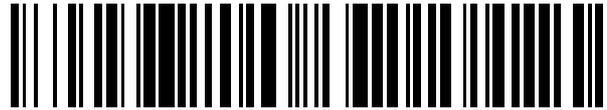


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 659**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2009 E 13162193 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2623987**

54 Título: **Ensayo de múltiples analitos en fase sólida**

30 Prioridad:

29.04.2008 US 48892 P

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**PSYCHEMEDICS CORPORATION (100.0%)
125 Nagog Park Suite 200
Acton, MA 01720, US**

72 Inventor/es:

**HILL, VIRGINIA;
ATEFI, MOHAMMAD y
SCHAFFER, MICHAEL I.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 659 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

Ensayo de múltiples analitos en fase sólida

Campo técnico

5 La presente divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para determinar la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos (por ejemplo, drogas, sustancias químicas tóxicas, medicamentos de venta con receta) en una muestra (por ejemplo, una muestra corporal o una muestra no corporal) y, más particularmente, a procedimientos y composiciones para realizar los mismos usando inmunoensayos competitivos. En algunas realizaciones, los procedimientos y las composiciones pueden usarse para determinar la presencia y/o la cantidad de dos o más analitos en una muestra simultáneamente, en tándem o en serie. Se describen composiciones de analito en fase sólida que
10 comprenden dos o más analitos diferentes unidos a una fase sólida, así como procedimientos para el uso de las mismas en inmunoensayos competitivos, para determinar la presencia y la cantidad de uno o más analitos de interés.

Antecedentes

Los inmunoensayos tales como radioinmunoensayos (RIA) y los inmunoensayos enzimáticos (IEE) son procedimientos útiles para la determinación de la presencia, la identidad y la cantidad de uno o más analitos de interés en una muestra.
15 Muchos inmunoensayos inmovilizan un anticuerpo específico para un analito de interés en una fase sólida, por ejemplo, una microplaca o perla; se detecta la unión entre el anticuerpo unido y el analito presente en una muestra, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de tipo sándwich. Otros inmunoensayos inmovilizan el analito; estos inmunoensayos pueden denominarse inmunoensayos de antígeno en fase sólida o de analito en fase sólida. En los inmunoensayos de analito en fase sólida, el analito en fase sólida compete con el analito presente en una muestra por la unión a un anticuerpo
20 específico para el analito. Típicamente, en dichos ensayos de analito en fase sólida, el anticuerpo es detectable de alguna manera, por ejemplo, está marcado, tal como marcado radiactiva, fluorescente, luminiscente o enzimáticamente (por ejemplo, se produce una reacción enzimática en presencia de un sustrato apropiado, que da lugar a un cambio de color), o su presencia se detecta por medio de un anticuerpo secundario que está marcado.

Las publicaciones científicas de Hongwu Du et al. (Biomedical Microdevices 7(2):143-146 and Analytical Chemistry 76(20):6166-6167) proporcionan información previa sobre la detección en paralelo de múltiples analitos mediante técnicas de micromatriz.

Con el fin de determinar si una muestra particular contenía más de un analito de interés, los procedimientos de la técnica anterior empleaban típicamente componentes en fase sólida separados (por ejemplo, microplacas o conjuntos de microperlas separados), donde cada componente en fase sólida contenía un anticuerpo unido específico para un analito
30 particular, o donde cada componente en fase sólida contenía un único tipo de analito unido. Dicha necesidad de componentes separados en fase sólida para cada analito hace los ensayos de múltiples analitos sean caros, técnicamente complejos y requieran mucho tiempo. Existe una necesidad de un procedimiento de detección de analito eficiente y relativamente barato que pueda determinar rápidamente la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos, incluyendo analitos tales como drogas, en una muestra.

Sumario

Los inmunoensayos son herramientas poderosas para detectar la presencia y/o la cantidad de analitos presentes en, o que se sospecha que están presentes en, una muestra. La capacidad de detectar múltiples analitos en una muestra, sin embargo, requiere típicamente el uso de múltiples ensayos separados, por ejemplo, uno por cada analito de interés, aumentando de esta manera el coste, el tiempo y la complejidad técnica del procedimiento, y conduciendo a posibles
40 errores del operario durante una de las múltiples etapas. Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que el uso de composiciones de analito en fase sólida, que comprenden al menos dos analitos unidos a la fase sólida, facilitan el rendimiento de los ensayos de múltiples analitos y exhiben altas sensibilidades y eficiencias. Los ensayos de múltiples analitos descritos en la presente memoria son flexibles, y pueden ser realizados simultáneamente, en serie, o en tándem, lo que resulta en menores coste, tiempo y complejidad del procedimiento.

45 La presente invención se puede definir mediante las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento según la reivindicación 1 para determinar la presencia de un analito de interés en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos dos analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos dos analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo en fase sólida como una mezcla, en el que uno de los al menos dos analitos diferentes es el analito de interés, con:

i) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es específico para el analito de interés; y

ii) una muestra; y

(b) determinar si el analito de interés está presente en la muestra, preferentemente en el que el anticuerpo está marcado de forma detectable.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento según la reivindicación 11 para determinar la presencia de una pluralidad de analitos diferentes de interés, representados por el número "N" en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

10 (a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos "N" analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos "N" analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo en fase sólida como una mezcla, en el que uno de los al menos "N" analitos diferentes es el analito de interés, con:

i) una pluralidad de anticuerpos, en el que la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo específico para cada analito de interés diferente; y
i) una muestra; y

15 (b) determinar si cada analito de interés diferente de la pluralidad está presente en la muestra.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición según la reivindicación 15, comprendiendo la composición al menos dos analitos diferentes unidos a un receptáculo de fase sólida, en la que los al menos dos analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo de fase sólida como una mezcla. De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit según la reivindicación 19, comprendiendo el kit la composición según la reivindicación 15, y al menos un anticuerpo específico para al menos uno de los dos analitos diferentes asociados con la fase. En el presente documento se divulga un procedimiento para determinar la presencia de un analito de interés en una muestra, que comprende:

25 (a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos dos analitos diferentes asociados con un soporte en fase sólida, en la que uno de los al menos dos analitos diferentes es el analito de interés, con:

i) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es específico para el analito de interés; y
ii) una muestra; y

30 (b) determinar si el analito de interés está presente en la muestra. En algunas realizaciones, la composición de analito en fase sólida se pone en contacto, en primer lugar, con la muestra y, a continuación, con el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo está marcado de manera detectable, por ejemplo, marcado de manera detectable con un marcador fluorescente, luminiscente (incluyendo quimioluminiscente o bioluminiscente), radiactivo o enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo no está marcado.

35 En algunas realizaciones, el procedimiento comprende eliminar el anticuerpo que no está unido a la composición de analito en fase sólida.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende determinar la cantidad de analito presente, si hay analito presente.

En algunas realizaciones, la presencia del analito en la muestra se determina comparando una señal generada por el anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida en la muestra con una señal generada por el anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida en una muestra de control que no comprende el analito de interés.

40 En algunas realizaciones, la señal generada por el anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida puede ser derivada desde un marcador detectable en el anticuerpo.

En algunas realizaciones, la señal generada por el anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida puede ser derivada desde la unión de un anticuerpo secundario al anticuerpo, en el que el anticuerpo secundario está marcado de manera detectable.

45 En algunas realizaciones, el marcador detectable puede ser un marcador fluorescente, luminiscente (incluyendo quimioluminiscente o bioluminiscente), radiactivo o enzimático.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además poner en contacto la composición de analito en fase sólida con un segundo anticuerpo, donde el segundo anticuerpo es específico para el al menos segundo analito diferente unido a la fase sólida, y determinar si el segundo analito está presente en la muestra.

En algunas realizaciones del procedimiento, los al menos dos analitos diferentes están unidos a la fase sólida de manera no covalente, directa o indirectamente.

En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes están unidos a la fase sólida de manera covalente, directa o indirectamente.

- 5 En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes están unidos a la fase sólida mediante adsorción, directa o indirectamente.

En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes están unidos de manera covalente a un agente de unión que está unido a la fase sólida de manera no covalente o mediante adsorción.

En algunas realizaciones, el agente de unión se selecciona de entre HSA y BSA.

- 10 En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes son drogas o sus metabolitos. Una droga o sus metabolitos pueden seleccionarse de entre cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norcocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoides, THC, carboxi-THC, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxicodona, 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

Una muestra puede ser una muestra corporal o una muestra derivada de una muestra corporal.

- 15 Una muestra corporal puede ser de un ser humano, y se selecciona de entre una muestra de tejido del cerebro, corazón, pulmón, riñón, hígado, músculo, hueso, estómago, intestinos y piel; un fluido biológico seleccionado de entre orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, moco, sudor, líquido vítreo y leche; y una estructura queratinizada.

Un soporte sólido puede ser un micropocillo o una microplaca.

- 20 También se divulga un procedimiento para determinar la presencia de una pluralidad de analitos de interés diferentes, representados por el número "N", en una muestra, en el que el procedimiento comprende:

(a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos "N" analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos "N" analitos diferentes asociados incluyen la pluralidad de analitos de interés, con:

- 25 i) una pluralidad de anticuerpos, en el que la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo específico para cada analito de interés diferente; y
ii) una muestra; y

(b) determinar si cada analito de interés diferente en la pluralidad está o no presente en la muestra.

- 30 En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para cada analito de interés diferente son detectables por separado. Los anticuerpos pueden estar marcados, de manera detectable, con un marcador fluorescente, luminiscente (incluyendo quimioluminiscente o bioluminiscente), radiactivo o enzimático.

En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar la cantidad de cada analito de interés diferente, si está presente.

- 35 En algunas realizaciones, la presencia de cada analito de interés diferente en la muestra se determina comparando una señal generada por el anticuerpo específico para un analito de interés particular unido a la composición de analito en fase sólida en la muestra con una señal generada por el mismo anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida en una muestra de control que no comprende el analito de interés particular.

En algunas realizaciones, la pluralidad de anticuerpos se pone contacto con la composición de analito en fase sólida simultáneamente.

- 40 En algunas realizaciones, al menos uno de entre la pluralidad de anticuerpos se pone en contacto con la composición de analito en fase sólida en un momento diferente que al menos otro de entre la pluralidad de anticuerpos.

También se divulga una composición que comprende al menos dos analitos diferentes asociados a una fase sólida. Los al menos dos analitos diferentes pueden estar unidos de manera covalente a la fase sólida, directa o indirectamente. Los al menos dos analitos diferentes pueden estar unidos de manera no covalente a la fase sólida, directa o indirectamente.

- 45 En algunas realizaciones, una composición comprende de 2 a 10 analitos diferentes asociados con una fase sólida. En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes son analitos de drogas o sus metabolitos. En algunas realizaciones, los al menos dos analitos diferentes se seleccionan de entre cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno,

norocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoides, THC, carboxi-THC, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxycodona, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

5 Además, se divulga un kit que comprende una composición según se describe en la presente memoria, y al menos un anticuerpo específico para al menos uno de los dos analitos diferentes asociados con la fase sólida. En algunas realizaciones, el kit puede incluir al menos un anticuerpo específico para un analito seleccionado de entre el grupo que consiste en: cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoides, THC, carboxi-THC, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxycodona, 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA).

10 También se divulga un procedimiento para determinar la presencia de un analito de interés o uno o más de sus metabolitos en una muestra, que comprende:

(a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos dos analitos diferentes asociados con un soporte en fase sólida, en el que uno de los al menos dos analitos diferentes es el analito de interés, con:

15 i) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es específico para el analito de interés y es capaz además de unirse a uno o más metabolitos del analito de interés, y
ii) una muestra; y

(b) determinar si el analito de interés o uno o más de sus metabolitos está presente en la muestra.

Además, se divulga un procedimiento para determinar la presencia de al menos un miembro de una clase de fármaco de interés en una muestra, que comprende:

20 (a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos dos analitos diferentes asociados con un soporte en fase sólida, en la que uno de los al menos dos analitos diferentes es un miembro de la clase de fármaco de interés, con:

25 i) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es específico para el miembro de la clase de fármaco de interés y es capaz además de unirse a uno o más de otros miembros de la clase de fármaco de interés o a uno o más metabolitos de un miembro de la clase de fármaco de interés; y
ii) una muestra; y

(b) determinar si al menos un miembro de la clase de fármaco de interés está presente en la muestra.

30 En cualquiera de los procedimientos, los al menos dos analitos diferentes pueden seleccionarse de drogas, sustancias químicas tóxicas, sustancias químicas ambientales, productos de petróleo, productos naturales, compuestos orgánicos, nutrientes, medicamentos de venta con receta y de venta sin receta o metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones de los procedimientos, los al menos dos analitos diferentes pueden seleccionarse de entre opioides, anfetaminas, AINE, esteroides, cannabinoides, benzodiazepinas, barbitúricos, tricíclicos y efedrina o sus metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

35 En realizaciones de las composiciones, los al menos dos analitos diferentes pueden seleccionarse de drogas, sustancias químicas tóxicas, sustancias químicas ambientales, productos de petróleo, productos naturales, compuestos orgánicos, nutrientes, medicamentos de venta con receta y de venta sin receta o metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

40 En algunas realizaciones de las composiciones, los al menos dos analitos diferentes se seleccionan de entre opioides, anfetaminas, AINE, esteroides, cannabinoides, benzodiazepinas, barbitúricos, tricíclicos y efedrina o metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

45 En realizaciones de los kits, la composición comprende al menos dos analitos diferentes seleccionados de drogas, sustancias químicas tóxicas, sustancias químicas ambientales, productos de petróleo, productos naturales, compuestos orgánicos, nutrientes, medicamentos de venta con receta y de venta sin receta o metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones de los kits, la composición comprende al menos dos analitos diferentes seleccionados de entre opioides, anfetaminas, AINE, esteroides, cannabinoides, benzodiazepinas, barbitúricos, tricíclicos y efedrina o sus metabolitos, derivados o productos de descomposición de cualquiera de los anteriores.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el

mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos en la materia a la que pertenece la presente divulgación. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones, tendrá prioridad.

Descripción de los dibujos

La **Fig. 1** es un esquema de una composición en fase sólida proporcionada en la presente memoria (por ejemplo, un micropocillo de una microplaca) que tiene al menos dos analitos diferentes unidos a la misma, representados en la figura por triángulos, cuadrados, círculos, diamantes. El esquema demuestra la capacidad de las presentes composiciones y procedimientos en fase sólida para determinar la presencia y/o la cantidad de dos o más analitos simultáneamente. Por ejemplo, los analitos indicados con diamantes y triángulos presentes en una muestra compiten con los analitos indicados con diamantes y triángulos unidos a la fase sólida por la unión a anticuerpos marcados específicos para los analitos indicados con diamantes y triángulos, respectivamente, lo que resulta en una pérdida de señal, por ejemplo, después de una etapa de lavado. Los anticuerpos específicos para los analitos indicados con diamantes y triángulos pueden estar marcados de manera diferencial (es decir, como marcadores A y B aquí, respectivamente), permitiendo la detección separada de los analitos indicados con diamantes y triángulos.

La **Fig. 2** es un esquema que demuestra un ensayo en tándem usando las composiciones en fase sólida proporcionadas en la presente memoria. En un ensayo en tándem, la presencia y/o la cantidad de al menos un analito en una muestra es detectada (o ensayada) usando una composición en fase sólida proporcionada en la presente memoria (por ejemplo, un micropocillo que tiene al menos dos analitos diferentes unidos al mismo, en el que al menos uno de los analitos unidos es el que está siendo ensayado), mientras que al menos un analito diferente (o ensayado) es detectado usando una composición en fase sólida separada (por ejemplo, un micropocillo contiguo que tiene los mismos al menos dos analitos diferentes unidos al mismo, en el que al menos uno de los analitos unidos es el al menos un analito diferente ensayado). En la figura, ambos pocillos 1 y 2 tienen los mismos cuatro analitos unidos a los mismos. En el pocillo 1 se demuestra un ensayo competitivo para detectar el analito indicado con círculos en una muestra, mientras que en el pocillo 2 (por ejemplo, un pocillo contiguo), se demuestra un ensayo competitivo para detectar el analito indicado con triángulos.

La **Fig. 3** es un esquema que demuestra un ensayo en serie que usa las composiciones en fase sólida proporcionadas en la presente memoria. En un ensayo en serie, al menos un analito en una muestra es detectado (o ensayado) usando una composición en fase sólida proporcionada en la presente memoria, seguido por la detección (o ensayo) de al menos un analito diferente usando la misma composición en fase sólida. Por ejemplo, en la figura, el pocillo 1 se usa, en primer lugar, para detectar un analito indicado con círculos en $t = 1$, seguido por la detección de un analito indicado con cuadrados en $t = 2$. Los anticuerpos específicos para el analito indicado con círculos pueden ser eliminados antes de realizar el segundo ensayo en $t = 2$; en algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para el analito indicado con círculos pueden permanecer durante el segundo ensayo, por ejemplo, si están marcados de manera diferencial con respecto a los anticuerpos específicos para el analito indicado con cuadrados o si no interfieren con la detección del analito indicado con cuadrados.

Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan materiales y procedimientos para la detección rápida, sensible y rentable de uno o más analitos diferentes en una muestra usando una composición de analito en fase sólida que tiene al menos dos analitos diferentes asociados con una fase sólida. Los materiales y procedimientos aprovechan las sorprendentes eficiencias y sensibilidades generadas al unir dos o más analitos diferentes a un único componente en fase sólida. Por ejemplo, una microplaca en la que cada micropocillo tiene los mismos dos o más analitos diferentes unidos al mismo puede ser usada para determinar la presencia y/o la cantidad de los dos o más analitos diferentes en una muestra en un único micropocillo usando un anticuerpo marcado de manera diferencial para cada uno de los dos o más analitos de interés en un inmunoensayo competitivo; realizando un sondeo para la señal diferencial de cada anticuerpo específico, puede determinarse la presencia y/o la cantidad del analito para el que es específico.

En otras realizaciones, las composiciones de analito en fase sólida pueden ser usadas para determinar la presencia y/o la cantidad de dos o más analitos diferentes mediante la detección por separado de los dos o más analitos diferentes usando composiciones de analito en fase sólida separadas (pero que tienen el mismo conjunto de dos o más analitos unidos) y el anticuerpo marcado apropiado específico para el analito de interés (por ejemplo, un ensayo tándem o en conjunto). En todavía otras realizaciones, la misma composición en fase sólida puede ser usada para determinar la presencia y/o la cantidad de dos o más analitos diferentes usando, en primer lugar, la composición de analito en fase sólida para determinar la presencia y/o la cantidad de al menos un primer analito usando un anticuerpo específico para el al menos primer analito y, a continuación, usando la misma composición en fase sólida para determinar la presencia y/o la cantidad del al menos segundo analito usando un anticuerpo específico para el al menos segundo analito, por ejemplo, inmediatamente o después de eliminar cualquier sustancia interferente del primer ensayo. Dichos formatos de ensayo pueden ser denominados ensayos en serie.

Composiciones

En la presente memoria se proporcionan composiciones útiles para detectar (por ejemplo, determinar la presencia y/o la cantidad de) uno o más analitos de interés diferentes en una muestra. Las composiciones incluyen un soporte en fase sólida asociado con al menos dos analitos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más analitos. En algunas realizaciones, hay de 2 a 5 analitos asociados con el soporte en fase sólida. En otras realizaciones, hay de 5 a 10 analitos asociados con el soporte en fase sólida. En la presente memoria, dichas composiciones se denominan composiciones de analito en fase sólida.

Tal como será evidente para las personas con conocimientos ordinarios en la materia, aunque las composiciones hacen posible determinar la presencia y/o la cantidad del número total de analitos ("N") diferentes asociados con el soporte en fase sólida, no es necesario determinar (o evaluar) la presencia y/o la cantidad de todos los analitos que pueden determinarse con una composición de analito en fase sólida determinada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede ser útil determinar la presencia y/o la cantidad de solo un analito de interés. En otras realizaciones, puede ser útil determinar primero si uno o más analitos de interés es/están presentes, seguido por la determinación de si un segundo o más analitos están presentes. Las composiciones en fase sólida descritas en la presente memoria facilitan la detección simultánea, en tándem o en serie de hasta el número "N" de analitos asociados con la fase sólida.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "determinar la presencia" y "la determinación de la presencia" significan determinar si un analito está o no presente. De esta manera, si se determina que un analito está ausente, dicha actividad todavía estaría incluida en las expresiones.

Un analito puede ser cualquier sustancia química, incluyendo estupefacientes, productos químicos tóxicos, productos químicos ambientales (por ejemplo, pesticidas, herbicidas, insecticidas), derivados del petróleo, productos naturales, compuestos orgánicos, nutrientes, prescripciones o medicamentos de venta libre (por ejemplo, medicamentos contra el dolor, esteroides, narcóticos, AINE) o sus metabolitos, derivados o productos de descomposición.

En algunas realizaciones, los analitos para su asociación con un soporte en fase sólida son drogas, tales como estupefacientes, medicamentos sin receta o medicamentos para el dolor. Las clases particulares de fármacos de interés incluyen opioides, esteroides, anfetaminas, cannabinoides, benzodiazepinas, AINE, barbitúricos, tricíclicos y efedrina.

En algunas realizaciones, un analito de interés puede ser seleccionado de entre: cocaína (y metabolitos de benzoilecgonina, cocaetileno, y norcocaína), opiáceos y sus metabolitos (morfina, heroína, 6-monoacetilmorfina, diacetilmorfina, codeína, oxycodona, hidrocodona, hidromorfona, oximorfona y metadona), fenciclidina (PCP), anfetaminas, metanfetaminas, MDMA (éxtasis, metilendioxi-metanfetamina), MDA (metilendioxi anfetamina), cannabinoides (THC y sus metabolitos y carboxi-THC), propoxifeno, meperidina, benzodiazepina (alprazolam, clordiazepóxido, diazepam, lorazepam, flunitrazepam, triazolom y estazolam), barbitúricos (mefobarbital, pentobarbital), carisoprodol, tramadol, fentanilo, buprenorfina, naltrexona, antidepresivos tricíclicos, nicotina (y su metabolito cotinina), eve (metilendioxi-etilamfetamina), ácido lisérgico (LSD), digoxina, metilfenidato, acetaminofeno, salicilatos, fluoxetina, sertralina, dextrometorfano, efedrina, fenetilaminas, pseudoefedrina y sinefrina.

En algunas realizaciones, los analitos para su asociación con un soporte en fase sólida son drogas o sus metabolitos, y pueden ser seleccionados de entre los siguientes: cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norcocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoides, THC, carboxi-THC, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MAM), oxycodona, 3,4-metilendioxi-anfetamina (MDA) y 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA).

En realizaciones particulares, una composición puede incluir al menos dos de entre: cocaína, uno o más opioides, PCP, anfetaminas y cannabinoides asociados con el soporte sólido. En realizaciones particulares, dos o más de los medicamentos de gestión del dolor seleccionados de entre morfina, codeína, oxycodona, oximorfona, hidrocodona o hidromorfona pueden estar asociados con el soporte sólido. En algunas realizaciones, dos o más de entre cocaína y un opioide pueden estar asociados con el soporte sólido.

Puede analizarse cualquier tipo de muestra para determinar la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos de interés. En ciertos casos, una muestra contiene o se sospecha que contiene uno o más analitos de interés, tales como uno o más de drogas o sustancias químicas tóxicas. Una muestra puede ser una muestra corporal o una muestra no corporal. Una muestra corporal puede ser una muestra obtenida de un individuo (por ejemplo, un ser humano, ratón, rata, cerdo, caballo, mono, conejo, vaca, oveja o cabra). Una muestra corporal puede ser una muestra de tejido, tal como una muestra de tejido del cerebro, corazón, pulmones, riñones, hígado, músculo, hueso, estómago, intestinos o piel. Una muestra corporal puede ser obtenida mediante biopsia o de un cultivo tisular. Una muestra corporal puede incluir un fluido biológico tal como orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, moco, sudor, leche, fluido vítreo y similar. Una muestra corporal puede ser una estructura queratinizada, tal como cabello, uña de la mano o uña del pie. Una muestra no corporal puede ser, por ejemplo, una muestra de suelo o una muestra de agua, una muestra vegetal, una muestra de material inorgánico o una muestra de un procedimiento de investigación o de fabricación.

Una muestra puede ser usada tal como es, o puede ser tratada para resultar en una muestra final para la detección de los uno o más analitos. Por ejemplo, una muestra puede ser licuada, concentrada, secada, diluida, liofilizada, extraída, fraccionada, sometida a cromatografía, purificada, acidificada, reducida, degradada, sometida a tratamiento enzimático o si no tratada de maneras conocidas por las personas con conocimientos ordinarios en la materia con el fin de liberar un analito de interés. Si se desea, una muestra puede ser una combinación (colección) de muestras, por ejemplo, de un individuo o de un procedimiento de fabricación.

Una muestra puede estar en una diversidad de estados físicos, por ejemplo, líquido, sólido, emulsión o gel. Las muestras pueden ser tratadas con el cuidado habitual para conservar la integridad del analito. El tratamiento puede incluir el uso de tampones y/o inhibidores apropiados, tales como inhibidores de ciertas enzimas biológicas. Una persona con conocimientos ordinarios en la materia será capaz de determinar las condiciones apropiadas una vez conocidos los analitos de interés y la naturaleza de la muestra.

Tal como se usan en la presente memoria, las expresiones "fase sólida" y "soporte en fase sólida" se usan indistintamente y se refieren a cualquier material sólido o semisólido con el que pueden asociarse dos o más analitos, por ejemplo, un material al que pueden ser fijados covalente o no covalentemente, directa o indirectamente, o un material al que pueden ser incorporados (por ejemplo, atrapamiento físico, adsorción, etc.), o un material que puede ser funcionalizado para incluir (por ejemplo, para asociarse con) los dos o más analitos. Además de los analitos, un soporte en fase sólida puede contener una diversidad de materiales incluyendo, por ejemplo, un polímero natural o sintético, resina, metal o silicato.

Los soportes en fase sólida adecuados son conocidos en la técnica e incluyen ilustrativamente agarosas (disponibles comercialmente como Sepharose), celulosas (por ejemplo, carboximetil celulosa), dextranos, (tales como Sephadex), poliacrilamidas, poliestirenos, glicoles de polietileno, resinas, silicatos, divinilbencenos, metacrilatos, polimetacrilatos, vidrio, cerámica, papeles, metales, metaloides, poliacriloilmorfolidas, poliamidas poli (tetrafluoroetileno), polietilenos, polipropilenos, poli (4-metilbutenos), poli (tereftalato de etileno), rayones, nailon, poli (butiratos de vinilo), difluoruros de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehidos, acetatos de celulosa, nitrocelulosa o combinaciones de dos o más de cualquiera de los anteriores. Todo lo que se requiere es que el material o la combinación de materiales en el soporte en fase sólida no interfieran sustancialmente, por ejemplo, en algunos casos sólo interfieran mínimamente, con la unión entre los dos o más analitos y los anticuerpos específicos para cada analito.

Un soporte en fase sólida puede tener una diversidad de formatos físicos que pueden incluir, por ejemplo, una membrana, un chip, un portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio o cubreobjetos), una columna, una partícula hueca, sólida, semisólida que contiene poros o cavidades tal como una perla, un gel, una fibra que incluye un material de fibra óptica, una matriz y un receptáculo de muestras. Los ejemplos no limitativos de receptáculos de muestras incluyen pocillos de muestras, tubos, capilares, viales y cualquier otro recipiente, ranura o muesca capaz de contener una muestra. Un receptáculo de muestras puede estar contenido en una plataforma multi-muestras, tal como una microplaca, portaobjetos, dispositivo de microfluidos, múltiples pocillos o placa de pocillos y similares. Una partícula a la que está asociado un analito puede tener una diversidad de tamaños, incluyendo partículas que permanecen en suspensión en una solución de viscosidad deseada, así como partículas que se precipitan fácilmente en una solución de viscosidad deseada. Las partículas pueden ser seleccionadas para facilitar la separación desde los constituyentes de la muestra, por ejemplo, mediante la inclusión de marcadores de purificación para la separación con un material de unión a marcador adecuado, propiedades paramagnéticas para la separación magnética y similares.

Generalmente, una partícula descrita en la presente memoria tiene una forma esférica. Sin embargo, una partícula puede ser, por ejemplo, oblonga o puede tener forma de tubo. En algunas realizaciones, por ejemplo, una partícula con forma cristalina, la partícula puede tener forma poliédrica (irregular o regular), tal como una forma de cubo. En algunas realizaciones, una partícula puede ser amorfa.

En algunas realizaciones, una mezcla de partículas puede ser sustancialmente esférica, sustancialmente oblonga, sustancialmente similar a un tubo, sustancialmente poliédrica o sustancialmente amorfa. "Sustancialmente" significa que más del 30 % (por ejemplo, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99 o más) de la mezcla de partículas es de una forma determinada.

En algunas realizaciones, el diámetro (o dimensión recta más larga) de la partícula puede estar comprendido entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 1.000 nm o más. Por ejemplo, una partícula puede ser de al menos de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1.000 nm (por ejemplo, al menos aproximadamente de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 o 1.000 nm). En algunas realizaciones, una partícula puede ser no mayor de 1.000 nm (por ejemplo, no mayor de 975, 950, 925, 900, 875, 850, 825, 800, 775, 750, 725, 700, 675, 650, 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 o cinco nm) de diámetro (o en su dimensión recta más larga).

Los procedimientos adecuados para la producción de soportes en fase sólida, así como los ejemplos adicionales de

soportes en fase sólida (por ejemplo, partículas) para su uso en las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria, pueden encontrarse, por ejemplo, en las publicaciones PCT N° WO 01/84157, WO 99/30160, WO 99/42838 y WO 06/078618, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente memoria en su totalidad, por referencia.

5 Un analito puede unirse a un soporte en fase sólida en una serie de maneras conocidas por las personas con conocimientos ordinarios en la materia. Por ejemplo, un analito puede ser unido de manera covalente o no covalente a un soporte en fase sólida, directa o indirectamente, tal como a través de un enlazador, un agente de unión o un miembro de un par de unión. Por ejemplo, un analito puede ser unido de manera covalente directamente a un soporte en fase sólida, por ejemplo, a través de un enlace químico entre un grupo funcional en el analito y un grupo funcional en el soporte en fase sólida. De manera alternativa, un analito puede ser unido de manera covalente indirectamente a un soporte en fase sólida, por ejemplo, un analito puede ser unido de manera covalente a un enlazador o un agente de unión, el cual a su vez está unido de manera covalente al soporte en fase sólida. En algunas realizaciones, un analito es unido directamente de manera no covalente a un soporte en fase sólida, por ejemplo, asociación o adsorción no covalente del analito en el soporte en fase sólida. En otras realizaciones, un analito es unido indirectamente de manera no covalente a un soporte en fase sólida, por ejemplo, es unido de manera covalente a un enlazador, un agente de unión o un miembro de un par de unión, que se asocia de manera no covalente con el soporte en fase sólida. En todos los casos, la asociación de un analito de interés con una fase sólida no debería afectar sustancialmente, por ejemplo, debería afectar sólo mínimamente, la especificidad de un anticuerpo para el analito asociado en comparación con la especificidad para el analito cuando no está asociado con una fase sólida.

20 Una diversidad de reacciones químicas útiles para unir de manera covalente un analito a un soporte son bien conocidas para las personas con conocimientos ordinarios en la materia (véase, por ejemplo, Hartmann et al. (2002) J. Mater. Res. 17 (2):473-478). Los ejemplos ilustrativos de grupos funcionales útiles para la unión covalente a un soporte incluyen alquilo, Si-OH, carboxi, carbonilo, hidroxilo, amida, amina, amino, éter, éster, epóxidos, cianato, isocianato, tiocianato, sulfhidrilo, disulfuro, óxido, diazo, yodo, grupos sulfónicos o similares que tienen reactividad química o reactividad química potencial.

25 Un analito puede ser unido de manera no covalente a un soporte sólido, tal como a través de adsorción a o revestimiento sobre el soporte en fase sólida, o a través de asociación covalente o no covalente con un enlazador, agente de unión o un miembro de un par de unión, el cual a su vez es unido de manera no covalente o es asociado con el soporte sólido. Los ejemplos ilustrativos de enlazadores, agentes de unión o miembros de pares de unión útiles para la asociación de analitos a un soporte incluyen proteínas, polímeros orgánicos (PEG y sus derivados) y moléculas pequeñas. Los ejemplos particulares preferidos incluyen HSA, BSA, estreptavidina, avidina, biotina, PEG y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

35 Por ejemplo, en una realización preferida, un analito puede ser conjugado de manera no covalente a un agente de unión tal como HSA o BSA y, a continuación, el conjugado covalente resultante puede ser usado para recubrir de manera no covalente un soporte sólido. En otra realización, un analito puede ser conjugado de manera no covalente a un miembro de un par de unión biotina y avidina; a continuación, el conjugado covalente puede ser unido de manera no covalente al otro miembro del par de unión, que puede ser asociado de manera no covalente con (por ejemplo, recubierto) un soporte sólido. En otras realizaciones, un conjugado covalente de un analito con un miembro de un par de unión puede ser unido de manera no covalente al otro miembro del par de unión, que ha sido unido de manera covalente al soporte sólido.

40 Los enlazadores o agentes de unión pueden ser útiles también para unir de manera covalente un analito a un soporte sólido. Por ejemplo, un conjugado covalente de un analito con un agente de unión tal como HSA o BSA puede ser unido de manera covalente al soporte sólido.

45 En algunas realizaciones, la superficie del soporte en fase sólida puede ser modificada para facilitar la fijación estable de los enlazadores o agentes de unión. Generalmente, una persona con conocimientos en la materia puede usar procedimientos rutinarios para modificar un soporte en fase sólida según la aplicación deseada. Los siguientes son ejemplos no limitativos de modificaciones de soportes en fase sólida.

50 La superficie del soporte en fase sólida puede tener, por ejemplo, un revestimiento que facilita la fijación al analito. En general, el revestimiento será uno que sea complementario a una fracción de enlazador en el analito. La superficie de un soporte en fase sólida puede ser amidada, por ejemplo, mediante sililación de la superficie, por ejemplo, con trialcóxiaminosilano. Los soportes tratados con silano pueden ser derivados también con enlazadores homobifuncionales y heterobifuncionales. El soporte puede ser derivado, por ejemplo, de manera que tenga un grupo hidroxilo, un grupo amino (por ejemplo, alquilamina), grupo carboxilo, éster de N-hidroxisuccinimidilo, grupo fotoactivable, sulfhidrilo, cetona u otro grupo funcional disponible para la reacción. Los soportes pueden ser derivados con una máscara con el fin de derivar solo áreas limitadas (por ejemplo, ciertos pocillos de una placa de ensayo de múltiples pocillos) o pueden usarse un ataque químico o luz UV para eliminar la derivación de las regiones seleccionadas.

55 Los grupos funcionales, en lugar de ser revestidos en la superficie, pueden ser incorporados en el primer soporte en fase sólida, durante o después de la preparación del primer soporte en fase sólida. Normalmente, los grupos funcionales se

seleccionan de manera que se disuelvan en uno o más componentes del primer soporte en fase sólida, pero pueden ser fijados de manera covalente al primer soporte en fase sólida.

Procedimientos adicionales para la fijación de un analito a un soporte en fase sólida se describen, por ejemplo, en las publicaciones PCT N° WO 01/84157, WO 99/30160 y WO 06/078618, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente memoria en su totalidad, por referencia.

Tal como se describe en la presente memoria, se asocian dos o más analitos con el soporte en fase sólida. El tipo de asociación de cada uno de los dos o más analitos con el soporte en fase sólida puede ser el mismo o diferente a la asociación de los otros analitos. Por ejemplo, un analito puede ser unido directamente de manera covalente, mientras que otro puede ser unido indirectamente de manera covalente a través de una fracción enlazadora. En otra realización, un analito puede ser unido de manera covalente a un agente de unión tal como BSA, que es unido de manera no covalente a un soporte en fase sólida, mientras que otro analito es unido directamente de manera covalente al soporte en fase sólida. Todo lo que se requiere es que las asociaciones separadas no interfieran (por ejemplo, no interfieren sustancialmente) con la unión de un analito con el anticuerpo específico para el analito.

Las composiciones en fase sólida que comprenden dos o más analitos diferentes asociados con la fase sólida pueden ser sorprendentemente robustas, por ejemplo, pueden ser estables durante un período prolongado de tiempo a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, las composiciones en fase sólida descritas en la presente memoria pueden ser congeladas, liofilizadas o inmovilizadas y almacenadas en condiciones apropiadas. Las condiciones deberían ser tales que permitan que los analitos retengan la actividad.

Las composiciones en fase sólida ejemplares se exponen en las Figs. 1-3 y se describen a continuación.

Aplicaciones

La tecnología descrita en la presente memoria se refiere a la determinación de la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos de interés. Generalmente, los procedimientos implican inmunoensayos competitivos, que son procedimientos bien conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia. En los inmunoensayos competitivos empleados en la presente memoria, un analito unido a una fase sólida compite con un analito presente en una solución de muestra (por ejemplo, una muestra de ensayo) por la unión a un anticuerpo, tal como un anticuerpo marcado. La señal generada por el anticuerpo después de la aplicación de la muestra a la composición en fase sólida puede ser comparada con la generada después de la aplicación de una muestra de control, o antes de la aplicación de la muestra de ensayo, lo que permite la determinación de la presencia de un analito. Es importante destacar que sorprendentemente las presentes composiciones y los procedimientos permiten la detección simultánea o en serie de dos o más analitos, si se desea, con una alta sensibilidad y una mínima interferencia desde los otros analitos.

En los procedimientos, un soporte de analito en fase sólida es preparado mediante la asociación de una fase sólida, tal como una partícula o múltiples pocillos de una placa de múltiples pocillos, con al menos dos analitos. A continuación, el soporte de analito en fase sólida se pone en contacto con uno o más anticuerpos, en el que al menos un anticuerpo es específico para uno de los dos analitos asociados con la composición sólida, y en contacto también con una muestra (por ejemplo, una muestra de ensayo), que puede contener o se sospecha que puede contener uno o más analitos de interés. Típicamente, el anticuerpo está marcado de manera detectable (por ejemplo, radiactiva, fluorescente, luminiscente o enzimáticamente), o puede ser detectado mediante el uso de un anticuerpo secundario que se une al primer anticuerpo usando procedimientos (por ejemplo, procedimientos de amplificación enzimática) conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia. En dichos procedimientos, la interacción del anticuerpo con el analito para el cual es específico resulta en la generación de una señal detectable, por ejemplo, a través del marcador detectable en el anticuerpo o a través de un marcador en el anticuerpo secundario. La señal se mide como una lectura de salida de la presencia o cantidad del analito.

Un anticuerpo para su uso en los procedimientos puede ser cualquier anticuerpo que sea específico para un analito de interés. El término incluye un anticuerpo o un fragmento de unión a analito del mismo. El término incluye también un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo quimérico, un fragmento F_{ab} , un fragmento $F_{(ab)2}$, un fragmento F_{ab} , un fragmento F_v y un fragmento scF_v . Los anticuerpos para un analito de interés pueden ser obtenidos comercialmente desde una serie de fuentes o pueden ser preparados y aislados usando procedimientos conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia, por ejemplo, aislando el anticuerpo de un animal huésped (por ejemplo, un mamífero tal como un rata, conejo, ratón, cabra, vaca, caballo, perro, gato, oveja, burro, pollo o un ser humano) o célula (por ejemplo, un híbrido) que produce el anticuerpo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es específico para el analito de interés y es capaz además de unirse a uno o más metabolitos del analito de interés. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser específico de la cocaína, pero puede demostrar reactividad cruzada de unión con uno o más de los metabolitos de la cocaína. En dichos casos, la reacción cruzada de unión debería ser suficiente para detectar los uno o más metabolitos usando los procedimientos descritos en la presente memoria.

De manera similar, un anticuerpo puede ser específico para un miembro de una clase de droga de interés y puede ser capaz además de unirse a uno o más miembros de la clase de droga de interés y/o sus metabolitos. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser específico para un opioide particular, pero puede demostrar reactividad cruzada de unión a otros opioides. En dichos casos, la reacción cruzada de unión debería ser suficiente para detectar la una o más drogas o metabolitos de drogas dentro de la clase de drogas usando los procedimientos descritos en la presente memoria.

Un procedimiento para determinar la presencia y/o la cantidad de uno o más analitos se realiza de la manera siguiente. Una composición de analito en fase sólida, tal como se ha descrito anteriormente, tal como una microplaca que comprende un micropocillo que tiene al menos dos analitos diferentes asociados con cada micropocillo, se pone en contacto con i) al menos un anticuerpo, en el que el al menos un anticuerpo es específico para un analito de interés, y ii) una muestra, tal como se ha escrito anteriormente. La puesta en contacto puede incluir cualquier procedimiento de contacto, por ejemplo, pipeteado manual, lavado, mecanismos de dispensación robóticos o automáticos u otros procedimientos conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia. Las personas con conocimientos ordinarios en la materia entienden los cuidados rutinarios en los procedimientos de contacto, por ejemplo, técnicas estériles u otros procedimientos para conservar la integridad de la muestra.

La composición de analito en fase sólida puede ponerse en contacto, en primer lugar, con el anticuerpo y, a continuación, con la muestra, o viceversa. Una cantidad conocida de anticuerpo puede ponerse en contacto con la composición en fase sólida, por ejemplo, en procedimientos cuantitativos.

Típicamente, el anticuerpo está marcado de manera detectable y el marcador permite determinar la presencia del analito. Por ejemplo, el anticuerpo puede estar marcado de manera detectable con un marcador fluorescente, luminiscente (incluyendo quimioluminiscente o bioluminiscente), radiactivo o enzimático. En otros casos, el anticuerpo no está marcado, pero es detectado a través del uso de un anticuerpo secundario que está marcado (por ejemplo, marcado enzimáticamente) y que es específico para el primer anticuerpo. En los casos en los que se detectan simultáneamente múltiples analitos, los anticuerpos individuales a cada analito de interés son marcados preferiblemente de manera diferencial, de manera que cada uno pueda ser detectado por separado de los otros, por ejemplo, mediante el uso de marcadores fluorescentes que tienen espectros de absorción/emisión que no se solapan. Los procedimientos para la detección, incluyendo los procedimientos automatizados, son bien conocidos por las personas con conocimientos ordinarios en la materia.

Cualquiera de los procedimientos puede emplear el uso de una etapa de lavado, por ejemplo, para eliminar el anticuerpo y los analitos no unidos a la composición de analito en fase sólida. Las condiciones de lavado adecuadas pueden ser determinadas por las personas con conocimientos ordinarios en la materia y no deben interferir sustancialmente, o interferir sólo mínimamente, con la unión del anticuerpo al analito asociado en la fase sólida.

La presencia del analito en la muestra puede determinarse aprovechando la naturaleza competitiva del ensayo. Por ejemplo, puede determinarse que el analito está presente comparando una señal generada por el anticuerpo (por ejemplo, desde un marcador fluorescente en el anticuerpo) unido a la composición de analito en fase sólida después de contactar con la muestra (por ejemplo, la muestra de ensayo) con una señal generada por el anticuerpo unido a la composición de analito en fase sólida después de contactar con una muestra de control que no comprende el analito de interés.

En cualquier procedimiento, la composición de analito en fase sólida puede ponerse en contacto con un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo es específico para un segundo analito diferente asociado con la fase sólida. El segundo anticuerpo puede ponerse en contacto al mismo tiempo que el primer anticuerpo (por ejemplo, en un ensayo simultáneo de dos analitos), o en serie (por ejemplo, en ensayos en los que se desea determinar la presencia de un primer analito antes de la determinación de un segundo analito). Tal como reconocerá una persona con conocimientos ordinarios en la materia, posiblemente hasta N anticuerpos, que corresponden al número de analitos asociados con la fase sólida, pueden ser empleados en el procedimiento, en el que la población de anticuerpos incluye al menos un anticuerpo específico para cada analito asociado. Además, aunque pueden detectarse hasta N analitos en un ensayo simultáneo, pueden detectarse cualquier número menor en cualquier ensayo, o puede detectarse cualquier combinación, por ejemplo, en un ensayo simultáneo o en serie. Además, en ciertas realizaciones, tales como las que emplean placas de micropocillos, un micropocillo puede ser usado para realizar un ensayo para uno o más analitos de interés, mientras otro micropocillo puede ser usado para realizar un ensayo para el mismo conjunto de analitos de interés, un conjunto diferente de analitos de interés o un conjunto de analitos de interés superpuestos pero no idénticos.

50 **Kits**

En la presente memoria, también se proporcionan kits, tales como kits que incluyen una o más composiciones de analito en fase sólida, descritas en la presente memoria. Los kits pueden incluir componentes adicionales, incluyendo tampones, reactivos, instrucciones de uso y uno o más anticuerpos para su uso en los procedimientos. En algunas realizaciones, un kit incluye al menos un anticuerpo específico para un analito seleccionado de entre el grupo que consiste en cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, norcocaína, PCP, anfetamina, metanfetamina, cannabinoides, THC, carboxi-THC, heroína, codeína, morfina, 6-monoacetilmorfina (MDA), oxicodona, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) y 3,4-

metilendioximetanfetamina (MDMA). En algunas realizaciones, los kits pueden incluir reactivos adicionales para la preparación de la muestra, incluyendo reactivo para extraer o tratar una muestra para su uso en los procedimientos.

Ejemplos

Los ejemplos no incluidos en el alcance de las reivindicaciones son solo para propósitos ilustrativos.

5 **Ejemplo 1: Extracción reductora de analitos a partir de cabello y detección de múltiples analitos usando composiciones en fase sólida que tienen múltiples analitos unidos a las mismas**

Se analizaron muestras de cabello para determinar la presencia de múltiples analitos (por ejemplo, estupefacientes), usando procedimientos de extracción según se divulga en la aplicación US N° 12/111.914 titulada "Non-Proteolytic Method For The Determination Of Analytes In Keratinized Structures", (que divulga procedimientos reductores no proteolíticos para la extracción de analitos a partir de cabello), presentada simultáneamente con la presente memoria el 29 de Abril de 2008. Los resultados obtenidos usando dichos procedimientos reductores no proteolíticos se compararon también con los resultados obtenidos usando los procedimientos según describe en las patentes US Nos. 6.022.693, 6.350.582 y 6.949.344 (que divulgan procedimientos proteolíticos y reductores combinados para la extracción de analitos a partir de cabello). Una vez extraídas, las muestras de ensayo se evaluaron para determinar la presencia de analitos de múltiples fármacos usando los procedimientos y las composiciones divulgados en la presente memoria, por ejemplo, poniéndolas en contacto con una fase sólida que tenía dos o más analitos unidos a la misma y con uno o más anticuerpos primarios, cada uno específico para un analito particular; a continuación, se detectó cada anticuerpo primario, por ejemplo, a través de un marcador en el anticuerpo primario o a través de la detección del anticuerpo primario a través de un anticuerpo secundario marcado.

20 **I. Soluciones**

Soluciones para digerir una muestra de cabello: Solución al 1,5 % de ditiotreitól en agua, pH 9,45 - 9,55

Solución para neutralizar una muestra digerida cabello:

1. 5 % de cloruro de cinc en agua.
2. 1,0 M Bis Tris pH 7
- 25 3. Inmediatamente antes del uso, diluir 1:10 el cloruro de cinc en el Bis-Tris.

II. Procedimiento de tratamiento para la extracción de analito para el inmunoensayo enzimático (IEE)

Se colocaron 8 mg de las muestras de cabello en tubos de ensayo con 0,8 ml de solución de ditiotreitól al 1,5 %, pH 9,5, y las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las muestras se neutralizaron con 70 µl de cloruro de cinc en Bis-Tris, se mezcló bien y se centrifugó.

30 **III. Inmunoensayo enzimático (IEE) usando microplacas revestidas con múltiples analitos y usando extractos de cabello con ditiotreitól: cocaína, opioides, anfetaminas, PCP**

A. Preparación de microplacas: Revestimiento con conjugados BSA-analito

Se prepararon conjugados de BSA (albúmina de suero bovino) de las drogas de interés adquiridos en East Coast Biologicals en agua. Los conjugados de BSA (BSA-benzoilecgonina, BSA-morfina, BSA-PCP, BSA-metanfetamina) se disolvieron en agua de manera que había presentes de 1 a 10 ng de cada uno de los analitos en 50 µl de solución de conjugado de droga.

Para revestir los pocillos, se añadieron cincuenta µl por pocillo de la solución de conjugado de droga que contenía los conjugados de BSA de benzoilecgonina, morfina, PCP y metanfetamina a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos (microplaca de alta unión de Corning Scientific). La placa se revistió y se colocó en un aparato rotatorio durante la noche a temperatura ambiente (TA) con rotación a aproximadamente 100 ciclos/min.

Después de la rotación durante la noche, la mezcla de analito se retiró y los pocillos se lavaron una vez con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Para bloquear los pocillos, se añadieron 300 µl de PBS que contenían 1 % de BSA a todos los pocillos, y las microplacas se sometieron a rotación a TA durante 4-6 horas (velocidad de rotación de unos 100 ciclos/min).

45 Después del bloqueo, los pocillos se lavaron 6 veces con PBS que contenía 0,01 % de Tween-20. Después del lavado, las placas se invirtieron y se golpearon contra la mesa para eliminar cualquier líquido. A continuación, las placas se dejaron invertidas para secarse sobre la mesa durante unas horas o toda la noche. Una vez secas, se colocaron en bolsas de vacío desecadas herméticas, el aire se retiró de la bolsa con una bomba de vacío y la bolsa se selló para el almacenamiento.

B. Análisis

5 Se combinaron alícuotas de las muestras de cabello digeridas y neutralizadas en los pocillos de la microplaca con un anticuerpo primario apropiado dirigido contra el analito o los analitos de interés. Después de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron con PBS en un lavador de placas automatizado. Después del lavado, el anticuerpo secundario (dirigido contra la especie de anticuerpo primario) ligado a HRP (peroxidasa de rábano picante) se añadió a los pocillos y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las placas se lavaron de nuevo y el sustrato (TMB, 3,3',5,5', trimetilbenzidina) se incubó en los pocillos durante 30 minutos. Finalmente, se añadieron 50 ul de HCl 4 N y se leyó la absorbancia a 620 mu.

1. Cocaína en cabello: Inmunoensayo enzimático (IEE) de analito en fase sólida**10 Resultado ejemplar para cocaína mediante IEE de antígeno en fase sólida**

Muestra	Porcentaje*	Resultados MS**, ng/10 mg de cabello			
		COC	BE	CE	NOR
Negativa (Bo)	100				
Corte (5 ng/10 mg cabello)	53,9				
Muestra positiva 59498	12,5	31,6	13	6,3	1,1
Muestra positiva 59501	22,3	12,7	0,7	0	0
Muestra positiva 59571	27,8	9,4	1,3	0	0,3
Muestra negativa 59718	97,5				
Muestra negativa 59708	91,3				
Muestra negativa 58714	94,6				
Control menos 50 %	61,5				
Control más 50 %	44				

*Nota: Porcentaje de B/Bo para IEE - El valor (Bo) negativo de 100 % es el tubo de referencia que no contiene analito en la muestra y exhibe máxima unión del anticuerpo al antígeno. Las muestras desconocidas se expresan como porcentaje del Bo Negativo, denominado "Porcentaje B/Bo". Las concentraciones de analito en las muestras varían inversamente con los valores de porcentaje B/Bo. Una muestra positiva es una que contiene droga igual o superior al calibrador de corte y, de esta manera, un porcentaje B/Bo igual a o menor que el calibrador de corte.

**COC = cocaína; BE = benzoilecgonina, CE = cocaetileno; NOR = norcocaína

2. Opioides en cabello: Inmunoensayo enzimático de antígeno en fase sólida**Resultado ejemplar para opioides mediante IEE de analito en fase sólida**

Muestra	Porcentaje*	Resultados MS**, ng/10 mg de cabello			
		Codeína	Morfina	MAM	Oxicodona
Negativa (Bo)	100				
Corte (2 ng/10 mg cabello)	43,9				
Muestra positiva 59028	7,7	0,8	7,9	7,8	0,3
Muestra positiva 58641	13,3	3,6	48,8	85,4	0,8
Muestra positiva 58714	11,9	4,3	21,3	5,4	0
Muestra negativa 42621	92,8				
Muestra negativa 42625	98,2				

(continuación)

Muestra	Porcentaje*	Resultados MS**, ng/10 mg de cabello			
Negativa (Bo)	100	Codeína	Morfina	MAM	Oxicodona
Muestra negativa 42644	93,6				
Control menos 50 %	66,3				
Control más 50 %	28,9				
** MAM = 6-monoacetilmorfina					

3. Metanfetamina/MDMA en cabello: Inmunoensayo enzimático de analito en fase sólida

Resultado ejemplar para metanfetamina/MDMA (éxtasis) mediante IEE de analito en fase sólida

Muestra	Porcentaje*	Resultados MS**, ng/10 mg de cabello			
Negativa (Bo)	100	MET	ANF	MDMA	MDA
Corte (5 ng/10 mg cabello)	49				
Muestra positiva 59708	11,3	2,6	0	214	6,7
Muestra positiva 59714	14,4	26,9	3,8	0	0
Muestra positiva 58718	47,2	6,7	0,7	0	0
Muestra negativa 42625	100,5				
Muestra negativa 42642	102,2				
Muestra negativa 42655	97,9				
Control menos 50 %	67,2				
Control más 50 %	39				
**MET = metanfetamina; ANF = anfetamina; MDA = 3,4-metilendioxianfetamina; MDMA = 3,4-metilendioximetanfetamina					

5

Ejemplo 2: Extracción con metanol de analitos de cabello y detección de múltiples analitos usando composiciones en fase sólida que tienen múltiples analitos unidos a las mismas

Se analizaron muestras de cabello para determinar la presencia de múltiples analitos (por ejemplo, estupefacientes), usando procedimientos de extracción metanólicos según se divulga en Yegles, et al., en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 73 - 94; Jurado, C. en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 95-125; Cheze, M. et al. en: Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair, CRC Press, 2007, pp. 163 - 185). Una vez extraídas, las muestras de ensayo se evaluaron para determinar la presencia de múltiples analitos de drogas usando los procedimientos y las composiciones divulgados en la presente memoria, por ejemplo, poniéndolas en contacto con una fase sólida que tiene dos o más analitos unidos a la misma y con uno o más anticuerpos primarios, cada uno específico para un analito particular; a continuación, se detecta cada anticuerpo primario, por ejemplo, a través de un marcador en el anticuerpo primario o a través de la detección del anticuerpo primario a través de un anticuerpo secundario marcado.

I. Soluciones

Metanol acidificado: metanol con 1 % de HCl.

II. Procedimiento de tratamiento para la extracción de analito para el inmunoensayo enzimático

Se añadieron dos ml de metanol acidificado a 10-12 mg de cabello en tubos de vidrio con tapa roscada. Los tubos se incubaron a 60° C durante la noche (16 horas). El metanol se eliminó en un tubo limpio y el cabello se secó por evaporación en un bloque de calor a 50°C. Las muestras secas se reconstituyeron en PBS a una concentración de cabello de 10 mg cabello/ml de PBS.

25

III. Inmunoensayo enzimático usando microplacas revestidas de múltiples analitos y usando extractos metanólicos de cabello: cocaína, opioides, anfetaminas

Para el IEE, todos los reactivos se filtran para evitar la contaminación bacteriana.

A. Preparación de microplacas: Revestimiento con conjugados BSA-analito - Placa COMBO

5 Las microplacas se prepararon tal como se ha descrito anteriormente en el **Ejemplo 1.IIIA**.

B. Análisis

El análisis del extracto se realizó de la misma manera que el análisis de las muestras digeridas.

1. Cocaína en cabello: Inmunoensayo enzimático de analito en fase sólida usando extracción con metanol

Resultado ejemplar para cocaína mediante IEE de analito en fase sólida

Muestra	Porcentaje	Resultado	Resultados MS, ng/10 mg de cabello			
			COC	BE	CE	NOR
Negativa (Bo)	100					
Corte (5 ng/10 mg cabello)	41,5					
Muestra positiva 60303	3,0	POS	174,1	14,5	20,9	2,5
Muestra positiva 60304	3,6	POS	118,7	33,5	0	2,3
Muestra positiva 60312	4,9	POS	70,5	26,8	0,2	2,3
Muestra positiva 60373	8,3	POS	26	6,1	2,3	0,4
Muestra negativa 42642	92,8					
Muestra negativa 42647	85,6					
Muestra negativa 42650	87,4					
Muestra negativa 42677	90,2					
Muestra negativa 42777	94,0					
Control menos 50 % (2,5 ng/10 mg cabello)	53,1					
Control más 50 % (7,5 ng/10 mg cabello)	36,1	POS				

2. Opioides en cabello: Inmunoensayo enzimático de analito en fase sólida usando extracción con metanol

Resultado ejemplar para opioides de IEE de analito en fase sólida

Muestra	Porcentaje	Resultado	Resultados MS, ng/10 mg de cabello			
			Codeína	Morfina	6-MAM	Oxicodona
Negativa (Bo)	100					
Corte (2 ng/10 mg cabello)	29,6					
Muestra positiva 60370	5,7	POS	0	10,5	38,9	71
Muestra positiva 60575	27,3	POS	2,2	1,8	0	1
Muestra positiva 60482	16,4	POS	0,4	1,5	3,7	0
Muestra negativa 42642	108,8					
Muestra negativa 42647	105,7					
Muestra negativa 42650	88,9					
Muestra negativa 42677	105,7					
Muestra negativa 42777	112,1					
Control menos 50 % (2,5 ng/10 mg cabello)	47,7					
Control más 50 % (7,5 ng/10 mg cabello)	20,1	POS				

3. Metanfetamina/MDMA en cabello: Inmunoensayo enzimático de analito en fase sólida usando extracción con metanol

5

Resultado de ejemplo para metanfetamina/MDMA (éxtasis) mediante IEE de analito en fase sólida

ES 2 562 659 T3

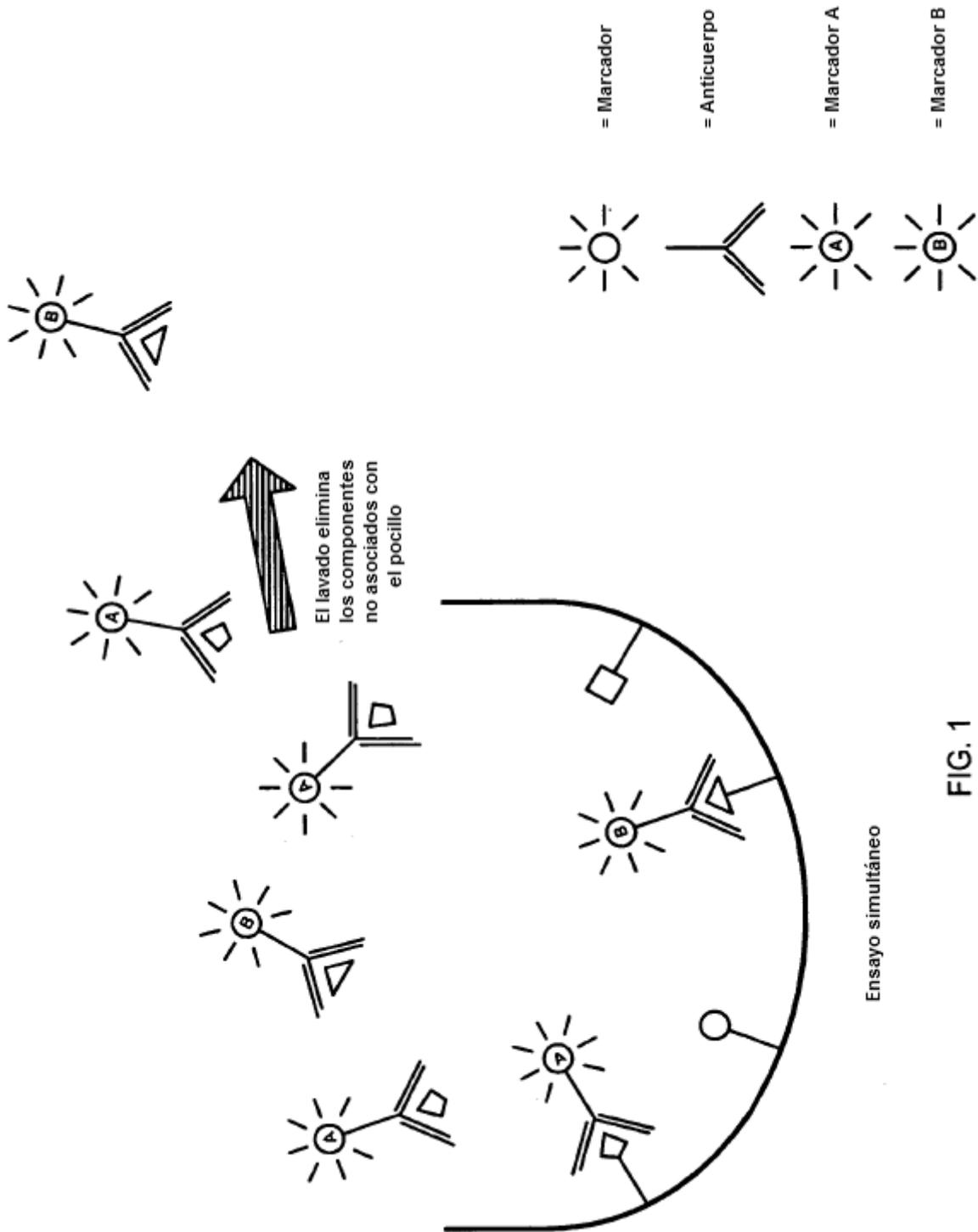
Muestra	Porcentaje	Resultado	Resultados MS, ng/10 mg de cabello			
			Met	Anf	MDMA	MDA
Negativa (Bo)	100					
Corte (5 ng/10 mg cabello)	46,7					
Muestra positiva 60320	25,4	POS	17,5	0,8		
Muestra positiva 60360	12,9	POS	22,8	0,8	120	21
Muestra positiva 60435	25,4	POS	15	2,6		
Muestra positiva 60448	20,3	POS	3,3	0,1	182,1	8,9
Muestra negativa 42642	92,2					
Muestra negativa 42647	94,1					
Muestra negativa 42650	94,1					
Muestra negativa 42677	95,7					
Muestra negativa 42777	95,3					
Control menos 50 % (2,5 ng/10 mg cabello)	54					
Control más 50 % (7,5 ng/10 mg cabello)	41,4	POS				

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia de un analito de interés en una muestra, que comprende:
 - (a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en el que la composición de analito en fase sólida comprende al menos dos analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos dos analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo en fase sólida como una mezcla, en el que además uno de los al menos dos analitos diferentes es el analito de interés, con:
 - i) un anticuerpo, en el que el anticuerpo es específico para el analito de interés; y
 - ii) una muestra; y
 - (b) determinar si el analito de interés está presente en la muestra, preferentemente en el que el anticuerpo está marcado de forma detectable.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición de analito en fase sólida se pone en contacto, en primer lugar, con la muestra y, a continuación, con el anticuerpo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende eliminar el anticuerpo que no está unido a la composición de analito en fase sólida.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto la composición de analito en fase sólida con un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo es específico para el al menos segundo analito diferente asociado con la fase sólida, y determinar si el segundo analito está presente en la muestra.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los al menos dos analitos diferentes están asociados con la fase sólida de manera no covalente, bien directa o indirectamente, o en el que los al menos dos analitos diferentes están asociados con la fase sólida de manera covalente, bien directa o indirectamente, o en el que los al menos dos analitos diferentes están asociados con la fase sólida mediante adsorción, bien directa o indirectamente, o en el que los al menos dos analitos diferentes están unidos de forma covalente a un agente de unión que está asociado con la fase sólida de forma no covalente o mediante adsorción.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el agente de unión es seleccionado de entre HSA y BSA.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra corporal o una muestra derivada de una muestra corporal.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos son seleccionados del grupo que consiste en: opioides, esteroides, anfetaminas, cannabinoides, benzodiacepinas, AINE, barbitúricos, tricíclicos y efedrinas.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición de analito en fase sólida comprende al menos tres analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos tres analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos, o en el que la composición de analito en fase sólida comprende al menos cuatro analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos cuatro analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos, o en el que la composición de analito en fase sólida comprende al menos cinco analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos cinco analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los al menos dos medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos son seleccionados del grupo que consiste en: opioides, esteroides, anfetaminas y benzodiacepinas, o en el que los al menos dos medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos son seleccionados del grupo que consiste en: esteroides y benzodiacepinas.
11. Un procedimiento de determinación de la presencia de una pluralidad de analitos de interés diferentes, representados por el número "N", en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
 - (a) poner en contacto una composición de analito en fase sólida, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos "N" analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos "N" analitos

diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo en fase sólida como una mezcla,
en el que además la unión de los al menos "N" analitos diferentes incluye la pluralidad de analitos de interés, con:

- 5 i) una pluralidad de anticuerpos, en el que la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo específico para cada analito de interés diferente; y
ii) una muestra; y
- (b) determinar si cada analito de interés diferente en la pluralidad está presente en la muestra.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que los anticuerpos específicos para cada analito de interés diferente son detectables por separado.
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la pluralidad de anticuerpos se pone en contacto con la composición de analito en fase sólida simultáneamente, o en el que al menos uno de la pluralidad de anticuerpos se pone en contacto con la composición de analito en fase sólida en un momento diferente al de al menos otro de la pluralidad de anticuerpos.
- 15 14. El procedimiento de la reivindicación 7 u 11, en el que la muestra es una estructura queratinizada, preferentemente en el que la muestra es cabello.
15. Una composición que comprende al menos dos analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en la que los al menos dos analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos y están unidos a dicho receptáculo en fase sólida como una mezcla.
- 20 16. La composición de la reivindicación 15, en la que los al menos dos analitos diferentes están unidos de manera covalente a la fase sólida, bien directa o indirectamente, o en la que los al menos dos analitos diferentes están unidos de manera no covalente a la fase sólida, bien directa o indirectamente, o que comprende de 2 a 10 analitos diferentes unidos a una fase sólida, o en el que los al menos dos analitos diferentes son seleccionados del grupo que consiste en: opioides, esteroides, anfetaminas, cannabinoides, benzodiazepinas, AINE, barbitúricos, tricíclicos y efedrinas.
- 25 17. La composición de la reivindicación 15, en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos tres analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en la que los al menos tres analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos, o en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos cuatro analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en la que los al menos cuatro analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos, o
- 30 en la que la composición de analito en fase sólida comprende al menos cinco analitos diferentes unidos a un receptáculo en fase sólida, en el que los al menos cinco analitos diferentes son medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos.
- 35 18. La composición de la reivindicación 15, en la que los al menos dos medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos son seleccionados del grupo que consiste en: opioides, esteroides, anfetaminas y benzodiazepinas, o en la que los al menos dos medicamentos de venta con receta o de venta sin receta o metabolitos de los mismos, son seleccionados del grupo que consiste en: esteroides y benzodiazepinas.
- 40 19. Un kit que comprende la composición de la reivindicación 15, y al menos un anticuerpo específico para al menos uno de los dos analitos diferentes asociados con la fase sólida.



Ensayo simultáneo

FIG. 1

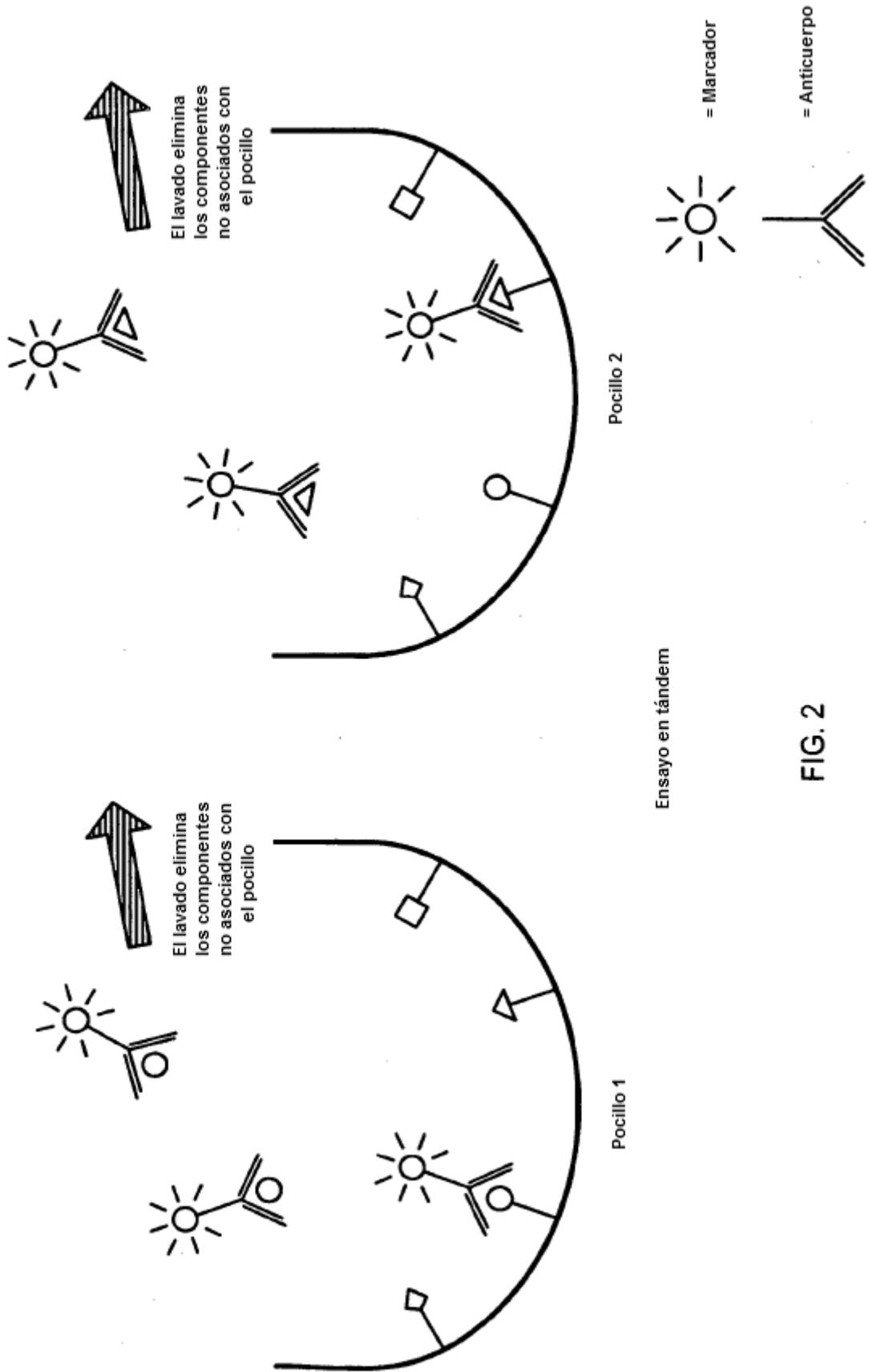


FIG. 2

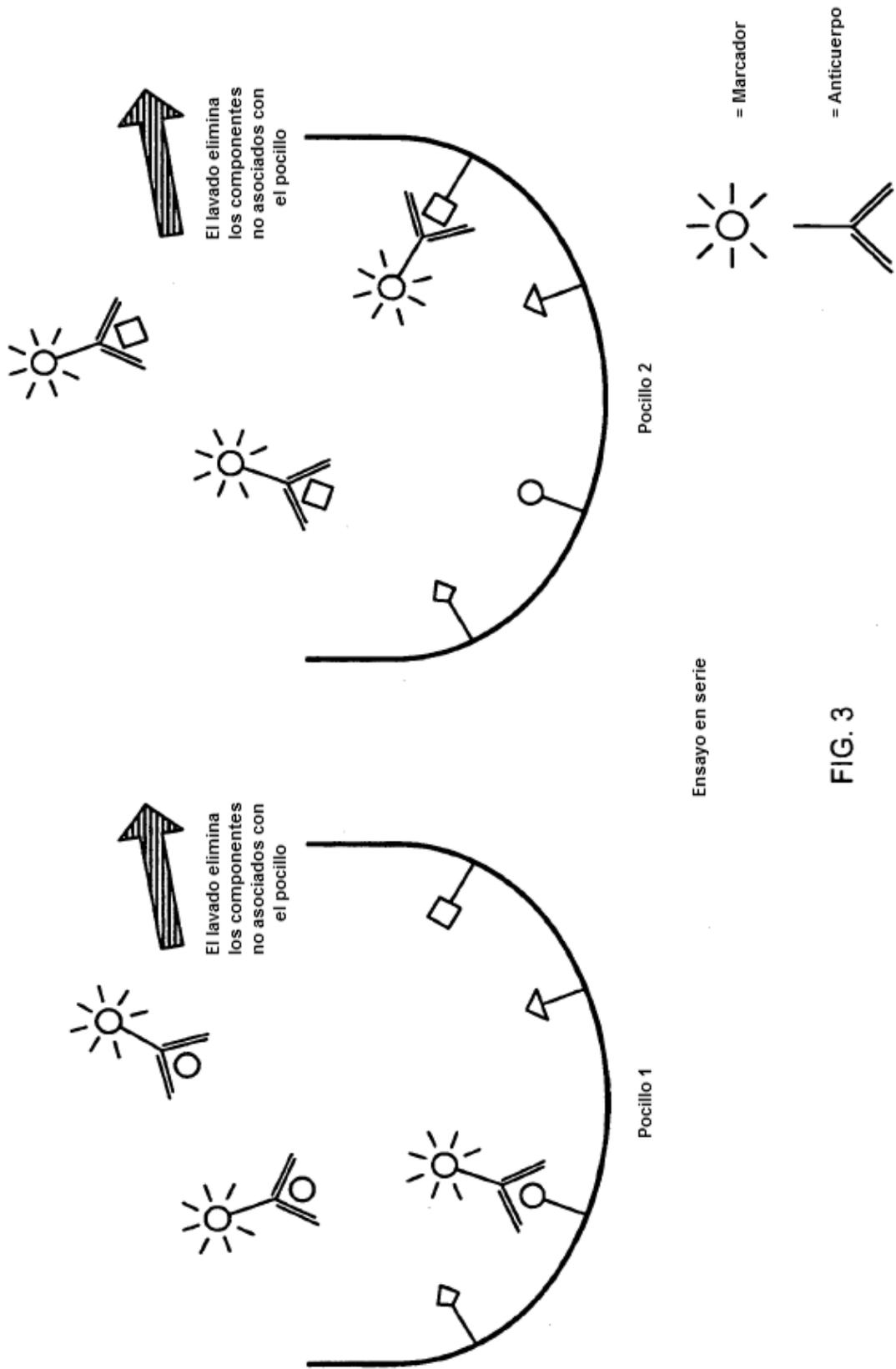


FIG. 3