiente); se bloqueó con 5% de sacarosa, BSA al 1% en PBS, y se almacenó a 4 °C. Para la curva estándar, se utilizó Troponina I cardiaca humana (BiosPacific Cat # J34000352). El diluyente para las concentraciones estándar fue suero humano que fue sometido a inmunocaída de la cTnI endógena, se dividió en alícuotas y se almacenó a - 20 °C. La dilución de los estándares se hizo en un 96 pozos, cónica, polipropileno, (Nunc producto # 249 944). Se usaron los siguientes soluciones reguladoras y soluciones: (a) solución reguladora de ensayo: BBS con 1% de BSA y 0.1% de Triton X-100; (b) solución de bloqueo pasivo en solución reguladora de ensayo que contiene 2 mg/mL de IgG de ratón, (Equitech Bio); 2 mg/mL de IgG de cabra, (Equitech Bio); y 2 mg/mL de MAK33 poli, Roche # 11939661; (c) anticuerpo de detección (Ab): la afinidad del anticuerpo policlonal de cabra purificado a Péptido 3, (BiosPacific G129C), que fue marcado con un colorante fluorescente Alexa Fluor 647, y se almacenó a 4 °C; diluyente de anticuerpo de detección: 50% de solución reguladora de ensayo, 50% de solución de bloqueo pasivo; solución reguladora de lavado: solución salina reguladora de borato Solución reguladora de Triton (BBST) (borato 1.0 M, cloruro de sodio 15.0 M, Triton X-100 al 10%, pH 8.3); solución reguladora de elución: BBS con urea 4 M, Triton X-100 al 0.02%e y BSA al 0.001%.

- 40 Preparación de anticuerpos marcados con Alexa Fluor 647: el anticuerpo de detección G-129-C se conjugó con Alexa Fluor 647, disolviendo en primer lugar 100 µg de G-129-C en 400µL de la solución reguladora de acoplamiento (NaHCO₃ 0.1M). La solución de anticuerpo se concentró luego a 50 µl mediante la transferencia de la solución en filtro YM-30 y sometiendo la solución y el filtro de la centrifugación. A continuación, el filtro YM-30 y el anticuerpo se lavaron tres veces mediante la adición de 400µl de la solución reguladora de acoplamiento. El anticuerpo se recuperó mediante la adición de 50 µl al filtro, invirtiendo el filtro, y centrifugando durante 1 minuto a 5,000 x g. La solución del anticuerpo resultante fue 1-2 µg/µl. Se reconstituyó Alexa Fluor 647 NHS éster, mediante la adición de 20 µl de DMSO a un vial de Alexa Fluor 647, esta solución se almacenó a -20 °C hasta por un mes. Se adicionaron 3µL de solución stock de Alexa Fluor 647 a la solución de anticuerpo, que después se mezclan y se incuban en la oscuridad durante una hora. Después de una hora, se adicionaron 7.5µl de tris 1M a la solución de anticuerpo Alexa Fluor 647 y se mezclaron. La solución se ultrafiltra con YM-30 para eliminar los componentes de bajo peso molecular. El volumen del material retenido, que contenía el anticuerpo conjugado con Alexa Fluor 647, se ajustó a 200-400 µl mediante la adición de PBS. 3µL de NaN₃ al 10% se adicionaron a la solución, la solución resultante se transfirió a una unidad de centrifuga Ultrafree 0.22 y se centrifugó durante 2 minutos a 12,000 x g. El filtrado que contiene el anticuerpo conjugado se recogió y se utilizó en los ensayos.

Procedimiento: preparación de muestras y estándar de cTnI y análisis:

ES 2 550 004 T3

La curva estándar se preparó de la siguiente manera: se prepararon patrones de trabajo (0 - 900 pg/mL) por medio de diluciones en serie de las soluciones stock de cTnI en diluyente estándar o para lograr un rango de concentraciones de cTnI de entre 1.2 pg/mL – 4.3 µg/mL.

5 Se adicionaron a cada pozo 10 µL de solución de bloqueo pasivo y 10 µL de estándar o de la muestra. Los estándares se realizaron por cuadruplicado. La placa se selló con película de sellado Axysel, se centrifugó durante 1min a 3000 RPM, y se incubó durante 2 horas a 25 °C con agitación. La placa se lavó cinco veces, y se centrifugó hasta que el rotor alcanzó 3000 RPM en una posición invertida sobre una toalla de papel. Se preparó una dilución de trabajo 1 nM de anticuerpo de detección, y se adicionaron 20 µL de anticuerpo de detección a cada pozo. La placa se selló y se centrifugó, y el ensayo se incubó durante 1 hora a 25 °C con agitación. Se añadieron 30 µL de solución reguladora de elución por pozo, la placa se selló y se incubó durante el ensayo ½ hora a 25 °C. La placa se almacenó durante hasta 48 horas a 4 °C antes del análisis, o la muestra se analizó inmediatamente.

15 Para el análisis, se adquirieron 20 µL por pozo a 40 µL/minuto, y se analizaron 5 µL a 5 µL/minuto. Se analizaron los datos en función de un umbral de 4 sigma. Se registró la señal en bruto frente a la concentración de los estándares. Un ajuste lineal se realizó para el rango de concentración bajo, y se realizó un ajuste no lineal para la curva estándar completa. El límite de detección (LoD) se calculó como $LOD = (3 \times \text{desviación estándar de ceros}) / \text{pendiente del ajuste lineal}$. Las concentraciones de las muestras se determinaron a partir de la ecuación (no lineal o lineal) apropiada para la señal de la muestra.

20 Una alícuota se bombeó en el analizador. Se midieron los anticuerpos marcados individualmente durante el flujo capilar ajustando el volumen de interrogación de tal manera que se detectó la emisión de solamente 1 etiqueta fluorescente en un espacio definido siguiendo la excitación láser. Con cada señal que representa un evento digital, esta configuración permite sensibilidades analíticas extremadamente altas. Señal fluorescente total se determina como una suma de los eventos digitales individuales. Cada molécula contada es un punto de datos positivo con cientos de miles de eventos DMC /muestra. El límite de detección del ensayo de cTnI de la invención se determinó por el método de la media + 3 SD.

25 Resultados: Los datos para una curva estándar cTnI típica medida por cuadruplicado utilizando el protocolo de ensayo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Curva estándar para cTnI

cTnI (pg/mL)	Señal	Desviación estándar	% CV
0	233	25	10.8
1.5625	346	31	8.9
3.125	463	35	7.5
6.25	695	39	5.6
12.5	1137	61	5.3
25	1988	139	7.0
50	3654	174	4.8
100	5493	350	6.4
200	8264	267	3.2
400	9702	149	1.5
800	9976	50	0.5

La sensibilidad del sistema de análisis se probó en 15 análisis y se encontró de forma rutinaria que detecta niveles sub femtomol/l (FM) de calibrador, como se muestra por los datos en la Tabla 3. La precisión fue del 10% a 4 y 12 pg/mL de cTnl.

Tabla 3

Sensibilidad Instrumento

Calibrador (FM)	Cuenta señal	CV
0	11	
12	302	9
60	1341	8
300	4784	7

La curva estándar linealizada para los rangos de concentraciones de cTnl se muestra en la figura 5.

El límite analítico de detección (LoD) se determinó a través de 15 ensayos secuenciales. El LoD fue la media de las determinaciones intra-ensayo $0 \text{ std} + 3 \text{ SD}$ ($n = 4$). La media de LoD fue de 1.7 pg/mL (rango 0.4 a 2.8 pg/mL).

10 La recuperación de la muestra se determinó mediante el análisis de muestras de suero que habían sido sometidas a inmunocaída de cTnl y se reforzaron con cantidades conocidas de cTnl. La Tabla 4 muestra los datos de recuperación de la muestra por el sistema analizado más de 3 días.

Tabla 4

Recuperación de la Muestra

Pico (pg/mL)	Recuperación (media)	Desviación Estándar	% CV
5	5.7	0.9	16
15	13.7	0.2	2
45	43	0.6	2
135	151	6.2	4

15 La linealidad del ensayo se determinó en el suero humano agrupado que se reforzó con cTnl y se diluyó con diluyente estándar. Los resultados en 56, muestran las diluciones y el % de la señal esperada para la dilución correspondiente.

Tabla 5

Ensayo de linealidad

Dilución de suero	% de lo esperado
1:2	79
1:4	87
1:8	96

Estos datos muestran que el sistema de análisis de la invención permite realizar el inmunoensayo altamente sensible inducido por láser para concentraciones sub-femtomolares de cTnl.

Ejemplo 2: Ensayos basados en Sándwich-Perla para Tnl:

5 Los ensayos descritos anteriormente utilizan el mismo formato de placa de microtitulación donde se utiliza la superficie de plástico para inmovilizar las moléculas diana. El sistema de análisis de partícula única también es compatible con los ensayos realizados en solución utilizando micropartículas o perlas para conseguir la separación de entidades unidas de no unidas.

10 Materiales: se obtienen micropartículas MyOne Estreptovidina C1 (MP) de Dynal (650.01-03, 10 mg/mL de stock). Las soluciones reguladoras utilizadas en el ensayo incluyen: 10X solución salina reguladora de borato Solución reguladora Triton (BBST) (borato 1.0 M, cloruro de sodio 15.0 M, Triton X-100 al 10%, pH 8.3); solución reguladora de ensayo (2 mg/mL de IgG de cabra normal, 2 mg/mL de IgG de ratón normal, y 0.2 mg/mL de MAB-33-IgG-polímero en 0.1 M de Tris (pH 8.1), EDTA 0.025 M, NaCl 0.15 M, BSA al 0.1%, Triton X-100 al 0.1%, NaN₃ al 0.1% y, almacenada a 4°C); y solución reguladora de elución (BBS con urea 4 M, 0.02% de Triton X-100, y 0.001% de BSA, se almacena a 2-8°C). Los anticuerpos utilizados en el ensayo basado en perlas sándwich incluyen: Bio-Ab (A34650228P (BiosPacific) con 1-2 biotinas por IgG) y Det-AB (G-129-C (BiosPacific) conjugado con A647, 2-4 compuestos fluorescentes por IgG). El estándar es la troponina I cardiaca humana recombinante (BiosPacific, cat # J34120352). El diluyente calibrador es 30 mg/mL de BSA en TBS wEDTA.

20 Recubrimiento de las micropartículas: 100 ul de la solución stock de MP se colocan en un tubo Eppendorf. Las MP se lavan tres veces con 100 ul de solución reguladora de lavado BBST, mediante la aplicación de un imán, eliminando el sobrenadante, eliminando el imán, y se resuspendieron en solución reguladora de lavado. Después de los lavados las MP se resuspenden en 100 ul de solución reguladora de ensayo y se adicionaron 15 ug de Bio-Ab. La mezcla se incubó a continuación durante una hora a temperatura ambiente con mezcla constante. Las MP se lavaron cinco veces con solución reguladora de lavado 1 mL, como se describió anteriormente. Después de los lavados de las MP se resuspenden en 15 mL de solución reguladora de ensayo (o 100 ul para almacenar a 4 °C).

25 Preparación de estándar y muestras: El estándar se diluye con diluyente calibrador para preparar la curva estándar apropiada (por lo general 200 pg/mL a 0.1 pg/mL). Muestras de suero y plasma congelado necesitan ser centrifugadas 10 minutos a temperatura ambiente a 13K rpm. El suero/plasma aclarado se retira con cuidado para evitar la adopción de cualquier posible pelet o flotador y se pone en tubos nuevos. 50 ul de cada estándar o muestra se colocan con pipeta en los pozos apropiados.

30 Captura diana: 150 ul de MP (después de la resuspensión a 15 mL en solución reguladora de ensayo + NaCl 400 mM) se adicionan a cada pozo. La mezcla se incubó en JitterBug, 5 a temperatura ambiente durante 1 hr.

35 Lavado y Detección: La placa se coloca en un imán y el sobrenadante se elimina después de asegurarse de que todas las MP sean capturadas por el imán. 250 ul de solución reguladora de lavado se adicionan después de quitar la placa del imán. La placa se coloca entonces sobre el imán y el sobrenadante se elimina después de asegurarse de que todas las MP son capturadas por el imán. Se adicionan 20 ul de Det-Ab por pozo (Det-Ab a 500 ng/mL se diluye en solución reguladora de ensayo + NaCl 400 mM)). La mezcla se incubó en JitterBug, 5 a temperatura ambiente durante 30 min.

40 Lavado y elución: La placa se coloca en un imán y se lava tres veces con solución reguladora de lavado. El sobrenadante se elimina después de asegurarse que todas las MP sean capturadas por el imán y se adicionaron 250 ul de solución reguladora de lavado. Después de los lavados las muestras se transfieren a una nueva placa de 96 pozos. A continuación, la nueva placa se coloca en el imán y el sobrenadante se elimina después de asegurarse de que todas las MPs sean capturadas por el imán. A continuación se adicionan 250 ul de solución reguladora de lavado después de quitar la placa del imán. A continuación, la placa se coloca sobre el imán y el sobrenadante se elimina después de asegurarse de que todas las MP sean capturadas por el imán. A continuación se adicionan 20 ul de solución reguladora de elución y la mezcla se incubó en JitterBug, 5 a temperatura ambiente durante 30 min.

45 Las MP se filtran y transfieren a la placa de 384 pozos: El estándar y las muestras se transfieren a una placa de filtro de 384 pozos colocada en la parte superior de una placa de ensayo de 384 pozos. A continuación, la placa se centrifugó a temperatura ambiente a 3000 rpm con un rotor de placa. La placa del filtro se retira y se adicionan los calibradores apropiados. La placa se cubre y está lista para ser analizada en SMD.

50 SMD: Una alícuota se bombea en el analizador. Los anticuerpos marcados individualmente se miden durante el flujo capilar definiendo el volumen de interrogación de tal manera que se detecta la emisión de solamente 1 molécula fluorescente en un espacio definido siguiendo la excitación con láser. Donde cada señal representa un evento digital, esta configuración permite sensibilidades analíticas extremadamente altas. La señal fluorescente total se determina como una suma de los eventos digitales individuales. Cada molécula de contado es un punto de datos positiva con

cientos de miles de DMC eventos/muestra. El límite de detección del ensayo de cTnI de la invención se determina por el método de la media 3 SD.

Ejemplo 3. Rango de concentración de cTnI en una población de sujetos no enfermos normales.

5 Se estableció un rango de referencia o rango normal para las concentraciones de cTnI en suero humano utilizando muestras de suero de 88 sujetos aparentemente sanos (no enfermos). Se llevó a cabo un inmunoensayo de tipo sándwich como se describe en el Ejemplo 1 y se contó el número de señales o eventos como se describió anteriormente usando el sistema de análisis de una partícula única de la invención. La concentración de troponina I en suero se determinó mediante la correlación de las señales detectadas por el analizador con la curva estándar como se describe anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

10 De acuerdo con las recomendaciones del actual European and American Cardiology Societies (ESC/ACC), los ensayos de troponina deben cuantificar con precisión el percentil 99º de los valores normales con una imprecisión de ensayo (CV) de menos de 10%, con el fin de distinguir de forma fiable entre pacientes con ACS y los pacientes sin cardiopatía isquémica y la estratificación del riesgo de eventos cardiacos adversos. El ensayo mostró que el umbral biológico (concentración de corte) para la TnI está a una concentración de TnI de 70pg/mL, que se establece en el percentil 99º
15 con un CV correspondiente del 10% (Figura 5). Un nivel de CV de 10% de los puntos del perfil de precisión a una concentración de TnI de 4 y 12 pg/mL.

Además, el ensayo se correlaciona bien con las mediciones del estándar de troponina I, proporcionadas por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (Figura 6).

20 El ensayo de la invención es suficientemente sensible y preciso para cumplir los requisitos de ESC/ACC, y es el ensayo más sensible para la troponina I cardiaca en comparación con ensayos tales como los descritos por Koerintervalo et al. (Ann Clin Biochem, 42:19-23 (2005)). El ensayo de la invención tiene una sensibilidad 10-20 veces mayor que el de los ensayos disponibles en la actualidad, que ha determinado que el rango de umbral biológico es 111 a 333 pg/mL de cTnI.

Ejemplo 4. Detección de la pronta liberación de TnI en la circulación de los pacientes con infarto agudo del miocardio (AMI)

25 Estudio 1: Se obtuvieron 47 muestras en serie de 18 pacientes que se presentaban dolor torácico en el servicio de urgencias (ED). Estos pacientes todos tenían los EKG elevado sin-ST, y se diagnosticaron con AMI. La concentración de cTnI en las muestras iniciales de los 18 pacientes se determinó de acuerdo con un ensayo comercial en el momento de la admisión a la sala de emergencias que era <350 pg/mL (10% punto de corte), y 12 fueron <100 pg/mL de percentil (99 %). Estas muestras fueron analizadas en posteriormente con el mismo ensayo comercial, y se determinaron como
30 prueba positiva para cTnI. Las mismas muestras de suero también se analizaron para TnI de acuerdo con el ensayo de la invención como se describe en los Ejemplos 1 y 3, y los resultados se compararon con los resultados obtenidos usando el ensayo comercial.

35 Se extrajo sangre por primera vez en el momento en el que el paciente se presenta con dolor torácico (muestra 1), y, posteriormente, a intervalos entre 4-8 horas (la muestra 2 a las 12 horas; la muestra 3 a las 16 horas; la muestra 4 a 24 horas; la muestra 5 a 30 horas; la muestra 6 a las 36 horas; la muestra 7 a 42 horas, y la muestra 8 a las 48 horas). El suero se analizó por los métodos de la invención y por un método comercial actual, y los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. El analizador de la invención detecta TnI en el momento que el paciente se presentó con dolor torácico (muestra 1), mientras que el ensayo comercial primero detecta cTnI en un momento muy posterior (la muestra 6 a las 36 horas). La concentración de TnI en la muestra 3 excede el nivel de umbral biológico que se estableció usando el analizador de la invención (7 pg/mL, véase la figura 5), e indicó que la muestra 3 es positiva para TnI para sugerir la
40 incidencia de un evento cardiaco. El umbral biológico para el ensayo comercial se encuentra entre 111 y 333 pg/mL de TnI. En consecuencia, la muestra 3 no habría sido considerada para indicar un posible evento cardiaco.

45 Además, los métodos de la presente invención permiten el diagnóstico y posible intervención mucho antes, basándose en los niveles de troponina cardiaca, como se evidencia por los resultados para la primera muestra tomada de los pacientes. En los 3 casos que tenían valores iniciales, del ensayo comercial de cTnI entre 100 y 350 ng/mL, todos fueron positivos para cTnI por los métodos analíticos de la invención (i.e., cTnI sobre 7 pg/mL). En los 12 casos que tenían valores de cTnI comerciales iniciales de menos de 100 pg/mL, se determinó que 5 eran positivos para un evento cardiovascular de acuerdo con el ensayo de la invención (i.e., cTnI sobre 7 pg/mL). El uso prospectivo del ensayo de la invención habría detectado 53% más de casos de AMI, que el ensayo comercial actual cuando la muestra de admisión
50 se evaluó.

Estudio 2: 50 muestras de suero adicionales, que dieron negativas de acuerdo con el ensayo comercial, se ensayaron usando el analizador y el ensayo de la invención. Los resultados se muestran en la figura 8. De las 50 muestras, 36 estaban dentro del 99 % y se determinó que dentro del rango normal establecido por el ensayo de la invención. Sin

embargo, se determinó que las 14 muestras restantes que estaban dentro del rango comercial "normal" o no enfermo, probado por encima del umbral biológico establecido por la invención.

5 Por lo tanto, el ensayo de cTnI de alta sensibilidad de la invención permite la detección de daño miocárdico en pacientes cuando los niveles séricos de cTnI están por debajo de los valores de umbral por la tecnología disponible en el mercado. El uso del ensayo de cTnI altamente sensible y precisa de la invención permite la detección de AMI antes que con los ensayos de cTnI existentes, y de ese modo provee la oportunidad de diagnóstico apropiado e intervención médica temprana para mejorar el resultado.

Reivindicaciones

1. Un método para determinar una enfermedad cardiovascular en un individuo que comprende:
 - (a) medir la concentración en suero o plasma de la troponina cardiaca a partir de una muestra de sangre del individuo;
 - (b) comparar la concentración medida a una concentración umbral predeterminada que representa la concentración de percentil 99º de la troponina cardiaca en un grupo de individuos normales con un coeficiente de variación (CV) correspondiente del 10% o menos, en donde la concentración umbral es menos de 10 pg/mL;
 - (c) determinar al menos uno de los siguientes en el individuo cuando la concentración de troponina cardiaca es mayor que la concentración umbral: daño cardiaco, daño miocárdico, un evento cardiaco anterior y cardiotoxicidad.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la determinación se realiza en una serie de muestras tomadas periódicamente a intervalos de minutos, horas, días, semanas, meses o años.
3. El método de la reivindicación 2, en donde las muestras han sido tomadas durante un período de hasta 48 horas a intervalos entre 4 y 8 horas.
4. El método de la reivindicación 2, que comprende además determinar una velocidad de cambio de la concentración de dicha serie de muestras.
5. El método de la reivindicación 2, en donde un aumento en la concentración indica progreso y empeoramiento del daño cardiaco.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde se ha tomado una muestra de sangre al menos una durante una prueba de estrés y después de una prueba de esfuerzo.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, dicha troponina cardiaca se selecciona del grupo que consiste en troponina I cardiaca y troponina T cardiaca.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde (c) comprende determinar AMI en el individuo cuando la concentración de troponina cardiaca es mayor que la concentración umbral, en donde la concentración umbral es menos de 9 pg/mL, menos de 8 pg/mL o menos de 7 pg/mL.
9. Un método para determinar la enfermedad cardiovascular en un individuo que comprende:
 - (a) medir la concentración en suero o plasma de la troponina I cardiaca (cTnI) en una muestra de sangre del individuo;
 - (b) comparar la concentración con una concentración umbral de 7 pg/mL, y
 - (c) determinar al menos uno de los siguientes en el individuo cuando la concentración de cTnI es mayor que la concentración umbral: daño cardiaco, daño miocárdico, un evento cardiaco anterior y cardiotoxicidad.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la determinación se realiza en una serie de muestras tomadas periódicamente a intervalos de minutos, horas, días, semanas, meses o años.
11. El método de la reivindicación 10, en donde las muestras han sido tomadas durante un período de hasta 48 horas a intervalos entre 4 y 8 horas.
12. El método de la reivindicación 10, que comprende además determinar una velocidad de cambio de la concentración para dicha serie de muestras.
13. El método de la reivindicación 10, en donde un aumento en la concentración indica progreso y empeoramiento de daño cardiaco.
14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde una muestra de sangre se ha tomado al menos una durante una prueba de estrés y después de una prueba de esfuerzo.
15. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9, que comprende además:
 - (a) medir la concentración en suero o plasma de la troponina I cardiaca (cTnI) a partir de una muestra de sangre antes de realizar una prueba de esfuerzo en el individuo;

(b) realizar la prueba de esfuerzo;

(c) medir la concentración inducida por el estrés de cTnI a partir de muestras de sangre tomadas al menos una de durante y después de la prueba de esfuerzo;

5 (d) comparar las concentraciones de cTnI antes y al menos una de durante y después de la prueba de esfuerzo una con otra y con la concentración umbral.

16. El método de la reivindicación 15, en donde el individuo es un paciente que se está evaluando para al menos uno de un posible evento cardíaco y cardiotoxicidad.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar un tratamiento para el individuo.

10

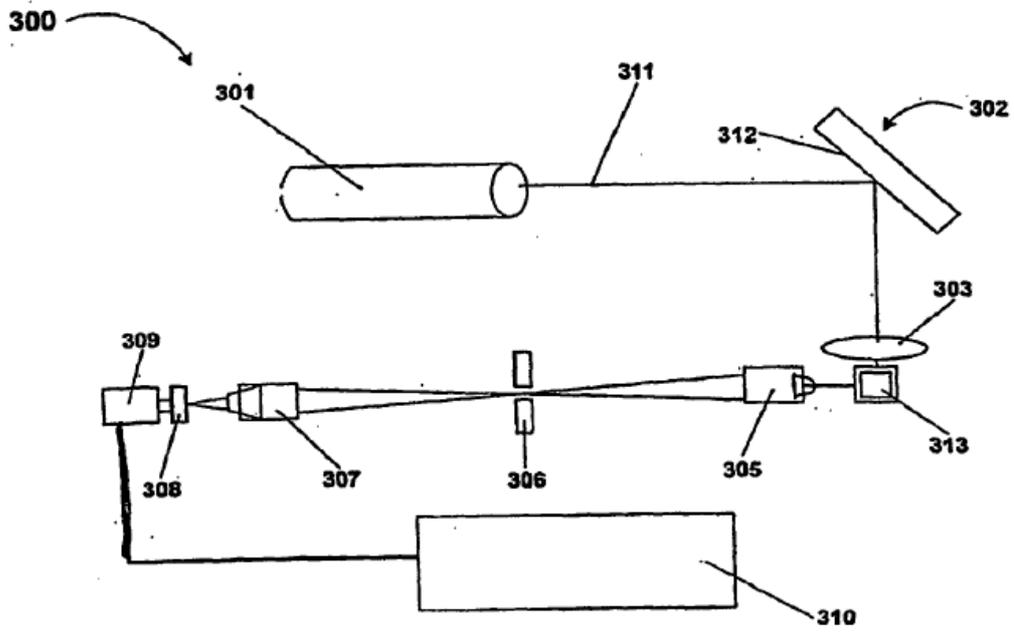


Figura 1A

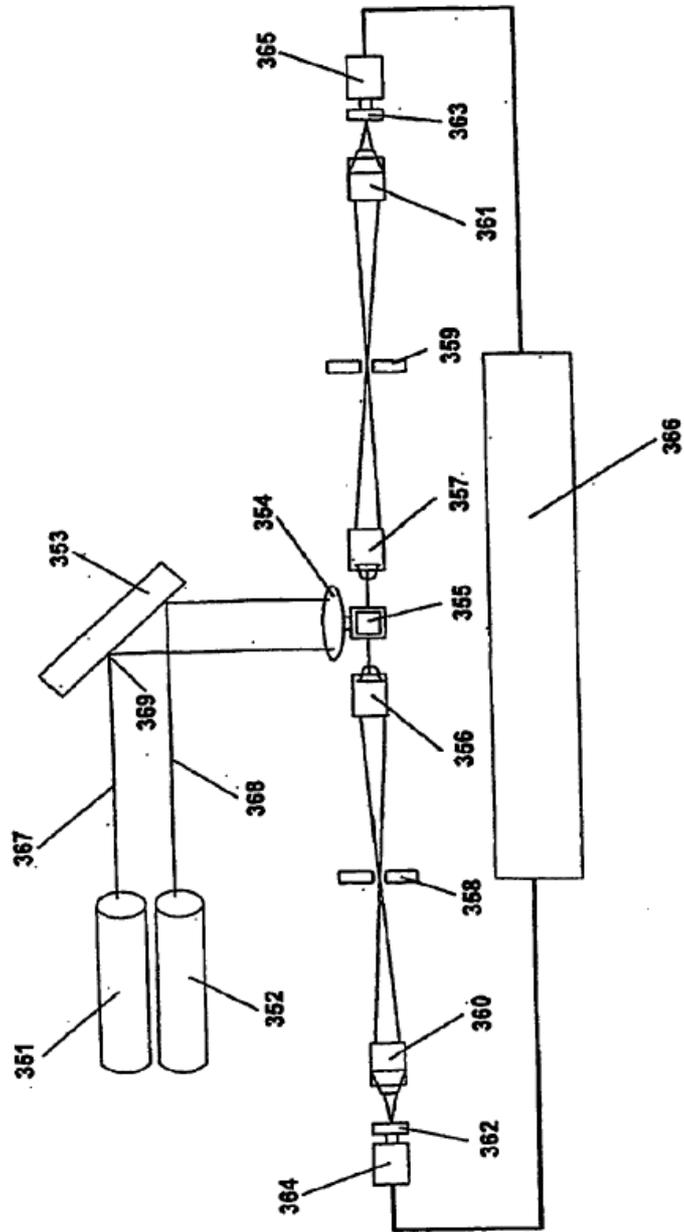


Figura 1B

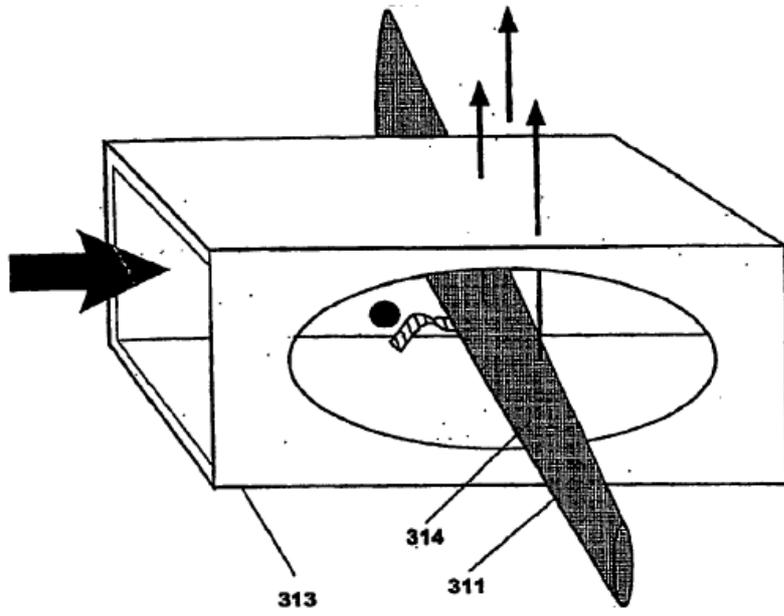


Figura 2A

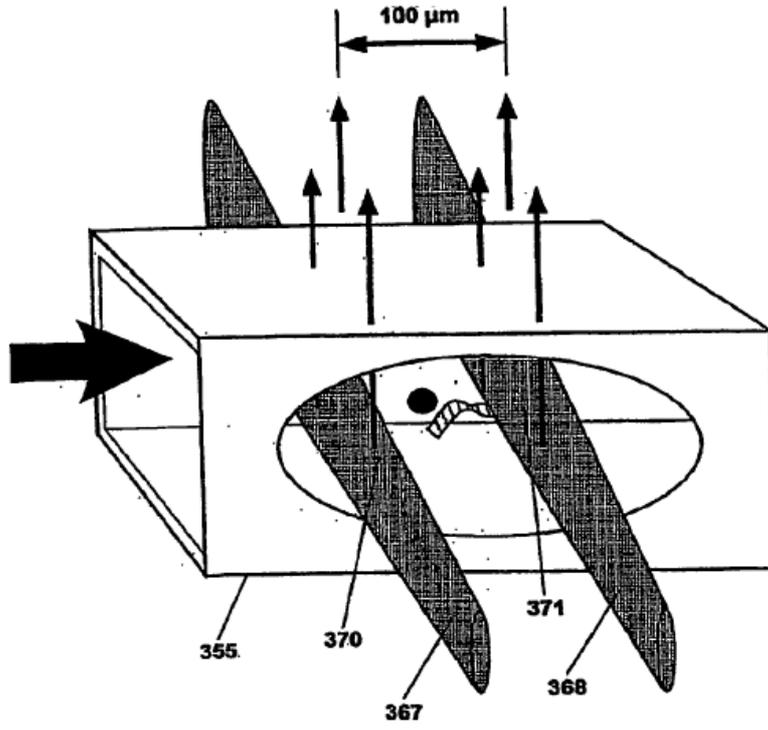


Figura 2B

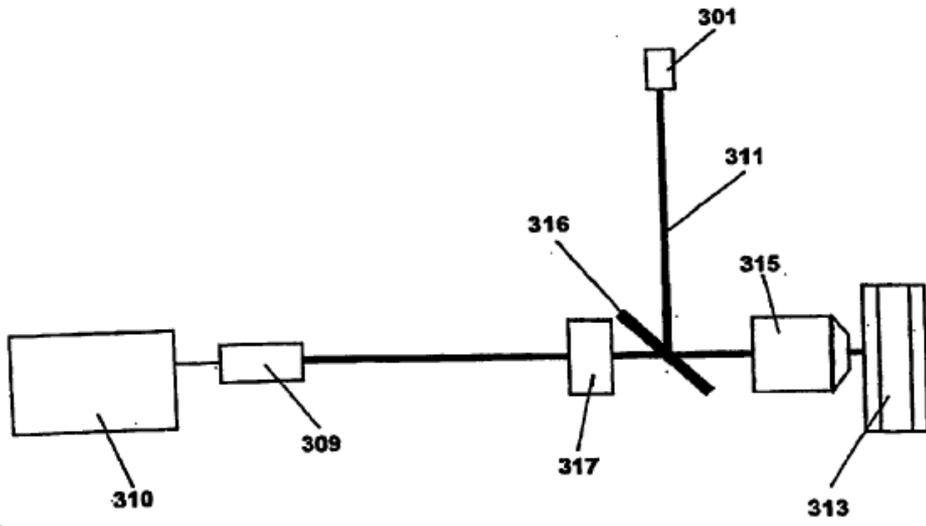


Figura 3A

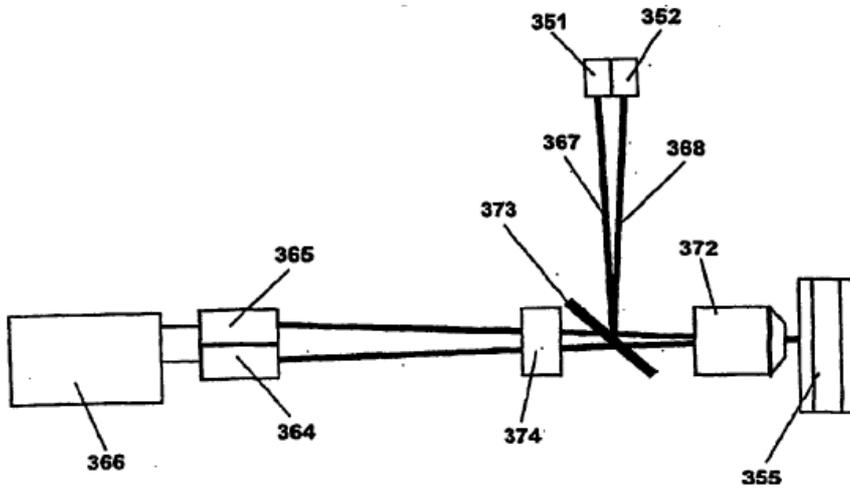


Figura 3B

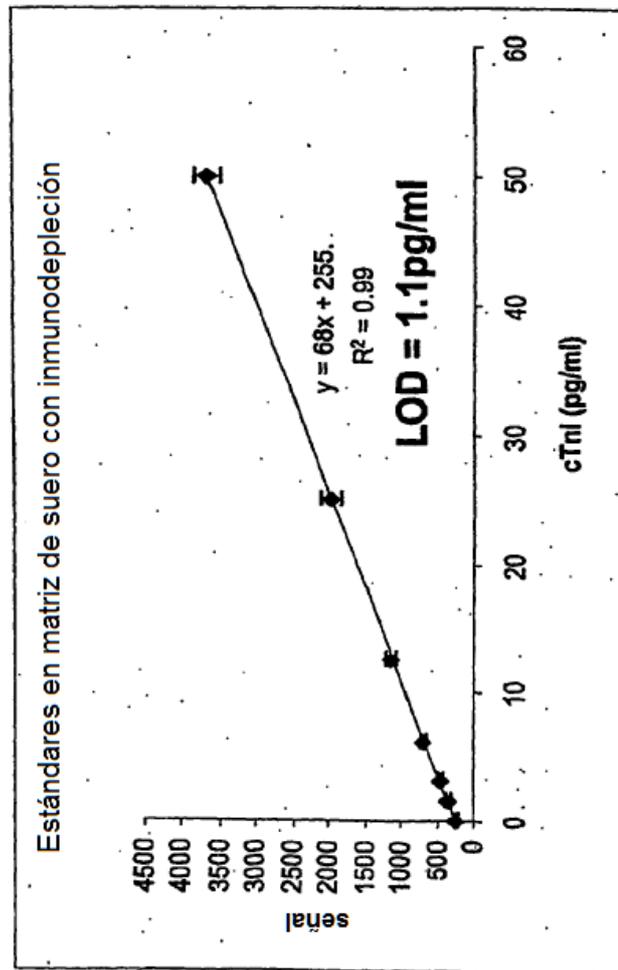


Figura 4

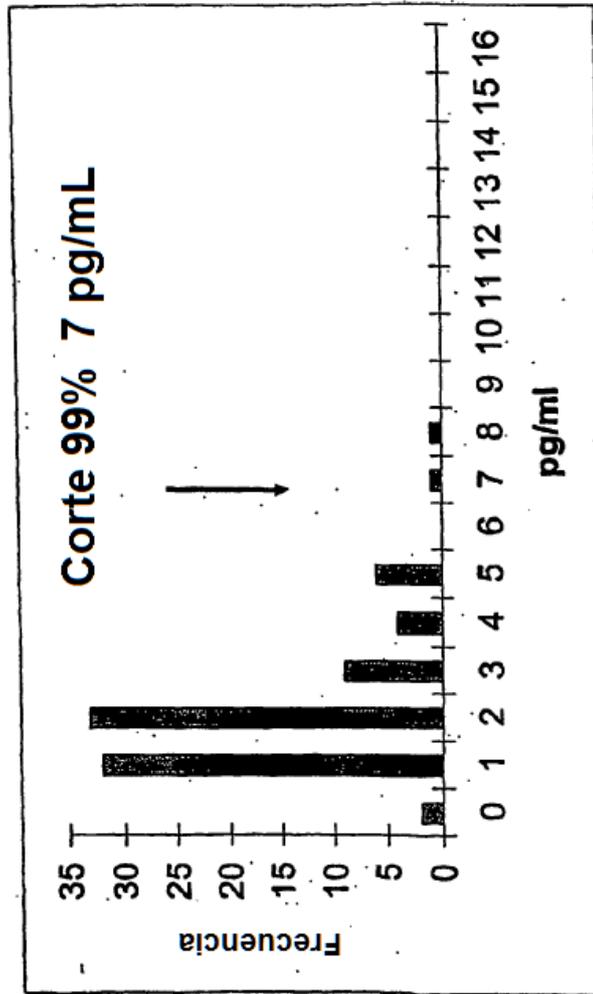


Figura 5

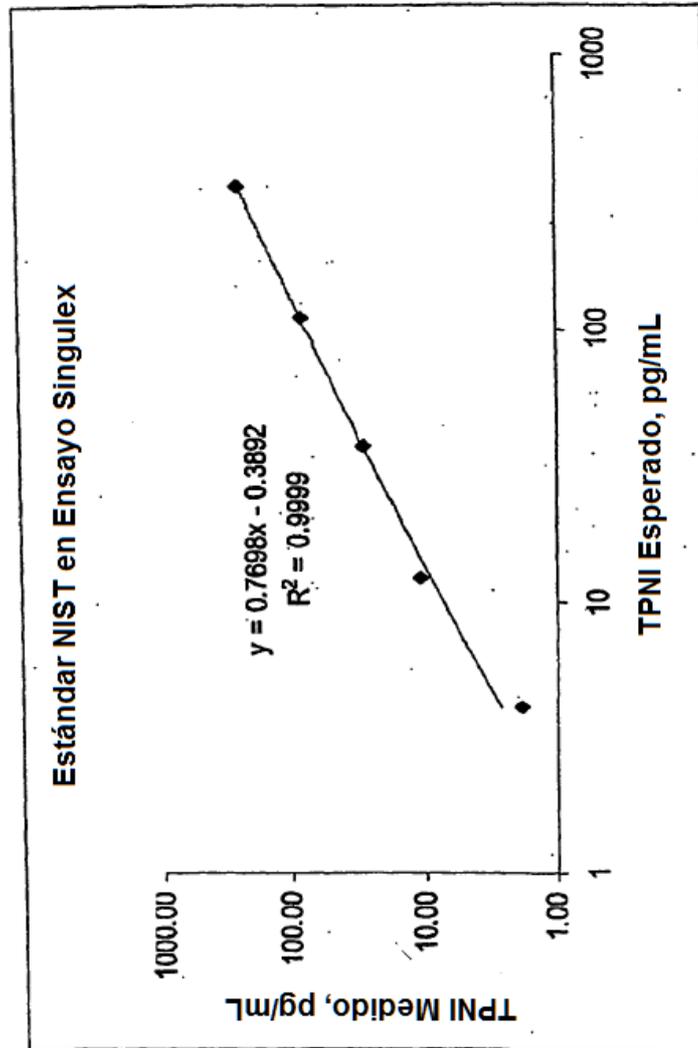


Figura 6

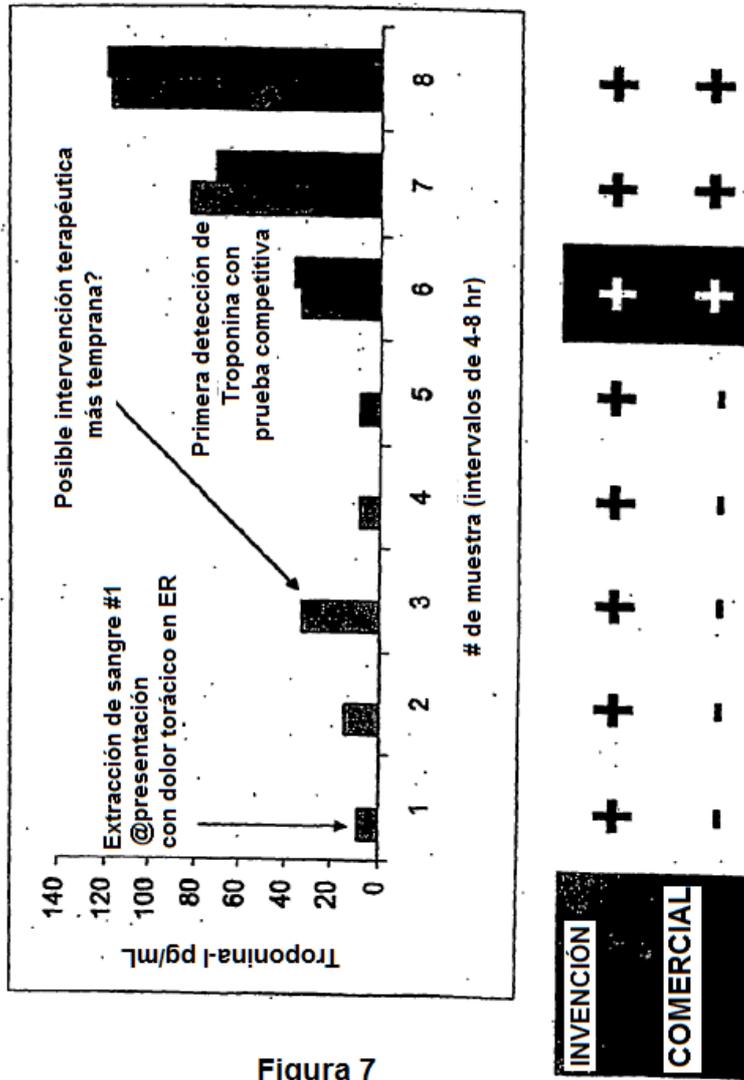


Figura 7

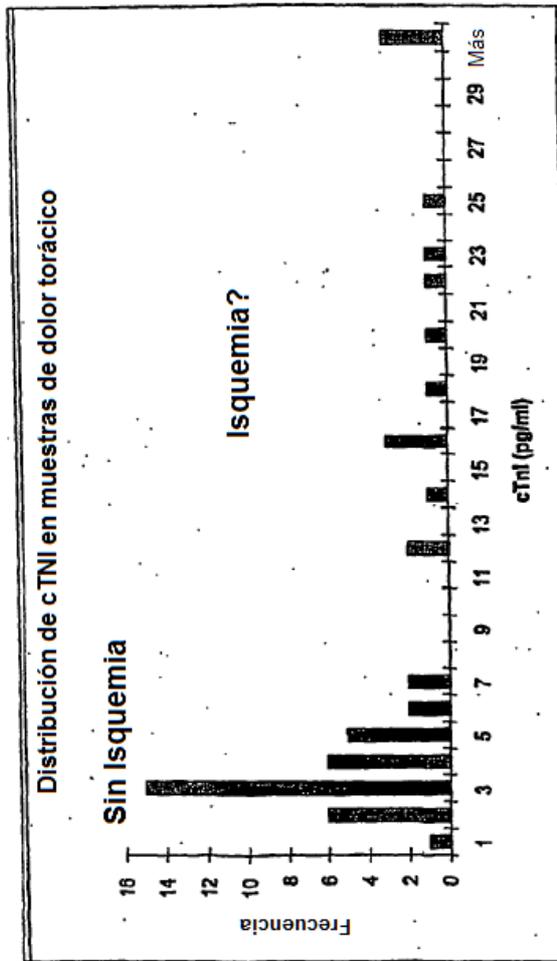


Figura 8