

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 978**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2009 PCT/US2009/039280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009 WO09124179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2009 E 09727858 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2274612**

54 Título: **Separación virtual de marcador unido y libre en un ensayo de ligando para realizar inmunoensayos de fluidos biológicos, incluyendo sangre completa**

30 Prioridad:

**02.04.2008 US 41797**

**02.04.2008 US 41790**

**02.04.2008 US 41791**

**02.04.2008 US 41784**

**02.04.2008 US 41794**

**09.04.2008 US 43571**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.03.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT POINT OF CARE, INC. (100.0%)**

**400 College Road East**

**Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**WARDLAW, STEPHEN, C. y**

**LEVINE, ROBERT, A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 604 978 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

Separación virtual de marcador unido y libre en un ensayo de ligando para realizar inmunoensayos de fluidos biológicos, incluyendo sangre completa

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente invención se refiere a la detección virtual, cuantificación y caracterización de sustancias detectadas inmunológicamente de forma electrónica en fluidos biológicos humanos y animales, tales como sangre completa, suero, plasma, orina, leche, fluido pleural y peritoneal, y semen, cuya detección, cuantificación y caracterización se realizan en una cámara delgada sobre una muestra de fluido quiescente, teniendo dicha cámara al menos dos paredes planas paralelas, al menos una de las cuales es transparente.

15 2. Información antecedente

20 Esta invención se refiere a la mejora en el rendimiento de todos los inmunoensayos que implican actualmente la separación física de un analito unido del libre realizando, en cambio, una separación virtual del marcador unido y libre detectado ópticamente en un ensayo de ligando, donde el marcador es preferiblemente un marcador fluorescente, aunque será suficiente cualquier marcador ópticamente detectable y cuantificable. Las cámaras para su uso en este ensayo y los instrumentos para medir los analitos en estas cámaras se describen en las siguientes patentes de Estados Unidos expedidas n.º 6.929.953 expedida para S. C. Wardlaw; 6.869.570 expedida para S. C. Wardlaw; 6.866.823 expedida para S. C. Wardlaw; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2007/0087442, de S. C. Wardlaw, publicada el 19 de abril de 2007.

25 La separación física de los analitos unidos de los libres se ha conseguido, en la técnica anterior, por múltiples medios incluyendo, aunque sin limitación, la adsorción del marcador libre por carbón vegetal o talco, separación magnética de perlas que contienen el analito unido o no unido, adsorción del analito marcado unido por el recipiente, tal como anticuerpos acoplados a la pared de un tubo de ensayo y el uso de anticuerpos secundarios de precipitación dirigidos contra el anticuerpo que se une al analito seguido de centrifugación, así como los métodos descritos en las patentes y publicaciones indicadas anteriormente.

30 Algunos de los tipos de separación física de la técnica anterior de ensayos de analito diana unido se describen en las siguientes patentes de Estados Unidos: 5.834.217; 5.776.710; 5.759.794; 5.635.362; 5.593.848; 5.342.790; 5.460.979; 5.480.778; y 5.360.719, todas expedidas para R. A. Levine et al. En las patentes mencionadas anteriormente, la separación del analito unido del libre se realiza por centrifugación, u otros métodos físicos, tales como decantación, filtración o similares.

35 La técnica anterior también describe un tipo de inmunoensayo, que se llama un "inmunoensayo homogéneo". Los inmunoensayos homogéneos no requieren la separación física del analito unido del no unido o libre. La "separación del unido del libre" se consigue utilizando la interferencia estérica de una enzima por el anticuerpo relativamente grande y cuantificando los productos coloreados o fluorescentes de la acción enzimática. Métodos adicionales de ensayos homogéneos utilizan la inactivación fluorescente de fluoróforos para distinguir el analito unido del libre. Aunque estos métodos simplifican enormemente el rendimiento de los inmunoensayos, generalmente son útiles solamente para altas concentraciones de analitos con bajo peso molecular ya que el gran peso molecular de analitos diana tales como proteínas (por ejemplo, insulina), hormonas del crecimiento y similares también interferirá con la enzima y puede afectar a la inactivación. Además, los inmunoensayos de este tipo homogéneo típicamente no tiene la alta sensibilidad de los inmunoensayos convencionales.

40 Sería muy deseable proporcionar un ensayo de ligando de un analito diana donde la cuantificación del analito diana es una virtual que puede realizarse electrónicamente teniendo de ese modo las ventajas de un inmunoensayo homogéneo manteniendo al mismo tiempo la sensibilidad de los inmunoensayos convencionales, así como la capacidad de tener analitos diana de gran tamaño tales como hormonas como insulina, hormona del crecimiento y similares.

45 Los inmunoensayos se usan para analizar una amplia gama de analitos, tales como hormonas en la sangre, etc. Trabajan por la técnica general de encontrar un agente de unión específico que se una específicamente al analito diana que se está midiendo. Un agente de unión se menciona en este documento como ligando. Los ligandos se definen en este documento como incluyendo, aunque sin limitación, los anticuerpos, lectinas, aptámeros o sustancias de origen natural, que son funcionales para unirse a un analito diana. La muestra a medirse se mezcla con el ligando que es específico para el analito diana, y una versión marcada del analito a medirse. Según se incubaba esta mezcla, las moléculas de analito diana marcadas y no marcadas compiten por los sitios de unión sobre el ligando. Después de un periodo adecuado, el ligando se retira por cualquiera de varios medios, y se compara el marcador unido al ligando con el marcador que no está unido y permanece libre en la mezcla. Esta relación de unido/libre se refiere a la concentración del analito diana originalmente en la muestra, aunque el marcador unido o

libre puede dar la misma información. El uso de las relaciones permite la comprobación del control de calidad donde el total de unido más libre es relativamente constante so el volumen es constante. Este control de calidad también puede emplearse en la práctica de esta invención.

5 De acuerdo con aspectos de la presente invención, se proporciona un método expuesto en las reivindicaciones 1 y 7. Se describe un método para ensayar una muestra de fluido biológico para un material de analito diana que puede estar en la muestra de fluido. El método utiliza una separación virtual del analito diana libre y unido dispuesto dentro de la muestra de fluido, que implica la exploración electrónica de la muestra. El método implica colocar la muestra de fluido en una cámara de ensayo que tiene una altura predeterminada y fija para producir una capa fina de la muestra de fluido en la cámara. Al menos una pared de la cámara es transparente, habitualmente la pared superior, de modo que muestra pueda observarse en la cámara. En ciertos casos, tanto la pared superior como la inferior de la cámara son transparentes. La altura de la cámara (por ejemplo, típicamente de  $\mu\text{m}$  a  $200\ \mu\text{m}$ ) puede variar de acuerdo con la aplicación disponible. Por ejemplo, cuando se está analizando sangre completa anticoagulada, una altura de cámara de  $6\ \mu\text{m}$  es ventajosa porque crea una monocapa de glóbulos rojos y lagunas de plasma intercaladas dentro de la muestra de sangre.

La altura de la estructura fija o la perla recubierta de ligando debe ser, óptimamente, de no menos de una décima parte de la de la cámara y, de forma ideal, aproximándose a la altura de la cámara. La razón de esto es que si la cantidad total de marcador (por ejemplo, fluoróforo) presente en el estado libre, que rodea la partícula o estructura a la que el marcador está unido, es mucho mayor que la cantidad de la cantidad más baja de marcador unido a detectarse, la capacidad de determinar de forma precisa la cantidad de marcador unido a la perla o estructura se disminuye debido a la influencia de las relaciones de señal a ruido. Matemáticamente, no existe límite a la altura de la cámara, pero los límites prácticos debido a la señal a ruido del marcador detectado requieren una cámara delgada y estructuras que ocupan al menos el diez por ciento del volumen de un cilindro trazado alrededor de la periferia de la estructura y que se extiende desde la base hasta la punta de la cámara para la función óptima. En ejemplos donde el ligando es adherente a la parte superior o inferior de la cámara, en lugar de una estructura o perla, se aplican las relaciones anteriores, pero el ensayo debe formularse de forma óptima de modo que el volumen cilíndrico por encima del área de ligando unido contenga no más de diez veces la cantidad más baja unida al área de ligando que se desea detectar. Esta restricción puede disminuirse haciendo la cámara lo más delgada posible o alterando la estequiometría de la reacción.

El método de esta invención puede usarse para ensayar alergias a fármacos o sensibilidades a alérgenos en pacientes en el lugar de asistencia. Las alergias a fármacos y sensibilidades a alérgenos son un problema común e importante. Es caro para el paciente y la sociedad. Tratar a un paciente alérgico a la penicilina con un fármaco de la clase de la penicilina, por ejemplo, puede causar la muerte o reacciones graves. La penicilina se usa en este análisis como un fármaco representativo y porque es el tipo de fármaco que es la causa más común de reacciones alérgicas severas. La presente invención no se limita al ensayo de alergias a la penicilina, y puede usarse para ensayar la sensibilidad a otros fármacos (por ejemplo, antibióticos, relajantes musculares, anestésicos, etc.) y alérgenos.

40 La penicilina es un fármaco económico, eficaz y generalmente no tóxico. Los pacientes que creen tener una alergia a la penicilina pueden tratarse con otro fármaco dirigido menos microbiano en vista de la alergia percibida. Dichos fármacos de remplazo pueden causar graves efectos secundarios en los pacientes, sin embargo, y generar enormes costes para el sistema de asistencia sanitaria, ya que las medicaciones más nuevas pueden ser cientos o miles de veces más caras que los fármacos de penicilina. Son igual de importantes los costes para la sociedad asociados con el desarrollo aumentado de bacterias, virus u otros agentes infecciosos resistentes a fármacos que sucede cuando se usan fármacos de amplio espectro en lugar de fármacos más centrados en el organismo diana. Es importante, por lo tanto, para los pacientes individuales, los asistentes sanitarios y la sociedad, determinar la presencia o ausencia de alergias a fármacos o sensibilidades a alérgenos por métodos, además del historial dado por el paciente. Un objetivo de esta invención es detectar la presencia o ausencia de alergias a fármacos y/o sensibilidades a alérgenos en una muestra de sangre completa o plasma de un paciente.

Está bien documentado que muchos pacientes que reivindican ser alérgicos a la penicilina no son alérgicos y asimismo algunos pacientes que piensan que no son alérgicos pueden haber desarrollado una alergia desde su última exposición. Existen muchos informes de que el 80 % de los individuos que creen que son alérgicos a la penicilina tolerarán, de hecho, el uso de la penicilina, de modo que para estos pacientes las restricciones sobre la elección de antibióticos, que potencialmente producen un tratamiento menos eficaz, más tóxico y más caro, son innecesarias.

En ninguna parte se necesita más la capacidad de detectar la alergia a fármacos que en los encuentros con el paciente en el lugar de asistencia. Los médicos que van a prescribir una medicación en su consulta, la sala de urgencias o el hospital no tienen el lujo de poder esperar muchas horas o un día para que se realice el ensayo *in vitro* o por ensayos cutáneos. El ensayo cutáneo puede exponer al paciente, además, al riesgo de reacción a la sustancia de ensayo y tiene la posibilidad teórica de inducir alergia o aumentarla mediante una respuesta anamnésica. Los ensayos *in vitro* actuales son complejos, se tarda mucho tiempo en realizarlos y proporcionan información al médico mucho después del momento en que sería más útil. Además, la naturaleza alérgica de muchos fármacos, incluyendo fármacos de tipo penicilina, puede deberse a más de un epítopo y el ensayo preciso

requeriría el ensayo de todos los epítomos comunes que pueden ser la causa de la respuesta alérgica. El ensayo de RAST, bien descrito en la bibliografía, se realiza generalmente sobre una cantidad limitada de alérgenos de ensayo y sus epítomos.

5 Generalmente se está de acuerdo en que la respuesta inmunitaria mediada por IgE es la causa de la reacción alérgica más severa, incluyendo anafilaxia, urticaria, inflamación intestinal con diarrea y obstrucción respiratoria debido a inflamación de las vías respiratorias. Se sugiere por algunos expertos que otras clases de inmunoglobulinas también pueden contribuir a la respuesta alérgica a los fármacos, pero generalmente la respuesta alérgica a alergias a fármacos mediadas por IgG e IgM no es potencialmente mortal y muy probablemente será una erupción.

10 Una ventaja de la presente invención es que proporciona un medio para realizar, de forma óptima en el lugar de asistencia, una determinación de la presencia de IgE o cualquier otra inmunoglobulina que tiene una afinidad por uno o más fármacos que se indica o pueden indicarse para su uso en una situación dada.

15 El marcador de elección es el uso de un fluoróforo que se detecta fácilmente y fija al ligando. La presente invención no está limitada al uso de marcadores fluorométricos, sin embargo. Puede usarse más de un fluoróforo de color, si se desea, para comprobar la presencia o ausencia de más de una clase de inmunoglobulina que pueda llegar a fijarse a las perlas en la misma cámara. Las perlas sin el antígeno fijado se usan como controles. Las perlas de control pueden ser química o geoméricamente similares a las perlas recubiertas, difiriendo solamente en el color u otro medio que posibilite su detección (por ejemplo, la fluorescencia o combinaciones de colorantes de fluorescencia incorporados en su estructura). Las perlas de control proporcionan un control de modo que la detección, por ejemplo, de una señal fluorescente significativa desde el anticuerpo marcado fluorescente dirigido contra la IgE que está fijada a las perlas que contienen un determinante (epítomo) del fármaco que se está ensayando como alérgeno potencial, puede compararse con la señal que está presente en perlas similares no recubiertas o unidas al epítomo. Por tanto, se controla la unión no específica y no producirá un falso positivo.

#### Descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 es una vista lateral esquemática de una superficie que alberga ligando que puede usarse para realizar una inmunoensayo sobre una muestra de sangre u otra muestra de acuerdo con la técnica anterior.  
 La FIG. 1(a) es una vista similar a la FIG. 1, pero que muestra la superficie después de que la muestra se haya retirado por lavado de la misma de acuerdo con la técnica anterior.  
 35 La FIG. 2 es una vista lateral esquemática similar a la FIG. 1, pero que muestra una superficie que alberga ligando, que puede usarse para realizar un inmunoensayo tipo sándwich sobre una muestra de sangre u otra muestra de acuerdo con la técnica anterior.  
 La FIG. 2(a) es una vista similar a la FIG. 2, pero que muestra la muestra después de haber añadido un segundo marcador a la muestra de acuerdo con la técnica anterior.  
 La FIG. 2(b) es una vista similar a la FIG. 2(a), pero que muestra la superficie después de que la muestra se haya retirado por lavado de la misma de acuerdo con la técnica anterior.  
 40 La FIG. 3 es una vista en planta de una primera realización de una cámara de muestreo formada de acuerdo con esta invención, que contiene una muestra de sangre completa anticoagulada a la que se ha añadido partículas de captura del analito que albergan el ligando de la muestra de sangre.  
 La FIG. 4 es una vista lateral seccionada de una parte de la cámara de muestreo de la FIG. 3 que contiene una de las partículas de captura del analito diana recubiertas con ligando.  
 45 La FIG. 5 es una vista en planta de una cámara de ensayo como la mostrada en la FIG. 4, que muestra un área de la muestra, que contiene una de las partículas de captura del analito diana recubiertas con ligando y también que muestra otra área de la muestra que no contiene una de las partículas de captura del analito diana recubiertas con ligando, sino que solamente contiene el analito diana marcado libre en la muestra de sangre.  
 50 La FIG. 6 es una vista fragmentada en sección transversal de una superficie de captura del analito diana parcialmente recubierta con ligando, donde partes de la superficie están recubiertas con ligandos y otras partes de la superficie no.  
 FIG. 7 es una vista esquemática seccionada de una cámara cerrada que tiene una superficie superior, tal como la mostrada en la FIG. 6.  
 55 La FIG. 8 es una vista en planta de la superficie mostrada en la FIG. 6.  
 La FIG. 9 es un trazo de las emisiones de las bandas de ligando sobre la superficie de captura mostrada en las FIG. 6 y 8.

#### Descripción detallada de la invención

60 Con referencia ahora a los dibujos, las FIG. 1 y 1(a) ilustran un inmunoensayo competitivo de la técnica anterior (también mencionado como un "ensayo de equilibrio") que se usa habitualmente para analitos de bajo peso molecular, tales como la hormona tiroidea, tiroxina, donde el número 1 se refiere a una superficie a la que un ligando 2, que es específico para el analito diana, se fija por cualquiera de varios medios bien conocidos en la técnica. La superficie 1 puede ser una pared transparente de un tubo o una partícula de vidrio o plástico. Una solución 3 contiene una mezcla del analito diana sin marcar 4 (el desconocido) y un analito diana marcado 5. Después de un

periodo de tiempo, que puede ser de minutos a horas, dependiendo de la diana y el marcador, el analito diana marcado 5 y el analito diana no marcado 4 estarán en un equilibrio entre sí, donde mucho, pero generalmente no todos, los sitios del ligando 2 estarán ocupados con un analito diana marcado 5 o analito diana no marcado 4. En este punto (FIG. 1a), la mezcla 3 se separa de la superficie 1 que alberga el ligando de un modo que conserva los analitos diana marcados 5 que se unen al ligando 2. Los analitos diana marcados 5 unidos a la superficie 1 se mide después (véase la FIG. 1a), y los analitos diana marcados libres también pueden medirse o pueden calcularse como: Total = Libre + Unido, o Unido = Total - Libre. La relación de analito diana unido a libre está inversamente relacionada con la cantidad total de analito diana en la muestra.

Las FIG. 2 - FIG. 2 (b) muestran un ensayo de ligando a menudo mencionado como un ensayo tipo "sándwich", donde se utilizan dos ligandos diferentes. La superficie 1 tiene el ligando 2 unido ("ligando unido") a la misma de una manera similar a la descrita anteriormente, y la muestra que contiene el analito diana 4 se introduce en la solución 3 y se incuba con la superficie 1. De forma inmediata, o después de un periodo adecuado de tiempo, se introduce un ligando marcado diferente 6 en la solución, que es un ligando marcado 6 que se une a un sitio en el analito diana 4 que es diferente del ligando unido 2 (FIG. 2a). Esto, en efecto, crea un "sándwich", que contiene el analito diana 4 en el centro. El ligando marcado libre 6 después se retira por lavado de la superficie 1 para dejar la superficie 1 cubierta con sitios marcados (FIG. 2b). Los analitos diana marcados 4 unidos a la superficie 1 después se cuantifican, y la señal, por lo tanto, es directamente proporcional a la cantidad del analito diana 4 en la muestra original. Generalmente se reconoce que el ensayo de tipo sándwich es más preciso y algo más exacto, pero puede aplicarse solamente para moléculas de analito diana que tienen al menos dos sitios diferentes a los que pueden unirse los ligandos.

En cualquiera de los ensayos anteriores, la separación del marcador unido del marcador libre se reconoce como uno de los aspectos desafiantes del procedimiento, y a menudo requiere una o más etapas mecánicamente complejas, tales como centrifugación, decantación, lavado, etc. Como resultado, la instrumentación para automatizar estos ensayos ha sido relativamente completa, que requiere múltiples operaciones.

En cambio, aspectos de la presente invención proporcionan un medio de "separación virtual", donde el marcador unido y libre no se separan físicamente, sino que en su lugar se separan por una combinación de configuración de celda de ensayo y manipulación matemática de las señales de diferentes regiones en la celda de ensayo. Como resultado, pueden realizarse métodos y aparatos de ensayo de ligando simplificados y automatizados.

De acuerdo con aspectos de la presente invención, se realizan inmunoensayos o ensayos de ligando donde el agente de unión es un ligando u otra sustancia que tiene una alta afinidad por el analito diana.

Los ensayos de acuerdo con la presente invención pueden realizarse, por ejemplo, usando los recipientes de muestra y los sistemas instrumentales de imágenes descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2007/0243117 y 2007/0087442 y la patente de Estados Unidos n.º 6.866.823. Los presentes ensayos no están limitados a estas cámaras y dispositivos de imágenes, sin embargo.

El término "inmunoensayo", como se usa en la descripción y reivindicaciones significará agentes de unión a basados en anticuerpo y también agentes de unión no basados en anticuerpo. Ejemplos de los últimos incluyen, aunque sin limitación, factores intrínsecos para la unión de la vitamina B12, y avidina para la unión de dianas marcadas con biotina o viceversa.

En aspectos de la presente invención, se proporciona una superficie bien definida y físicamente delimitada a la que se fija el ligando, y después la señal del marcador unido a esa superficie se distingue matemáticamente de la de cualquier marcador libre adyacente que pueda residir en la solución. Existen dos casos generales que se describen a continuación.

La FIG. 3 es una vista en planta de una sección de un ensamblaje de cámara de muestra 40, conteniendo dicho ensamblaje de cámara 40 una muestra de sangre completa anticoagulada. El ensamblaje de cámara 40 incluye paredes superiores e inferiores 7 (véase la FIG. 4), al menos una de las cuales es transparente. Preferiblemente, las dos paredes 7 son transparentes. El ensamblaje de cámara 40 incluye miembros espaciadores 42 (véase la FIG. 3) que se localizan aleatoriamente dentro del ensamblaje de cámara 40. Los miembros espaciadores 42 son preferiblemente esféricos y determinan y controlan la altura del ensamblaje de cámara 40. En el caso de ensayo de una muestra de sangre completa anticoagulada, los miembros espaciadores 42 que tienen un diámetro de aproximadamente 6 µm funcionan particularmente bien. La muestra de sangre que está contenida en el ensamblaje de cámara 40 incluirá glóbulos rojos individuales 44 y aglomeraciones de glóbulos rojos 46. La muestra de sangre también incluye áreas de lagunas de plasma claras 48 que no contienen ningún componente sanguíneo formado. Finalmente, la muestra de sangre también incluye una pluralidad de partículas de captura 8 del analito diana recubiertas con ligando que están preferiblemente en forma de esferas. Las partículas de captura 8 del analito diana se distribuyen aleatoriamente en toda la muestra de sangre, y pueden ser de aproximadamente 3 mm - 4 mm de diámetro para un análisis de muestra de sangre, de modo que puedan detectarse fácilmente en la muestra de sangre.

La FIG. 4 muestra la estructura del ensamblaje de cámara 40 de la FIG. 3. El ensamblaje de cámara 40 está limitado por la pared superior e inferior 7, al menos una de las cuales debe ser transparente. Dentro de la cámara está una partícula 8, cuya superficie está cubierta con un ligando 9. La partícula 8 puede ser de cualquier forma siempre que pueda determinarse su volumen, pero es preferiblemente una esfera. La partícula 8 puede ser de cualquier material al que pueda fijarse un ligando, tal como vidrio, poliestireno o similares. Las partículas no están limitadas a ningún diámetro particular (por ejemplo, 2  $\mu\text{m}$  - 100  $\mu\text{m}$ ), y el diámetro puede variar dependiendo del fluido que se esté ensayando y la altura de la cámara que se esté usando. La distancia entre las paredes 7 es típicamente de no menos del diámetro de la partícula 8, pero el límite superior de distancia dependerá de la naturaleza de la partícula 8.

Una mezcla 10 contiene tanto un analito diana 11 como un analito diana marcado 12 de un modo similar al descrito en relación con la FIG. 1 anterior. Después de un periodo adecuado de incubación, las señales del analito diana unido y libre se procesan.

La FIG. 5 es una vista desde arriba de un ensamblaje de cámara de ensayo como el mostrado en la FIG. 4, que muestra una extensión indefinida 13 de la mezcla 10. Dentro de esta extensión, la señal total del marcador 12 se recoge sobre un área definida 14, que es un área que no está limitada a ninguna forma particular. El medio de recogida puede ser un detector de fluorescencia, en el caso de un marcador fluorescente, o un detector de radionucleótidos, en el caso de un radiomarcador. El área se elige de modo que incluya al menos una partícula 8, con un diámetro conocido o medible. También se mide un área definida adyacente 16, que no contiene una partícula. La señal del área 16 representa la del marcador no unido, ya que no hay sitios de unión en esa localización. La señal del área 14, sin embargo, tiene una señal del marcador tanto unido como el libre. Las influencias de cada uno pueden determinarse de varios modos. Si la partícula es esférica, que es una forma preferida, su volumen ( $V_p$ ) puede calcularse a partir de su diámetro, que puede medirse con el mismo sistema óptico que recoge la señal del marcador. El volumen de las áreas definidas 14 ( $V_{14}$ ) y 16 ( $V_{16}$ ) puede calcularse fácilmente a partir de su anchura y la profundidad de la cámara. Asumiendo que los volúmenes de la cámara asociados con áreas definidas 14 y 16 son idénticos, la señal del marcador libre es igual al de la señal del área 16 ( $S_{16}$ ). Esto significa que en ausencia de señal desde la partícula (el marcador unido), la señal desde el área 14 ( $S_f$ ) debe ser:  $S_f = S_{16} \times (V_{14} - V_p)$ . Cualquier señal en exceso de esta cantidad es del marcador unido ( $S_b$ ):  $S_b = S_{14} - S_f$ . Si el volumen de la partícula es de un mínimo en comparación con el volumen dentro del área 14, entonces no es necesaria la corrección del volumen. Lo que se determina es la intensidad promedio de la señal de marcador por píxel (o grupo colectivo de píxeles) de las exploraciones. El término píxel, como se usa en esta solicitud puede incluir el significado de uno o más píxeles adyacentes.

En una segunda y más preferida realización, los ligandos se fijan a al menos una superficie de la propia cámara. La FIG. 6 muestra una superficie de cámara (superior) transparente 17, que puede ser de vidrio o de plástico, tal como acrílica o de poliestireno, a la que se ha fijado un recubrimiento uniforme de los ligandos por cualquiera de varios medios bien conocidos en la técnica. Después de formarse el recubrimiento uniforme, el ligando se retira de forma selectiva de una o más regiones 18, por medios mecánicos o químicos, o por ablación con láser, dejando, por consiguiente, ligandos activos en regiones adyacentes 19.

La FIG. 7 muestra esta superficie 17 como parte de una cámara delgada que contiene la mezcla 20, que comprende el analito diana no marcado 21 y el analito marcado 22. La cámara es preferiblemente de menos de aproximadamente 1 mm de altura, y es más preferiblemente de menos de 200  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, en un intervalo de 1 a 200  $\mu\text{m}$ ). Como anteriormente, después de un periodo adecuado de tiempo, el analito marcado y no marcado alcanzará el equilibrio con el ligando, dejando una parte del analito marcado 23 unido a la superficie, pero solamente en la región donde permanece el ligando. En el caso de un marcador fluorescente, la superficie de la cámara 17 se ilumina con la fuente de luz 24 de la longitud de onda apropiada para excitar la fluorescencia en el marcador. La lente 25 recoge las emisiones fluorescentes, que se filtran por el filtro óptico 26 y se proyectan sobre un dispositivo de disección de imágenes 27, que puede ser un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS) o similares. Como alternativa, la fuente de luz puede ser un láser que enfoca una mancha pequeña en movimiento sobre la cámara, y el dispositivo que recoge la luz 27 sería, en ese caso, un fototubo simple o fotomultiplicador.

El resultado neto de cualquier proceso se muestra en la FIG. 8, que es una vista esquemática desde arriba de la cámara 28, donde el ligando activo 29 y el ligando escindido 30 aparecen como una serie de franjas verticales. Las líneas de exploración del aparato de la FIG. 7 están representadas por las líneas a-a. La FIG. 9 es una representación de la forma de onda tomada a través de las líneas de exploración a-a, donde los picos 31 son la señal desde el ligando activo, y los valles 32 son de las áreas inactivas. Por tanto, la concentración de marcador unido está representada por la distancia desde los picos hasta los valles, y la altura de los valles representa el marcador libre. Las áreas activas y las áreas inactivas no están limitadas a ninguna geometría particular.

En algunas realizaciones, puede usarse una pared de cámara 17 que sea suficientemente flexible que pueda deformarse elásticamente de forma local sometiéndola a una carga puntual relativamente pequeña. La naturaleza elástica de la pared de la cámara 17 permite una opción única para capturar señales "unidas" muy débiles. Si la pared de la cámara 17 se comprime, tal como por un estilete pequeño justo fuera del área de la que se han tomado

imágenes, el marcador libre 22 se expulsa lateralmente desde el campo local de visión y, por tanto, su señal se reduce marcadamente. Con esta señal de "fondo" reducida, pueden detectarse señales muy débiles desde el marcador unido 23.

- 5 Podría medirse múltiples analitos simultáneamente si los marcadores emiten fluorescencia en diferentes longitudes de onda, o si el ligando para el analito 1 estuviera en una localización física diferente en la cámara de la del ligando para el analito 2.

10 Un ejemplo de un método de acuerdo con el método de la presente invención incluye realizar un ensayo para determinar si un paciente puede ser alérgico a uno o más fármacos (por ejemplo, antibióticos, incluyendo penicilina, etc.) o alérgenos. El ensayo se realiza usando un cartucho que tiene una cámara de análisis que contiene una gran cantidad (por ejemplo, miles) de perlas recubiertas con epítipo de antibiótico y perlas de control no recubiertas. Para aquellos análisis dirigidos hacia más de un epítipo de antibiótico, cada epítipo de antibiótico particular se acopla con un tipo particular de perla con fines de identificación. Los grupos de perlas asociadas con diferentes epítopos pueden distinguirse entre sí usando características tales como el color, tamaño, forma, etc. de la perla; por ejemplo, el epítipo A se recubre sobre perlas blancas, el epítipo B se recubre sobre perlas rojas, etc. Una pequeña cantidad de muestra (por ejemplo, 0,5 a 5 microlitros) de sangre completa anticoagulada capilar o venosa se deposita en la cámara (por ejemplo, se extrae en la cámara por acción capilar) y tras cerrar la cámara, la sangre se dirige a un área dentro de la cámara que contiene las perlas. Después de incubación durante un primer periodo de tiempo (por ejemplo, minutos a una hora) la inmunoglobulina presente dentro de la muestra se une a aquellas perlas recubiertas con un fármaco (o alérgeno) por el que la molécula de inmunoglobulina tiene una afinidad específica. Diferentes moléculas de inmunoglobulina presentes dentro de la muestra pueden tener diferentes afinidades específicas para diferentes fármacos (o alérgenos). Las perlas combinadas y la muestra de sangre se mezclan adicionalmente con uno o más anticuerpos marcados, dirigidos contra la inmunoglobulina que se está ensayando (por ejemplo, inmunoglobulina E ("IgE"), etc.) y se dejan incubar durante un segundo periodo de tiempo (por ejemplo, segundos a minutos). Un fluoróforo puede marcarse en los anticuerpos dirigidos contra la inmunoglobulina que se está ensayando para crear el "anticuerpo marcado". La muestra después se dirige a la cámara de análisis del tipo descrito anteriormente. Los tiempos reales necesarios para la incubación para las dos etapas pueden determinarse empíricamente y probablemente dependerá de la avidéz y la concentración de los anticuerpos presentes. La muestra distribuida dentro de la cámara se analiza recogiendo la señal de los anticuerpos marcados tanto libre como unidos de uno o más de los modos descritos anteriormente. Si el ensayo implica la determinación de susceptibilidad alérgica de más de un fármaco, o la sensibilidad a más de un alérgeno, el análisis incluirá distinguir los anticuerpos marcados unidos como una función de los diferentes tipos de perlas recubiertas también. El marcador unido representa aquellos anticuerpos marcados que están unidos a la inmunoglobulina que se está ensayando, que es la inmunoglobulina unida a la partícula recubierta con el fármaco (o alérgeno) con que la partícula de inmunoglobulina particular tiene una afinidad específica. La cantidad de marcador unido sobre una partícula puede calcularse midiendo la señal total de la partícula de la que se han tomado imágenes y sustrayendo la señal libre adyacente en el área inmediata que rodea la partícula que está incluida en la imagen. Las relaciones de la cantidad de marcador sobre una clase dada de perlas recubiertas pueden calcularse midiendo perlas recubiertas y no recubiertas marcadas del mismo tipo. Por tanto, la determinación de si una muestra contiene moléculas de inmunoglobulina que tienen una afinidad por un fármaco dado (o alérgeno) puede realizarse poniendo en práctica la presente invención. Además, puede realizarse la detección simultánea de una alergia a más de un fármaco (o sensibilidad a más de un alérgeno) en la presente invención usando diferentes tipos de perlas o partículas detectables, con cada tipo recubierto con un fármaco diferente (o alérgeno). Puede usarse un único tipo de partícula (o perla) como partícula de control para todos los ensayos de alergia a fármacos (sensibilidad a alérgenos) si la partícula es igual en tamaño y composición que las partículas recubiertas. Si fuera necesario, puede usarse más de un tipo de partícula de control coincidiendo el tamaño de la partícula de control con el tamaño de las partículas recubiertas con fármaco o alérgeno con las que se está comparando.

50 En algunas realizaciones, después de la segunda incubación (la que contiene el ligando marcado) el método incluye la etapa de añadir un líquido que no contiene marcador a la muestra que contiene marcador no unido distribuida dentro de la cámara, dejando de ese modo principalmente el marcador fijado a las perlas o estructuras inmovilizadas. La separación virtual del unido del libre se realiza posteriormente como se ha indicado previamente, pero la retirada del líquido que contiene el marcador puede servir para aumentar la sensibilidad del ensayo a expensas de la complejidad. Como la capacidad total de la cámara y la cantidad de líquido en la cámara está en el intervalo de menos de uno a varios microlitros, la adición de un fluido sin marcador a la cámara en un volumen sustancial (por ejemplo, decenas de microlitros) retirará la mayor parte del fluido que contiene marcador y la señal restante de marcador libre se retirará por la utilización del proceso de separación virtual del unido del libre.

60 La metodología descrita anteriormente proporciona una técnica novedosa y deseable para determinar la cantidad de analito diana marcado unido y libre dentro de áreas de una cámara que contiene ligandos o están libres de ligandos específicos para ese analito diana dentro de una muestra, y de ese modo proporciona información cualitativa y cuantitativa respecto a la muestra. En algunos casos, la información cualitativa, tal como saber si el analito diana está presente o ausente en la muestra, es suficiente información para el análisis disponible. Un ejemplo de dicho caso es la determinación de si una muestra tiene una IgE específica dirigida contra un fármaco dado, cuando la ausencia de dicha IgE es el estado normal. Si se desea más información cuantitativa (por ejemplo, la concentración

5 del analito diana en la muestra), la información de unido/libre obtenida puede usarse con una curva patrón, que es una curva que se obtiene empíricamente para el analito diana particular y la muestra que se está considerando, para determina la información cuantitativa; por ejemplo, la cantidad de analito diana dentro de la muestra. Las curvas patrón funcionales a usarse con todos los tipos de inmunoensayos son conocidas y la presente invención no está limitada a ninguna curva patrón particular. Las curvas de muestra pueden realizarse antes de o de forma concurrente con el ensayo y los resultados pueden almacenarse en el instrumento que realiza el análisis.

10 Aunque la invención se ha mostrado y descrito con respecto a realizaciones detalladas específicas de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden hacerse diversos cambios en la forma y detalle de la misma sin alejarse del alcance de la invención.



## REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar un inmunoensayo de analito diana de una muestra de fluido (20) que reside de forma quiescente en una cámara, que comprende las etapas de
- 5 distribuir la muestra de fluido dentro de la cámara;
- proporcionar un marcador detectable dentro de la muestra (20), que es un marcador funcional para unirse al analito diana para producir analito diana marcado (22), que es el analito diana marcado (22) detectable en la muestra (20);
- 10 proporcionar al menos una primera área superficial (17) dentro de la cámara que es la primera área superficial (17) que tiene ligandos específicos de analito diana (19) fijados a la misma, que son ligandos específicos de analito diana (19) funcionales para unir selectivamente el analito diana presente en la muestra a la primera área superficial (17);
- 15 proporcionar al menos una segunda área superficial (18) en la cámara que está libre de ligandos específicos de analito diana (19) funcionales para unir selectivamente el analito diana presente en la muestra a la segunda área superficial (18), en el que la cámara tiene al menos una pared, y la al menos una primera área superficial (17) y la al menos una segunda área superficial (18) están dispuestas sobre la al menos una pared;
- 20 explorar ópticamente la al menos una primera área superficial (17) para detectar y registrar una distribución de intensidad promedio de la señal del marcador por píxel del analito diana marcado (22) en la al menos una primera área superficial (17);
- 25 explorar ópticamente la al menos una segunda área superficial (18) para detectar y registrar una distribución de intensidad promedio de la señal del marcador por píxel del analito diana marcado (22) en la al menos una segunda área superficial (18); y
- 30 determinar al menos uno de una cantidad de analito diana marcado (22) en la al menos una primera área superficial (17), una cantidad de analito diana marcado (22) en la al menos una segunda área superficial (18), y una relación de analito diana marcado (22).
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cámara tiene una altura de 1 a 200  $\mu\text{m}$ .
3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de fluido (20) es sangre completa.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de determinar una cantidad total del analito diana en la muestra de fluido usando una cantidad total determinada de analito diana marcado (22) dentro de la primera área superficial (17) de la cámara y una cantidad total determinada de analito diana marcado (22) en la segunda área (18) de la cámara.
- 40 5. El método de la reivindicación 4, en el que la etapa de determinar la cantidad total del analito diana en la muestra de fluido usa una curva patrón.
- 45 6. El método de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente la etapa de determinar una cantidad total de analito diana unido (23) en la muestra de fluido usando la cantidad total determinada de analito diana marcado (22) en la muestra de fluido, y la cantidad total determinada de analito diana marcado (22) en la segunda área (18) de la cámara.
- 50 7. Un método para realizar un inmunoensayo de analito diana de una muestra de fluido (20) que reside de forma quiescente en una cámara, que comprende las etapas de:
- distribuir la muestra de fluido (20) dentro de la cámara;
- 55 proporcionar dentro de la muestra (20) un marcador detectable fijado a un primer ligando, que es el primer ligando específico para un epítipo del analito diana, que es el primer ligando funcional para unirse al analito diana (22) para producir ligando de analito diana marcado, que es el ligando de analito diana marcado (22) detectable en la muestra;
- 60 proporcionar una pluralidad de primeras áreas superficiales dentro de la cámara, que tienen las primeras áreas superficiales segundos ligandos específicos del analito diana fijados a las mismas, que son segundos ligandos específicos de analito diana funcionales para unir selectivamente el analito diana presente en la muestra a las primeras áreas superficiales, en el que las primeras áreas superficiales están distribuidas sobre primeras partículas, y las primeras partículas son un primer tipo de partícula recubierta con un primer fármaco;
- 65 proporcionar una pluralidad de segundas áreas superficiales en la cámara que están libres de segundos ligandos específicos de analito diana funcionales para unir selectivamente el analito diana presente en la muestra a la

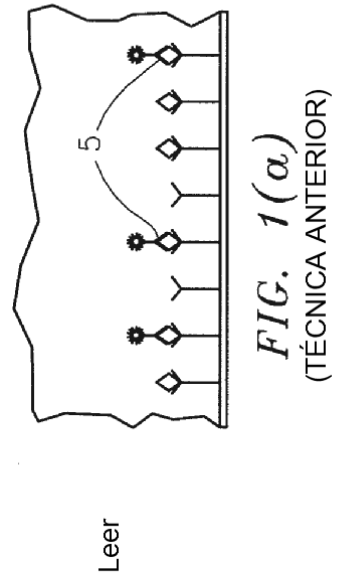
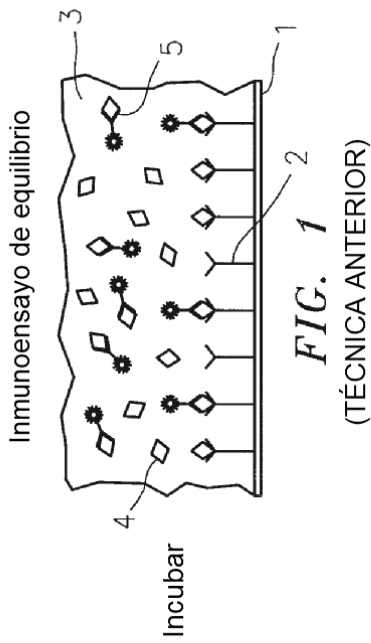
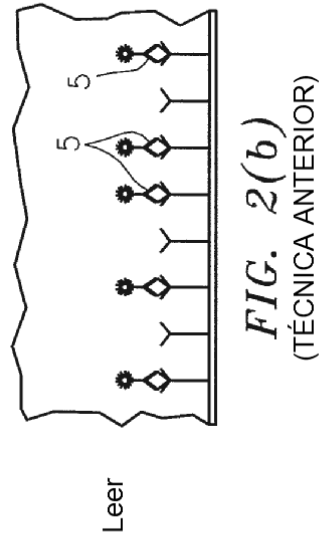
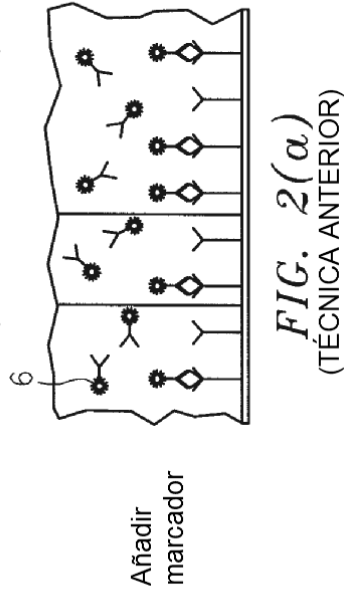
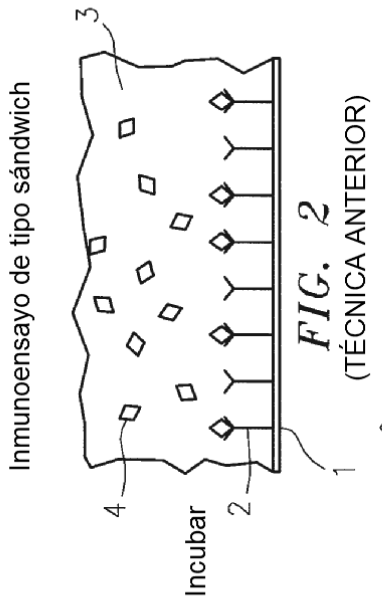
segunda área superficial, en el que las segundas áreas superficiales están distribuidas sobre segundas partículas, que son segundas partículas del primer tipo y libres de recubrimiento con fármaco;

5 explorar ópticamente las primeras áreas superficiales para detectar y registrar una distribución de intensidad promedio de la señal del marcador por píxel del ligando de analito diana marcado (22) en las primeras áreas superficiales;

10 explorar ópticamente las segundas áreas superficiales para detectar y registrar una distribución de la intensidad promedio de la señal del marcador por píxel del ligando de analito diana marcado (22) en las segundas áreas superficiales; y

15 determinar al menos uno de una cantidad del ligando de analito diana marcado (22) en las primeras áreas superficiales, una cantidad de ligando de analito diana marcado (22) en las segundas áreas superficiales, y una relación del ligando de analito diana marcado (22) en las primeras (17) y segundas (18) áreas superficiales.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el analito diana es una inmunoglobulina de un subtipo dado.





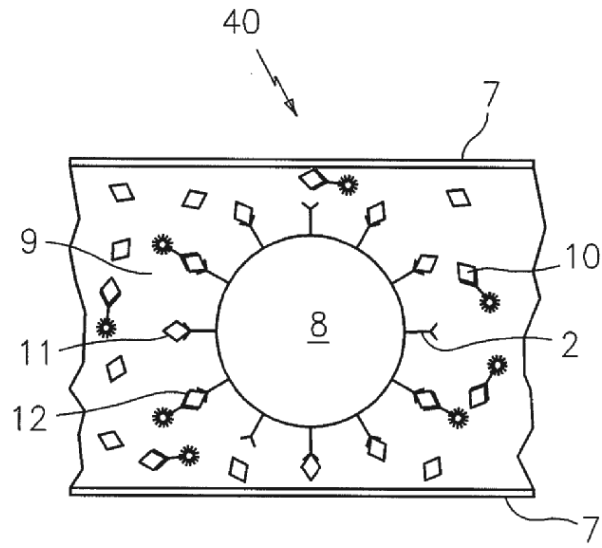


FIG. 4

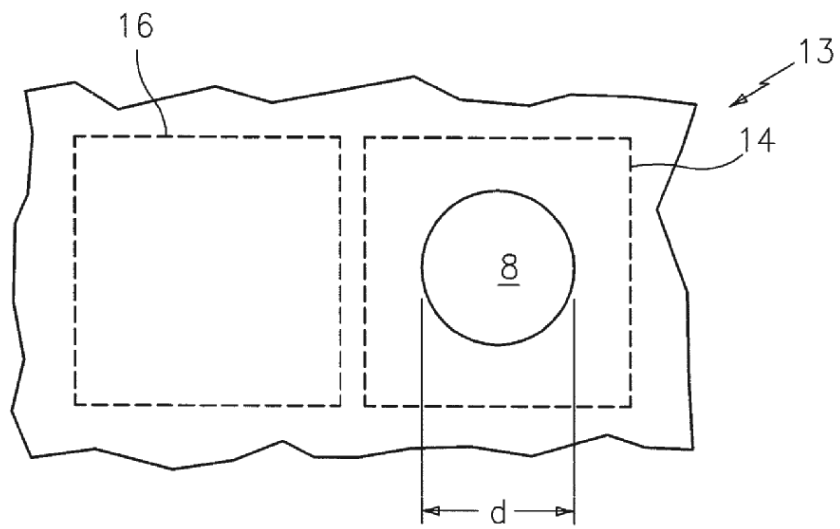


FIG. 5

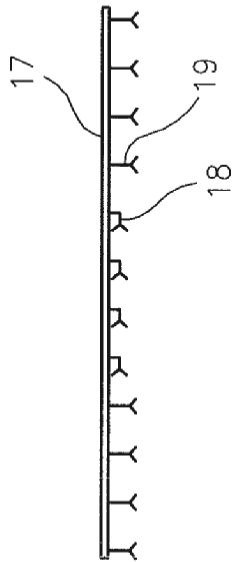


FIG. 6

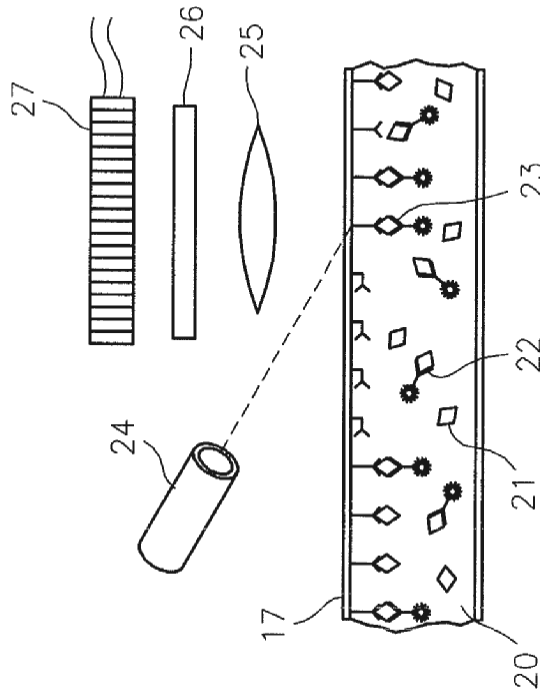


FIG. 7

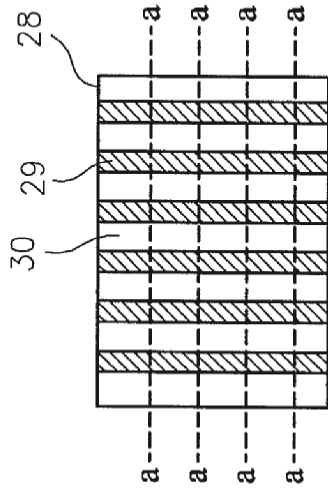


FIG. 8

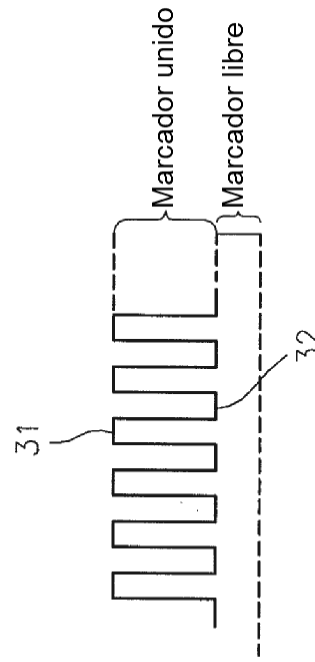


FIG. 9