

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 236**

51 Int. Cl.:

G01N 33/86 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 14001772 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2796881**

54 Título: **Tipificaciones de aloantígenos plaquetarios y pruebas de anticuerpos plaquetarios**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

73 Titular/es:

DAVOS DIAGNOSTICS AG (100.0%)
Clavadelerstrasse 1
7270 Davos, CH

72 Inventor/es:

SCHAWALLER, MANFRED;
RHYNER, CLAUDIO;
AKDIS, CEZMI;
WIKI, MAX y
CRAMERI, RETO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 236 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

Tipificaciones de aloantígenos plaquetarios y pruebas de anticuerpos plaquetarios

La presente invención se refiere a métodos para la detección de anticuerpos humanos contra aloantígenos plaquetarios humanos (HPA) en plaquetas humanas.

5 Las transfusiones de sangre son una terapia de rutina en todo el mundo. Por lo general, no se transfunde toda la sangre entera, sino sólo los componentes específicos de la sangre. La sangre consta de una parte líquida y una parte celular. La parte líquida se llama plasma y contiene numerosas proteínas. El plasma sanguíneo se utiliza como un agente terapéutico, ya sea como plasma entero fresco como congelado, o como componentes de plasma sanguíneo que se purifican por medios bioquímicos del plasma y que se dan como una terapéutica específica. Los ejemplos respectivos son inmunoglobulinas tales como las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) o los factores de coagulación de la sangre. La fracción celular de la sangre contiene tres tipos de células, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. La transfusión de los glóbulos rojos constituye la mayoría de los productos celulares terapéuticos de los bancos de sangre, seguido de los concentrados de plaquetas, que suman aproximadamente una décima parte de los concentrados de hematíes.

15 Los productos sanguíneos son de donantes individuales y están sujetos a pruebas de diagnóstico intensivas. El primer grupo de pruebas es determinar los antígenos de superficie en las células, ya que estos antígenos pueden variar de un donante a otro. Están los grupos sanguíneos conocidos con los principales antígenos ABO y otros más de 30 antígenos menores conocidos y descritos. Por otra parte, el suero y/o el plasma se analizan para la detección de anticuerpos contra estos antígenos. El segundo grupo de pruebas que se realizan de forma rutinaria son las pruebas de la ausencia o presencia de enfermedades infecciosas en la sangre del donante. Esto es para asegurar que la transfusión de sangre terapéutica no lleva a agentes patógenos. Estas pruebas se realizan habitualmente por una combinación de pruebas de anticuerpos, tales como la detección de plasma de sangre para los anticuerpos contra el VIH, VHB, VHC, las pruebas del panel de ToRCH, y las pruebas de antígenos de plasma de proteínas específicas de patógenos, por ejemplo, una prueba del antígeno p24 del VIH. Dependiendo de la práctica de cribado en los países específicos, las pruebas de antígeno y anticuerpo pueden ser complementadas por una prueba de ácido nucleico para ácidos nucleicos virales basados en métodos de amplificación, por ejemplo, la amplificación de ADN/ARN usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

20 Para las plaquetas terapéuticas, todas las pruebas de los grupos serológicos y sanguíneos ABO se realizan al igual que para los concentrados de los glóbulos rojos. Sin embargo, las plaquetas no sólo llevan a los antígenos del grupo sanguíneo, sino antígenos extra adicionales en su superficie. Estos antígenos varían entre personas y causan aloinmunizaciones cuando se transfunden en individuos humanos no compatibles. Las pruebas para estos aloantígenos y para los anticuerpos contra estos aloantígenos en pacientes no se realizan de forma rutinaria. Las razones para esto son la falta de pruebas de diagnóstico adecuadas para determinar aloantígenos y métodos prácticos adecuados y pruebas para la detección de anticuerpos.

35 Los aloantígenos plaquetarios resultan de polimorfismos bialélicos de glicoproteínas de membrana de plaquetas. Estos polimorfismos dan lugar a cambios de un solo aminoácido en las glicoproteínas que no tienen grandes consecuencias biológicas. Sin embargo, tras la transfusión de plaquetas incompatibles, una aloinmunización puede ocurrir y conducir a síntomas clínicos, que se describen a continuación. Otra fuente de aloinmunización se produce durante el embarazo cuando la mujer embarazada se inmuniza contra aloantígenos de las plaquetas incompatibles del feto. Los alo-anticuerpos contra las plaquetas son una fuente que da lugar a síntomas clínicos, pero también hay auto-anticuerpos dirigidos contra las plaquetas que conducen a trombocitopenia.

40 Los aloantígenos plaquetarios son proteínas bien estudiadas y la mayoría de los aloantígenos relevantes están descritos. Una nomenclatura común para describir los HPA existe de HPA-1 a HPA-15. La convención es para designar el alelo más común con la "a" y el alelo menos común con la "b". De todos los HPA conocidos, los antígenos HPA-1a y HPA-5b son los aloantígenos más inmunogénicos, que representan en conjunto más del 95% de los casos clínicos en los caucásicos. En las poblaciones de Asia, la aloinmunización HPA-4 es un problema relevante. Existen otros anticuerpos de glicoproteína anti-plaquetas, pero son mucho menos frecuentes. Para un banco de sangre, tiene sentido proporcionar concentrados de plaquetas negativas HPA-1a y HPA-5b, ya que ofrecen la oportunidad de un mejor tratamiento de los pacientes con uno de los tres síntomas causados por los anticuerpos anti-plaquetas, es decir, Trombocitopenia Alo-inmunológica Neonatal (NAIT), Obstinacia de las plaquetas (PR), o Púrpura trombocitopénica posttransfusional (PTP).

45 La tipificación de antígenos de plaquetas se hace hoy día sólo para los pacientes y los donantes de plaquetas seleccionados. Los laboratorios suelen utilizar ensayos de genotipado caseros y ensayos de fenotipado. Los aloantígenos plaquetarios más prominentes son HPA-1a y HPA-5b. Un pequeño número de pruebas de tipificación HPA-1a son realizadas por fenotipificación pero este enfoque no ha encontrado un amplio uso. Una razón de la ausencia de ensayos de fenotipado es la falta de reactivos de tipificación monoclonales adecuados para la determinación de los fenotipos de plaquetas y que el procedimiento es largo y tedioso para el fenotipado. A día de hoy, sólo un anticuerpo monoclonal para la tipificación de HPA-1a existe, sin embargo, no se ha adaptado ampliamente en la práctica habitual.

La detección en los bancos de sangre de las plaquetas tiene dos ventajas principales; en primer lugar, genera beneficios por la mejora de la seguridad para el paciente receptor y, en segundo lugar, evita donaciones inapropiadas e inútiles de costosas preparaciones de plaquetas para el paciente equivocado.

5 El diagnóstico de anticuerpos de plaquetas se realiza en muestras de sangre de pacientes con enfermedades causadas por anticuerpos plaquetarios, tales como NAIT, PR, y PTP. Como las pruebas de anticuerpos plaquetarios actuales son pruebas celulares complicadas, tales como el ensayo de Inmovilización de anticuerpo monoclonal de antígeno de plaquetas (MAIPA) o la prueba de fluorescencia Inmune de plaquetas (PIFT), muy pocos productos diagnósticos in vitro (IVD) comerciales están disponibles. Sólo los laboratorios especializados de plaquetas realizan estas pruebas utilizando pruebas diagnósticas caseras. Estos laboratorios especializados ofrecen un servicio a otros
10 bancos de sangre para la inmunología plaquetaria ya que un banco de sangre regular no realizar comúnmente estas pruebas.

En este contexto, el documento EP 2 006 304 A1 describe un anticuerpo monoclonal que reconoce de forma selectiva un aloantígeno plaquetario humano, un método para detectar al menos un aloantígeno plaquetario humano usando dicho anticuerpo, un método para producir dicho anticuerpo y un equipo y una composición farmacéutica que comprende el mismo. Además, el documento WO 01/14859 A1 describe un método para la determinación de sustancias que usan el método del campo evanescente. Además, el documento US 2009/317413 A1 describe moléculas de GPIIIa recombinantes que carecen del dominio β A de unión al ligando y se unen a anticuerpos HPA-1 en forma monomérica. Finalmente, el documento WO 2013/013220 A2 describe dispositivos fotónicos, sistemas y métodos para detectar un analito en una solución biológica.

20 En consecuencia, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar métodos para la detección de anticuerpos humanos contra antígenos plaquetarios. Dichos métodos deben ser fáciles de realizar, rentables, y deben entregar los resultados en un corto periodo de tiempo.

La solución al problema técnico anterior se consigue mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

25 En particular, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un primer método para la detección de anticuerpos humanos dirigidos contra aloantígenos plaquetarios humanos (HPA), en una muestra, que comprende las etapas:

(a) proporcionar al menos una superficie que tiene al menos plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas unidas a la misma, en el que los HPA de interés que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son conocidos;

(b) poner en contacto dicha superficie con dicha muestra, en el que los anticuerpos humanos dirigidos contra los HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, contenidos en dicha muestra, se inmovilizan sobre dicha superficie al unirse específicamente a las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a);

35 (c) poner en contacto dicha superficie con un agente de detección marcado con fluorescencia, en el que dicho agente de detección se une específicamente a anticuerpos humanos dirigidos contra los HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, y en el que dicho agente de detección, anticuerpos humanos respectivos contenidos en dicha muestra, y las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) forman un complejo unido a la superficie;

40 (d) excitar dicho complejo unido a la superficie con un campo evanescente de una fuente de luz;

(e) medir la fluorescencia emitida a partir de dicho complejo unido a la superficie; y (f) detectar los anticuerpos humanos contra los HPA que están presentes en dicho plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas en base a la fluorescencia emitida medida en la etapa (e).

45 en donde las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son plaquetas o fragmentos de plaquetas que comprenden glicoproteínas nativas.

En este aspecto, el término "detección" no se limita específicamente y no sólo incluye la medición cualitativa de anticuerpos humanos dirigidos contra HPA de interés, sino que incluye expresamente la determinación cuantitativa de los mismos. En este contexto, "cualitativa", como se usa en la presente memoria, significa una determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo de interés dentro de una muestra específica, mientras que el término "cuantitativa", como se usa en este documento, significa una medida del contenido o la cantidad de un anticuerpo a detectar dentro de una muestra específica.

Los anticuerpos a detectar con el primer método anterior de la presente invención no están particularmente limitados y se conocen en la técnica. Preferiblemente, al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a, HPA-1b, HPA-2a, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, HPA-5b, HPA-6a, HPA-6b, HPA-7a, HPA-7b, HPA-8a, HPA-8b, HPA-9a, HPA-9b, HPA-10a, HPA-10b, HPA-11a, HPA-11b, HPA-12a, HPA-12b, HPA-13a,

HPA-13b, HPA-14a, HPA-14b, HPA-15a, y HPA-15b. Más preferiblemente, al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a, HPA-1b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, y HPA-5b. Incluso más preferiblemente, al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a y HPA-5b, es decir, se detectan HPA-1a y/o HPA-5b.

- 5 Según el primer método anterior de la presente invención, los anticuerpos dirigidos contra un HPA o más HPA se detectan, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más anticuerpos dirigidos contra diferentes HPA. En estas realizaciones, se proporciona un número de acuerdo de las superficies en la etapa (a), por ejemplo, cuando se detectan anticuerpos contra dos HPA, se proporcionan dos superficies. Además, todas las superficies proporcionadas en la etapa (a) se ponen en contacto en las etapas (b) y (c). Además, todos los complejos unidos a la superficie son excitados en la etapa (d), medidos en la etapa (e), y todos los anticuerpos respectivos se detectan en la etapa (f).

10 En este contexto, el primer método anterior de la presente invención se puede realizar como un método multiplex, es decir, más de una, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más diferentes plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas se pueden recubrir en diferentes posiciones sobre una superficie, por lo que, por ejemplo, todos los HPA o alo-antígenos de plaquetas pueden ser cubiertos. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, un solo microchip puede ser utilizado en el primer método definido anteriormente, que utiliza una selección de plaquetas o fragmentos de los mismos para cubrir todos los HPA de interés, lo que permite la determinación fácil y rápida de anticuerpos anti-HPA en una muestra.

15 La muestra a analizar en el primer método anterior de la presente invención no está particularmente limitada, siempre y cuando sea una muestra que contenga, o se sospeche que contiene, anticuerpos contra HPA. Preferiblemente, dicha muestra se selecciona del grupo que consiste en plasma sanguíneo y suero sanguíneo.

20 Las expresiones "poner en contacto la superficie" o "poner en contacto dicha superficie", tal como se utilizan en este aspecto, tienen la intención de referirse a la puesta en contacto de las superficies que se saturan con, por ejemplo, plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, agentes de bloqueo, complejos de plaquetas-anticuerpos, u otro complejos que pueden aparecer en los métodos de la presente invención. Cualquier persona experta en la técnica entenderá que, por ejemplo, en la etapa (b) del primer método anterior, la muestra en realidad no está en contacto con la superficie, sino las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) u opcionalmente agentes de bloqueo que se unen a la misma, puesto que dicha superficie se satura con dichas plaquetas humanas o fracciones de membranas de plaquetas y, opcionalmente, con agentes de bloqueo, y, por lo tanto, no está realmente accesible. Sin embargo, las expresiones anteriores se eligen para reflejar el punto de vista macroscópico de un médico que trabaja la presente invención, que simplemente va a ver una superficie, y sabrá lo que realmente está unido a dicha superficie en cualquier punto dado.

25 Las superficies proporcionadas en el primer método anterior están hechas de materiales que no están particularmente limitados y que se conocen en la técnica. Preferiblemente, tales materiales son de vidrio o de un plástico, preferiblemente un plástico, tal como poliestireno, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, policicloolefina, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato y/o mezclas y combinaciones de estos plásticos. En principio, cualquier plástico que, básicamente, no absorba la luz en el rango visible es adecuado. En una realización, el plástico también se puede teñir de color azul claro, por ejemplo, con el fin de filtrar la emisión causada por la luz de dispersión. Preferiblemente, la superficie de arriba es el interior de un recipiente cóncavo, como una cubeta o un pocillo de una placa de microtitulación o de un cartucho de prueba, por ejemplo. Tales cubetas, placas de microtitulación y cartuchos de prueba pueden ser obtenidos económicamente por moldeo por inyección y preferiblemente tienen un volumen de reacción de 1 a 400 μ l, especialmente preferido de 5 a 100 μ l, y lo más preferido de 10 a 40 μ l. Preferiblemente, las cubetas, placas de microtitulación o cartuchos de prueba se hacen en una sola pieza. En este contexto, la expresión "cartucho de prueba" no se limita específicamente e incluye cualquier objeto que pueda ser utilizado para proporcionar una superficie sobre la que las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) del primer método anterior de la presente invención se unan y se pongan en contacto con las soluciones o reactivos respectivos. Por ejemplo, el cartucho de prueba puede ser un cartucho desechable de medición de una sola vía que contiene varios pocillos de medición totalmente separados que son pre-
30 acondicionados a las necesidades específicas de la medición.

35 Tal como se utiliza en este aspecto, el término "unido" preferentemente significa que las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) se adhieren a la superficie por absorción (absorción directa). Sin embargo, dichas plaquetas humanas o fracciones de membranas de plaquetas también se pueden unir a la superficie a través de un elemento de puente, por ejemplo una proteína, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra un antígeno de superficie de plaquetas común tal como gpVI o beta-2-microglobulina. Otra posibilidad sería la de biotinilar las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas y unirlas a una superficie revestida por avidina o estreptavidina. Dichas plaquetas humanas o fracciones de membranas de plaquetas también pueden estar unidas a la superficie por un enlace covalente. Esto puede producirse, por ejemplo, usando una superficie de acrilato mediante la conversión con una carbodiimida. Además, el término "unido" en el sentido de la presente invención incluye la adhesión a una superficie o a otro ligando, e incluye tanto interacciones covalentes como no covalentes, como, por ejemplo, las interacciones basadas en interacciones iónicas, polares o no polares.

En este aspecto, las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) se pueden colocar en la superficie por un método común. Por ejemplo, dichas plaquetas humanas o fracciones de membrana de las plaquetas se pueden aplicar sobre la superficie. Después de esta etapa, la superficie se trata preferiblemente con otra solución, y los sitios en la superficie no adheridos a dicha plaquetas humanas o fracciones de membranas de plaquetas se bloquean o se bloquearán, por ejemplo, por una proteína.

Según el primer método anterior de la presente invención, las plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas de la etapa (a) puede formar un complejo, en el que este complejo al menos incluye, además de dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) y el anticuerpo humano dirigido contra un HPA a detectar. Con las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) unidas a la superficie, dicho complejo es "anclado" a la superficie, es decir, fijado a la misma y puede al mismo tiempo ser detectado mediante el marcado con el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) que contiene el fluoróforo.

Las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) del primer método anterior de la presente invención no están particularmente limitadas, las plaquetas humanas o fracciones de membranas de plaquetas proporcionadas se usan, en donde los HPA de interés que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas se conocen. A modo de ejemplo, en los casos en que los anticuerpos dirigidos contra HPA-1a deban ser detectados, las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas que son HPA-1a positivo tienen que ser utilizadas en la etapa (a). Los métodos para obtener plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas que llevan HPA conocidos no están particularmente limitados y se conocen en la técnica. Una forma de generar fracciones de membrana de plaquetas es, por ejemplo, lisando las plaquetas, por ejemplo, químicamente y/o mecánicamente, y purificando las fracciones de membrana en función de su solubilidad en tampones acuosos. Una alternativa es purificar las membranas en función de su densidad, por ejemplo, por sedimentación en un campo gravitatorio por ultracentrifugación. Otro método para preparar membranas es por centrifugación por densidad de sacarosa. En este método, se añade sacarosa sólida a un lisado de células hipotónico a una concentración de preferiblemente el 70%. A continuación, se centrifuga la mezcla, preferiblemente en una ultracentrífuga y las membranas flotan en la solución de sacarosa. La concentración de sacarosa mínima que hace flotar a las membranas es del 35%, por lo que se pueden preparar gradientes por etapas mediante la superposición de lisado de sacarosa al 70%, con un colchón de sacarosa al 55% y un colchón del 35% en la parte superior del colchón del 55%. Una alternativa es generar pequeños liposomas membranosos por sonicación y/o prensa francesa opcionalmente seguido de una etapa de calibrado. En este contexto, la expresión "fracciones de membrana de plaquetas", como se usa en este documento, abarca en algunas realizaciones liposomas derivados de las plaquetas. Medios para generar u obtener liposomas derivados de las plaquetas no están particularmente limitados y se conocen en la técnica.

Además, el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) del primer método anterior de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que pueda unirse específicamente a anticuerpos humanos dirigidos contra HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas.

En una realización particular, dicho agente de detección es un anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra anticuerpos humanos. En esta realización, dicho anticuerpo no está particularmente limitado, y los anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica y pueden ser obtenidos, por ejemplo, comercialmente. Estos anticuerpos no están restringidos específicamente en relación con su isotopo o su origen. Entre los anticuerpos ejemplares en este contexto, podrían estar, por ejemplo, los anticuerpos IgG murinos. Además, en esta realización, el marcador fluorescente de dicho anticuerpo no está particularmente restringido, con tal de que pueda emitir luz fluorescente cuando se excita con un campo evanescente de una fuente de luz. Los marcadores fluorescentes adecuados son conocidos en la técnica. En una realización preferida, dicho marcador fluorescente es la alo-ficocianina (APC).

En otra realización particular, el agente de detección anterior es plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas marcadas con fluorescencia, en el que dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas llevan los mismos HPA que las plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas de la etapa (a). Preferiblemente, dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son idénticas a las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a), con la excepción de que el primero está marcado con fluorescencia. En esta realización, el marcador fluorescente de dichas plaquetas o fracciones de membrana de las plaquetas no está particularmente limitado, siempre que pueda emitir luz fluorescente cuando se excita con un campo evanescente de una fuente de luz. Los marcadores fluorescentes adecuados son conocidos en la técnica. En una realización preferida, dicho marcador fluorescente es un colorante fluorescente lipofílico que se asocia con las membranas de las plaquetas, por ejemplo, un derivado de carbocianina. Los colorantes lipófilos adecuados y los métodos de marcaje de las plaquetas no están particularmente limitados y se conocen en la técnica. Son ejemplos de colorantes de la serie de tintes ebioscience CellVue o los colorantes disponibles de Molecular Probes. Alternativamente, las plaquetas podrían ser marcadas por medio de un anticuerpo marcado con fluorescencia dirigido contra un antígeno de superficie de las plaquetas, o mediante biotilación de las plaquetas o fracciones de membrana de las plaquetas y la interacción con avidina o estreptavidina marcada con fluorescencia.

En este contexto, es importante tener en cuenta que el primer método anterior de la presente invención utiliza principalmente plaquetas o fragmentos de plaquetas o liposomas derivados de plaquetas todos los cuales tienen en

común la presencia de glicoproteínas nativas que no se desnaturalizan por un proceso físico o por la actividad de detergentes para solubilizar. Esto es particularmente importante para las glicoproteínas plaquetarias que por naturaleza a menudo existen en una forma conformacionalmente restringida, y después de la activación, tal como mediante un tratamiento físico, un acontecimiento de unión o también por tratamiento con detergente, cambian su conformación y son consecuentemente de diferente forma a las glicoproteínas nativas que quedan en las plaquetas no activadas en términos de su función y sus características como antígeno.

Tal como se utiliza en el contexto del agente de detección de la etapa (c) del primer método anterior de la presente invención, el término "anticuerpo" no sólo se refiere al anticuerpo respectivo como tal, sino también incluye cualquier fragmento y derivado de dicho anticuerpo, siempre que dichos fragmentos conserven la capacidad de unirse específicamente al mismo epítipo. Los fragmentos respectivos pueden ser fragmentos Fab, fragmentos F(ab') o fragmentos F(ab')₂. Además, en lugar de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, cualesquiera otras macromoléculas que tengan la capacidad de unirse específicamente a un epítipo se pueden utilizar. Tales macromoléculas incluyen, por ejemplo, aptámeros de nucleótidos, aptámeros de péptidos, nanocuerpos, anticuerpos, anticalins, DARPins, Phylomers, AdNectins y proteína A.

Los anticuerpos humanos dirigidos contra HPA que se detectan en el primer método anterior de la presente invención no están particularmente limitados y se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en anticuerpos IgG, anticuerpos IgA, anticuerpos IgE, y anticuerpos IgM. En este contexto, los anticuerpos a detectar con dicho método son principalmente alo-anticuerpos. De esta manera, una terapia puede ser dirigida por la elección de las plaquetas correctas de la etapa (a). Sin embargo, dichos anticuerpos pueden también ser auto-anticuerpos, en el que el perfil alo-antigénico presentado en la etapa (a) no es relevante. Los respectivos auto-anticuerpos son la causa de PTP donde un anticuerpo anti-HPA-1a preformado, típicamente derivado de un embarazo, se somete a evolución y se convierte en un auto-anticuerpo.

En el primer método anterior de la presente invención, las etapas (b) y (c) pueden llevarse a cabo posteriormente o al mismo tiempo. En particular, en una realización preferida, el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) se puede combinar con la muestra, opcionalmente diluida, antes de que la superficie se ponga en contacto, de manera que las etapas (b) y (c) se ejecutan simultáneamente, cuando la solución respectiva se pone en contacto con la superficie. En consecuencia, la superficie solo tiene que ponerse en contacto con la muestra, opcionalmente diluida, de manera que las etapas (b) y (c) se ejecutan simultáneamente.

Según una realización preferida, el primer método anterior de la presente invención no requiere más de dos, más preferiblemente más de una, etapas de manipulación de líquidos. En este contexto, la expresión "etapa de manipulación de líquidos", como se usa en este documento, generalmente incluye cualquier etapa que transfiera, elimine o añada un líquido desde y/o hacia un sitio de acción. Por ejemplo, las etapas de manipulación de líquidos de acuerdo con la presente invención incluyen la adición, por ejemplo, pipeteando, un líquido en el pocillo de una cubeta, una placa de microtitulación o un cartucho de ensayo, o la eliminación de un líquido de un tal pocillo. Además, de acuerdo con otra realización preferida, el primer método anterior de la presente invención no incluye ninguna etapa de lavado.

En particular, el primer método de la presente invención preferiblemente no requiere ninguna etapa de retirar el volumen que contiene los reactivos en exceso, tales como el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c), y/o el lavado de la superficie en la que las plaquetas o las fracciones de membrana de las plaquetas de la etapa (a) y/o el complejo a medir están unidos. Esto acelera ventajosamente el primer método anterior de la presente invención para obtener rápidamente los resultados de las mediciones deseadas, evita la acumulación de residuos líquidos y los errores operacionales al llevar a cabo el método.

En este contexto, en una realización adicional de la presente invención, el primer método como se define anteriormente es un método de una sola etapa. Según la presente invención, método de "una sola etapa" significa que sólo se lleva a cabo una reacción de formación de complejo, lo que generalmente requiere sólo una o, como mucho, dos etapas de manipulación de líquidos, que se llevan a cabo por el operador con el fin de obtener el resultado de la medición deseada. Por lo tanto, etapas adicionales de reacción, tales como la adición de más reactivos después de la formación del complejo inicial se evitan ventajosamente.

Por otra parte, una realización adicional de la presente invención se refiere a un método como se define anteriormente, en donde dicho método no incluye la agitación del líquido. En este contexto, la expresión "agitación del líquido" no está limitada específicamente e incluye cualquier tipo de agitación que se produzca en el líquido, a excepción de la difusión natural. Por ejemplo, la agitación del líquido en el sentido de la presente invención incluye agitación, bombeo, centrifugación, agitación ultrasónica, etc. Al evitar cualquier agitación del líquido, a excepción de la difusión natural que ocurre, el método puede llevarse a cabo de una manera simple y eficaz, y por lo tanto evitar configuraciones técnicas complicadas incluyendo los dispositivos de agitación respectivos.

De acuerdo con una realización adicional del primer método anteriormente definido, el resultado determinado en la etapa (f) se obtiene en 30 minutos, preferiblemente 20 minutos, más preferiblemente 10 minutos o menos a partir del inicio de la etapa (b). Según la presente invención, se obtiene el resultado cualitativo o cuantitativo en 30 minutos, preferiblemente 20 minutos, más preferiblemente 10 minutos o menos después de que la solución que contiene la

muestra y el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) se hayan puesto en contacto con la superficie a la que se unen las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a). Preferiblemente, el resultado se obtiene en 9 minutos o menos, 8 minutos o menos o 7 minutos o menos. Otros ejemplos incluyen períodos de 6 minutos o menos, 5 minutos o menos o 4 minutos o menos.

5 De acuerdo con una realización adicional del primer método anterior de la presente invención, dicha superficie se pone en contacto antes de la etapa (d) con al menos un colorante que absorbe en el intervalo de absorción y/o emisión del marcador fluorescente del agente de detección de la etapa (c). Según la presente invención, la excitación del fluoróforo en el volumen, es decir, del fluoróforo que no forma parte del complejo unido a la superficie, se puede suprimir si la solución que se coloca en contacto con la superficie tiene al menos un colorante añadido a la misma que tiene una absorción en el intervalo de absorción y/o emisiones de dicho fluoróforo. La absorción del colorante añadido al volumen se coordina con el intervalo de absorción y/o emisión de dicho fluoróforo. Un colorante individual o una mezcla de colorantes se puede utilizar. El intervalo de absorción del fluoróforo se correlaciona generalmente con la longitud de onda de la fuente de luz utilizada. No es necesario que el colorante tenga un máximo de absorción en este intervalo especial; un hombro en el espectro de absorción puede ser suficiente. Por ejemplo, si se utilizan fluoróforos como APC o Cy5, el colorante utilizado puede tener la absorción entre 600 nm y 700 nm, como por ejemplo Brilliant Blue FCF. Otro ejemplo de un colorante que se puede utilizar a este respecto es Brilliant Black BN. La concentración de colorante añadido depende tanto del coeficiente de absorción de cada colorante en solución como de la frecuencia de la luz irradiada. La concentración de colorante puede ajustarse, dependiendo del colorante, de modo que la luz que penetra, básicamente, puede ser absorbida en un grado de más del 90% de absorbancia en 0,1 mm por encima de la superficie.

De acuerdo con las etapas (d) a (f) del primer método anterior de la presente invención, el complejo unido a la superficie generado en la etapa (a) a (c) de dicho método es excitado con un campo evanescente de una fuente de luz, la fluorescencia emitida a partir de dicho complejo se mide, y los anticuerpos humanos contra el HPA de interés se detectan basado en la fluorescencia emitida medida, en el que una señal de fluorescencia positiva indica la presencia de dicho complejo y, por tanto, la presencia de anticuerpos humanos dirigidos contra el HPA de interés.

En este contexto, la expresión "fuente de luz", como se usa en el presente documento, no se limita específicamente e incluye cualquier fuente de luz que sea adecuada para crear un campo evanescente y excitar el fluoróforo unido al agente de detección de la etapa (c). Por ejemplo, la luz monocromática se puede usar como la fuente de luz. La luz debe ser utilizada con una longitud de onda que preferiblemente no interfiera con la emisión del fluoróforo y, preferiblemente, que se cruce con la banda de absorción del colorante. Un láser es especialmente preferido como fuente de luz, cuya luz emite una longitud de onda de 635 nm.

El primer método anterior de la presente invención se basa en una nueva tecnología para el análisis de biomoléculas mediante la excitación de campo evanescente de fluoróforos unidos y la medición directa de los sucesos de unión a tiempo real como se describe en las patentes europeas EP 1 079 226 B1, EP 1 204 856 B1 y EP 1 371 967 B1. El principio funcional de este biosensor de campo evanescente es la interacción de un analito unido a la superficie con un ligando en solución mediante una interacción no covalente. El ligando en solución se une covalentemente a una molécula fluorescente. La excitación preferida de la molécula fluorescente es coherente con la luz tal como se genera, por ejemplo, por un diodo láser y luego se detectan los fotones emitidos. Los fluoróforos adecuados para ello son, por ejemplo, los colorantes Cy5, Alexa o la proteína captadora de luz alo-ficocianina (APC).

40 La reacción bioquímica se lleva a cabo en un pequeño pocillo, similar a un pocillo de ELISA en forma y dimensiones con una entidad óptica adicional en la parte inferior. Como en el ELISA, el pocillo del biosensor y su parte inferior óptica se producen mediante moldeo por inyección del material termoplástico, como, por ejemplo, poliestireno. Las principales diferencias entre el método de ELISA y los métodos evanescencia de biosensores son los marcadores del ligando en solución. Para ELISA, el marcador es una enzima y para la tecnología de evanescencia el ligando está marcado con una molécula fluorescente. La medición del fluoróforo unido, es decir, el ligando fluorescente en solución que se une al analito inmovilizado en la superficie evanescente, se logra mediante la excitación específica del ligando marcado de manera fluorescente unido utilizando el principio de excitación del campo evanescente. La excitación selectiva del fluoróforo unido se produce por un campo evanescente de la luz utilizando una construcción óptica resultante en una excitación específica de una capa gruesa de aproximadamente 200 nm de líquido situada en el fondo del pocillo y que no excita al ligando marcado de manera fluorescente en exceso presente en el solución por encima de la superficie de unión. Sólo los ligandos marcados con fluorescencia que están en el campo evanescente se excitan y emiten fotones. Este método permite la observación de una reacción de unión del ligando soluble con el ligando inmovilizado en tiempo real.

Aunque la mayoría de los ensayos inmunológicos utilizados en pruebas diagnósticas in vitro tienen un procedimiento largo y tedioso que implica tiempos de incubación, lavados, adición de reactivos o soluciones secundarias o terciarias para obtener un resultado de un biomarcador, el biosensor de evanescencia permite realizar ensayos diagnósticos in vitro en poco tiempo. La instrumentación compleja y costosa de la automatización del ELISA o de los ensayos inmunológicos basados en perlas no es requerida ni necesaria cuando se utiliza el biosensor de evanescencia para aplicaciones de diagnóstico.

El primer método de la presente invención se puede poner en práctica en conexión con un primer dispositivo de prueba diagnóstico para llevar a cabo dicho método, comprendiendo al menos una superficie que tiene al menos las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) unidas a la misma, en el que los HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son conocidos.

- 5 En este contexto, la superficie, las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a), y el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) son como se define anteriormente. Además, las definiciones dadas anteriormente se aplican también a este dispositivo.

10 Sorprendentemente e inesperadamente, cuando se consideran las dimensiones geométricas de un campo evanescente y las dimensiones de las plaquetas típicas, siendo el campo evanescente 200 nm de altura y las plaquetas utilizadas para el recubrimiento de la superficie de detección con un diámetro de 1 a 4 micrómetros, todavía se puede observar una señal. Sólo una minoría de las plaquetas recubiertas y la membrana de las plaquetas se encuentran dentro del campo evanescente y, por lo tanto, pueden absorber y por consiguiente emitir señales fluorescentes, mientras que la mayoría de las plaquetas de 2-3 micrómetros y los antígenos de la superficie de las plaquetas están fuera del campo evanescente. Esto indica una bastante alta estabilidad del sistema hacia las dimensiones del analito biológico. Además, de nuevo hay que señalar que las plaquetas recubiertas y los fragmentos de plaquetas son ricos en enzimas y actividades enzimáticas tales como peroxidasas y fosfatasa, que son enzimas utilizadas comúnmente como marcadores para las pruebas de ELISA. Sin embargo, la detección de fluorescencia utilizando excitación evanescente evita cualquier problema que pudiera resultar de esas enzimas contaminantes por completo.

20 Preferiblemente, el primer dispositivo de prueba de diagnóstico anterior tiene la forma de una cubeta, placa de microtitulación o cartucho de prueba, estando hecho preferentemente de vidrio o de un plástico, preferiblemente un plástico, tal como poliestireno, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, policicloolefina, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato y/o mezclas y combinaciones de estos plásticos. En principio, cualquier plástico que, básicamente no absorba la luz en el intervalo visible es adecuado. El plástico también se puede teñir de color azul claro, por ejemplo, con el fin de filtrar una emisión causada por la luz de dispersión. Las cubetas de plástico, placas de microtitulación y los cartuchos de prueba pueden ser obtenidos económicamente por moldeo por inyección y preferiblemente tienen un volumen de reacción de 1 a 400 μ l, especialmente preferido de 5 a 100 μ l, y lo más preferido de 10 a 40 μ l. Preferiblemente, las cubetas, placas de microtitulación o cartuchos de prueba de la presente invención se hacen en una sola pieza.

30 En este contexto, la expresión "cartucho de prueba" no se limita específicamente e incluye cualquier objeto que pueda ser utilizado para proporcionar una superficie sobre la que se unan las plaquetas humanas o fracciones de membrana de las plaquetas de la etapa (a) y que pueda ponerse en contacto con las respectivas soluciones o reactivos. Por ejemplo, el cartucho de prueba puede ser un cartucho desechable de medición de una sola vía, que contenga varios pocillos de medición totalmente separados, que son pre-acondicionados a las necesidades específicas de medición.

35 En este contexto, ya que el cartucho de prueba típico tiene múltiples pocillos, varios ensayos se pueden ejecutar en paralelo.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un segundo método para la detección concurrente de (i) al menos un aloantígeno plaquetario humano (HPA) en plaquetas humanas contenidas en una muestra, y (ii) anticuerpos humanos dirigidos contra aloantígenos plaquetarios humanos (HPA), en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) realizar un método para la detección de al menos un aloantígeno plaquetario humano (HPA) en plaquetas humanas contenidas en una muestra como se define a continuación; y

(b) realizar el primer método anterior de la presente invención.

45 En este aspecto, se aplican todas las realizaciones y definiciones preferidas dadas anteriormente o a continuación para dichos métodos.

50 En particular, el método para la detección de al menos un HPA en plaquetas humanas contenidas en una muestra que es parte del segundo método de la presente invención es un método para la detección de al menos un HPA en plaquetas humanas contenidas en una muestra que es sangre entera anticoagulada en una concentración de más del 25% que comprende las etapas:

(a) proporcionar al menos una superficie que tiene al menos un anticuerpo unido a la misma, en el que dicho anticuerpo se dirige contra la glicoproteína que lleva el al menos un HPA a ser detectado;

(b) lisar las plaquetas contenidas en la muestra y solubilizar las proteínas de la membrana de dichas plaquetas;

(c) poner en contacto dicha superficie con la muestra lisada y solubilizada de la etapa (b), en el que las respectivas glicoproteínas contenidas en dicha muestra se inmovilizan sobre dicha superficie uniéndose específicamente al anticuerpo de la etapa (a);

5 (d) poner en contacto dicha superficie con un anticuerpo marcado con fluorescencia, en el que dicho anticuerpo se dirige contra el al menos un HPA a detectar, y en el que dicho anticuerpo, las glicoproteínas respectivas contenidas en dicha muestra, y el anticuerpo de la etapa (a) forman un complejo unido a la superficie;

(e) excitar dicho complejo unido a la superficie con un campo evanescente de una fuente de luz;

(f) medir la fluorescencia emitida a partir de dicho complejo unido a la superficie; y

(g) detectar el al menos un HPA basado en la fluorescencia emitida medida en la etapa (f).

10 En este aspecto, el término "detección" no se limita específicamente y no sólo incluye la medición cualitativa de los HPA de interés, sino que incluye expresamente la determinación cuantitativa de los mismos. En este contexto, "cualitativa", como se usa en la presente memoria, significa una determinación de la presencia o ausencia de un HPA de interés dentro de una muestra específica, mientras que el término "cuantitativa", como se usa en este documento, significa una medida del contenido o cantidad de un HPA a detectar dentro de una muestra específica.

15 Los HPA a detectar con el método anterior no están particularmente limitados y se conocen en la técnica. Preferiblemente, al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a, HPA-1b, HPA-2a, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, HPA-5b, HPA-6a, HPA-6b, HPA-7a, HPA-7b, HPA-8a, HPA-8b, HPA-9a, HPA-9b, HPA-10a, HPA-10b, HPA-11a, HPA-11b, HPA-12a, HPA-12b, HPA-13a, HPA-13b, HPA-14a, HPA-14b, HPA-15a, y HPA-15b. Más preferiblemente, el al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a, HPA-1b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, y HPA-5b. Incluso más preferiblemente, el al menos un HPA se selecciona del grupo que consiste en HPA-1a y HPA-5b, es decir, se detectan HPA-1a y/o HPA-5b.

20 De acuerdo con el método anterior, se detecta al menos un HPA. Por lo tanto, también se puede detectar más de un HPA, *p.ej.* 2, 3, 4, 5 o más HPA. En estas realizaciones, se proporciona un número correspondiente de superficies en la etapa (a), *p.ej.* cuando se deben detectar dos HPA, se proporcionan dos superficies. Además, todas las superficies proporcionadas en la etapa (a) se ponen en contacto en las etapas (c) y (d), y los respectivos anticuerpos marcados fluorescentemente dirigidos contra los HPA a detectar se usan en la etapa (d). Además, todos los complejos unidos a la superficie se excitan en la etapa (e), se miden en la etapa (f), y todos los HPA respectivos se detectan en la etapa (g).

La muestra a analizar en el método anterior es sangre completa anticoagulada.

30 De acuerdo con el método definido anteriormente, la sangre completa anticoagulada se usa en la prueba final a concentraciones de más del 25%, por ejemplo más del 33%, más del 50% o incluso más del 80%.

35 Sin embargo, sorprendentemente, es posible utilizar una muestra de sangre total anticoagulada en el método anterior de la presente invención con la obtención de resultados fiables y excelentes. La muestra de sangre entera se usa por encima de una concentración del 25% en las pruebas finales, en donde es evidente que esto puede dar lugar a señales no específicas debido a interacciones bioquímicas no deseadas. Sin embargo, inesperadamente, se ha observado muy bajo fondo bioquímico, lo que todavía permite detectar específicamente y selectivamente la glicoproteína plaquetaria. Aún más importante a destacar es que el método anterior permite detectar y distinguir con glicoproteínas de alta sensibilidad que difieren entre sí por un solo polimorfismo de un solo aminoácido. Además, la capacidad de las pruebas para dar una señal específica, incluso en presencia de un gran exceso de fluoróforos potenciales en una solución de sangre completa lisada, a saber, la hemoglobina, las proteínas citoplasmáticas de eritrocitos y otras células de la sangre, así como la gran cantidad de proteínas plasmáticas humanas, es sorprendente. No se observa una señal de autofluorescencia resultante de cualquier componente de la muestra de sangre entera. Notable es también que los procesos de degradación biológica que ocurren en la sangre entera cuando se almacena a 4°C no tienen una influencia significativa en la señal de ensayo. Una muestra de sangre que se almacena a 4°C durante más de un año se puede utilizar en el ensayo y dar un resultado correcto. Esto indica de nuevo la ausencia de fenómenos de autofluorescencia y la estabilidad de las glicoproteínas plaquetarias durante el almacenamiento y el envejecimiento.

40 Las expresiones "poner en contacto la superficie" o "poner en contacto dicha superficie" tal como se utiliza en este aspecto se pretende que se refieran a la puesta en contacto de las superficies que se saturan con, por ejemplo, anticuerpos, agentes de bloqueo, complejos antígeno-anticuerpo, u otros complejos que puedan aparecer en los métodos de la presente invención. Cualquier persona experta en la técnica entenderá que, por ejemplo, en la etapa (c) del método anterior, la muestra en realidad no está en contacto con la superficie, sino los anticuerpos de la etapa (a) u, opcionalmente, agentes de bloqueo que se unen a la misma, ya que dicha superficie se satura con dichos anticuerpos y opcionalmente con agentes de bloqueo, y, por lo tanto, no está realmente accesible. Sin embargo, los términos anteriores se eligen para reflejar el punto de vista macroscópico de un médico que trabaja la presente invención, que simplemente va a ver una superficie, y sabrá lo que realmente está unido a dicha superficie en cualquier punto dado.

Las superficies proporcionadas en el método anterior están hechas de materiales que no están particularmente limitados y que se conocen en la técnica. Preferiblemente, tales materiales son de vidrio o de un plástico, preferiblemente un plástico, tal como poliestireno, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, policicloolefina, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato y/o mezclas y combinaciones de estos plásticos. En principio, cualquier plástico que, básicamente, no absorba la luz en el rango visible es adecuado. En una realización, el plástico también se puede teñir de color azul claro, por ejemplo, con el fin de filtrar una emisión causada por la luz de dispersión. Preferiblemente, la superficie de arriba es el interior de un recipiente cóncavo, como una cubeta o un pocillo de una placa de microtitulación o de un cartucho de prueba, por ejemplo. Tales cubetas, placas de microtitulación y los cartuchos de prueba pueden ser obtenidos económicamente por moldeo por inyección y preferiblemente tienen un volumen de reacción para el líquido de 1 a 400 μl , especialmente preferido de 5 a 100 μl , y lo más preferido de 10 a 40 μl . Preferiblemente, las cubetas, placas de microtitulación o cartuchos de prueba se hacen en una sola pieza. En este contexto, la expresión "cartucho de prueba" no se limita específicamente e incluye cualquier objeto que pueda ser utilizado para proporcionar una superficie en la que el anticuerpo de la etapa (a) del método anterior se una y que pueda ser puesto en contacto con las soluciones o reactivos respectivos. Por ejemplo, el cartucho de prueba puede ser un cartucho desechable de medición de una sola vía, que contenga varios pocillos de medición totalmente separados, que son pre-condicionados a las necesidades específicas de la medición.

Tal como se utiliza en este aspecto, el término "unido" significa preferiblemente que el anticuerpo de la etapa (a) se adhiere a la superficie mediante absorción (absorción directa). Sin embargo, dicho anticuerpo también se puede unir a la superficie a través de un elemento de puente, por ejemplo una proteína, tal como un anticuerpo adicional o un antígeno. Dicho anticuerpo también puede unirse a la superficie por un enlace covalente. Esto puede ser, por ejemplo, producido usando una superficie de acrilato mediante la conversión con una carbodiimida. Además, el término "unido" en el sentido de la presente invención incluye la adhesión a una superficie o a otro ligando, e incluye tanto interacciones covalentes como no covalentes, como, por ejemplo, las interacciones basadas en interacciones iónicas, polares o no polares.

En este aspecto, el anticuerpo de la etapa (a) se puede colocar en la superficie por un método común. Por ejemplo, dicho anticuerpo se puede recubrir en la superficie. Después de esta etapa, la superficie se trata preferiblemente con otra solución, y los sitios en la superficie no adheridos a dicho anticuerpo se bloquean o se bloquearán, por ejemplo, otra proteína o un compuesto químico tal como un detergente.

De acuerdo con el método anterior, el anticuerpo de la etapa (a) puede formar un complejo, en el que este complejo al menos incluye, además de dicho anticuerpo, el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) y la glicoproteína que lleva el HPA a detectar. Con el anticuerpo de la etapa (a) unido a la superficie, el complejo con la glicoproteína que lleva el HPA a detectar es "anclado" a la superficie, es decir, fijado a la misma y puede al mismo tiempo ser detectado mediante el marcado con el anticuerpo de la etapa (d) que contiene el fluoróforo.

El anticuerpo de la etapa (a) del método anterior de la presente invención no está particularmente limitado, con tal que se dirija contra la glicoproteína que lleva al menos un HPA a detectar, es decir, a condición de que se una específicamente a dicha glicoproteína. Los anticuerpos adecuados se conocen en la técnica y pueden ser obtenidos por ejemplo, comercialmente. Estos anticuerpos no están restringidos específicamente en relación con su isotipo o su origen. Entre los anticuerpos ejemplares en este contexto podrían estar, por ejemplo, los anticuerpos IgG murinos. Las glicoproteínas de interés a este respecto son conocidas en la técnica e incluyen, en particular, gp11bIIIa, gp11a, gp1bIX y HLA/beta-2-microglobulina. Los anticuerpos particulares que se pueden utilizar a este respecto son el anticuerpo monoclonal anti-gp11bIIIa RFGP56 y el anticuerpo monoclonal anti-gp11a AK7. Otros anticuerpos adecuados son, por ejemplo, el clon anti-gp11bIIIa P2 Immuntech o los clones anti-gp11a Gi9 y Y418. Muchos anticuerpos más adecuados los pueden encontrar las personas expertas en la técnica.

Además, el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) del método anterior no está particularmente limitado, con tal que se dirija contra el HPA a detectar, es decir, a condición de que se una específicamente a dicho HPA. Los anticuerpos adecuados no están restringidos específicamente en relación con su isotipo y origen, y son conocidos en la técnica. Además, el marcador fluorescente de dicho anticuerpo no está particularmente restringido, siempre que pueda emitir luz fluorescente cuando se excita con un campo evanescente de una fuente de luz. Los marcadores fluorescentes adecuados son conocidos en la técnica. En una realización preferida, dicho marcador fluorescente es alo-ficocianina (APC).

Preferiblemente, en el método anterior, el anticuerpo de la etapa (a) y el anticuerpo de la etapa (d) tienen diferentes especificidades, es decir, se unen a diferentes epítomos.

En el método anterior, el anticuerpo de la etapa (a) y el anticuerpo de la etapa (d) se pueden intercambiar, es decir, el anticuerpo de la etapa (a) está dirigido contra al menos un HPA a detectar, y el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) se dirige contra la glicoproteína que lleva al menos un HPA a detectar. En esta realización particular, dichos anticuerpos, así como el marcador fluorescente, son como se definen anteriormente.

Tal como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" no sólo se refiere al anticuerpo respectivo como tal, sino que también incluye cualquier fragmento y derivado de dicho anticuerpo, siempre que dichos fragmentos conserven la capacidad de unirse específicamente al mismo epítomo. Los fragmentos respectivos pueden ser

fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), o fragmentos F(ab')₂. Además, en lugar de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, se puede utilizar cualquier otra macromolécula que tenga la capacidad de unirse específicamente a un epítipo. Tales macromoléculas incluyen, por ejemplo, aptámeros de nucleótidos, aptámeros de péptidos, nanocuerpos, aficuerpos, anticalins, DARPin, Phylomers, AdNectins y proteína A.

5 De acuerdo con el método anterior, en la etapa (b) las plaquetas contenidas en la muestra se lisan y las proteínas de la membrana de dichas plaquetas se solubilizan. Los métodos y agentes para la lisis y la solubilización no están particularmente limitados y se conocen en la técnica. Incluyen, por ejemplo, el tratamiento de dichas plaquetas con concentraciones adecuadas de tensioactivos tales como Tween 20 (polisorbato 20; polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán) o NP40 (nonil fenoxipolietoxietanol).

10 En el método anterior, las etapas (c) y (d) pueden llevarse a cabo posteriormente o al mismo tiempo. En particular, en una realización preferida, el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) puede estar contenido en la solución de lisis y solubilización formada en la etapa (b), de manera que las etapas (c) y (d) se ejecutan simultáneamente, cuando la solución respectiva se pone en contacto con la superficie.

15 Preferiblemente, el método anterior no requiere más de dos, más preferiblemente más de una, etapas de manipulación de líquidos. En este contexto, la expresión "paso de manipulación de líquidos", como se usa en este documento generalmente, incluye cualquier paso que transfiera, elimine o añada un líquido desde y/o hacia un sitio de acción. Por ejemplo, las etapas de manipulación de líquido de acuerdo con la presente invención incluyen la adición, por ejemplo, pipeteando, un líquido en el pocillo de una cubeta, una placa de microtitulación o un cartucho de ensayo, o eliminando un líquido de tal pocillo. Además, de acuerdo con otra realización preferida, el método anterior no incluye ninguna etapa de lavado.

20 En particular, el método anterior preferiblemente no requiere etapas para retirar el volumen que contienen los reactivos en exceso, tales como el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d), y/o el lavado de la superficie en la que el anticuerpo de la etapa (a) y/o el complejo que se mide están unidos. Esto acelera ventajosamente el método anterior para obtener rápidamente los resultados de las mediciones deseadas, evita la acumulación de residuos líquidos y los errores operacionales al llevar a cabo el método.

25 En este contexto, el método como se define anteriormente es preferiblemente un método de un solo paso. Según la presente invención, método de "un solo paso" significa que sólo se lleva a cabo una reacción de formación de complejo, lo que generalmente requiere sólo una o, como mucho, dos etapas de manipulación de líquidos que se llevan a cabo por el operador con el fin de obtener el resultado de la medición deseada. Por lo tanto, etapas adicionales de reacción, tales como la adición de más reactivos después de la formación del complejo inicial se evitan ventajosamente.

30 Por otra parte, una realización adicional del método como se define anteriormente, dicho método no incluye la agitación del líquido. En este contexto, la expresión "agitación del líquido" no está limitada específicamente e incluye cualquier tipo de agitación que se produzca en el líquido, a excepción de la difusión natural. Por ejemplo, la agitación del líquido en el sentido de la presente invención incluye agitación, bombeo, centrifugación, agitación ultrasónica, etc. Al evitar cualquier agitación del líquido, a excepción de la difusión natural que ocurre, el método puede llevarse a cabo de una manera simple y eficaz, y por lo tanto evita configuraciones técnicas complicadas incluyendo los dispositivos de agitación respectivos.

35 De acuerdo con una realización adicional del método anteriormente definido, el resultado determinado en la etapa (g) se obtiene a los 30 minutos, preferiblemente 20 minutos, más preferiblemente 10 minutos o menos a partir del inicio de la etapa (c). Según la presente invención, se obtiene el resultado cualitativo o cuantitativo a los 30 minutos, preferiblemente 20 minutos, más preferiblemente 10 minutos o menos después de que la solución que contiene la muestra lisada y solubilizada y el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) se haya puesto en contacto con la superficie a la que el anticuerpo de la etapa (a) es unido. Preferiblemente, el resultado se obtiene a los 9 minutos o menos, 8 minutos o menos o 7 minutos o menos. Otros ejemplos incluyen períodos de 6 minutos o menos, 5 minutos o menos o 4 minutos o menos.

40 De acuerdo con una realización adicional del método anterior de la presente invención, dicha superficie se pone en contacto antes de la etapa (e) con al menos un colorante que absorbe en el intervalo de absorción y/o emisión del marcador fluorescente del anticuerpo de la etapa (d). Según la presente invención, la excitación del fluoróforo en el volumen, es decir, del fluoróforo que no forma parte del complejo unido a la superficie, se puede suprimir si la solución que se coloca en contacto con la superficie tiene al menos un colorante añadido a la misma que tiene una absorción en el intervalo de absorción y/o emisiones de dicho fluoróforo. La absorción del colorante añadido al volumen se coordina con el intervalo de absorción y/o emisión de dicho fluoróforo. Se puede utilizar un colorante individual o una mezcla de colorantes. El intervalo de absorción del fluoróforo se correlaciona generalmente con la longitud de onda de la fuente de luz utilizada. No es necesario que el colorante tenga un máximo de absorción en este intervalo especial; un hombro en el espectro de absorción puede ser suficiente. Por ejemplo, si se utilizan fluoróforos como APC o Cy5, el colorante utilizado puede tener la absorción entre 600 nm y 700 nm, como, por ejemplo, Brilliant Blue FCF. Otro ejemplo de un colorante que se puede utilizar a este respecto es Brilliant Black BN. La concentración de colorante añadido depende tanto del coeficiente de absorción de cada colorante en solución

como de la frecuencia de la luz irradiada. La concentración de colorante puede ajustarse, dependiendo del colorante, de modo que la luz que penetra, básicamente, pueda ser absorbida en un grado de más del 90% de absorción en 0,1 mm por encima de la superficie.

5 De acuerdo con las etapas (e) a (g) del método anterior, el complejo unido a la superficie generado en la etapa (a) a (d) de dicho método se excita con un campo evanescente de una fuente de luz, la fluorescencia emitida por dicho complejo se mide, y al menos un HPA de interés se detecta basándose en la fluorescencia emitida medida, en el que una señal de fluorescencia positiva indica la presencia de dicho complejo y, por tanto, la presencia de al menos una HPA de interés.

10 En este contexto, la expresión "fuente de luz", como se usa en el presente documento, no se limita específicamente e incluye cualquier fuente de luz que sea adecuada para crear un campo evanescente y excitar el fluoróforo unido al anticuerpo de la etapa (d). Por ejemplo, se puede usar luz monocromática como fuente de luz. La luz debe ser utilizada para que tenga una longitud de onda que preferiblemente no interfiera con la emisión del fluoróforo y, preferiblemente que se cruce con la banda de absorción del colorante. Un láser es especialmente preferido como fuente de luz, cuya luz emite una longitud de onda de 635 nm.

15 El método anterior se basa en una nueva tecnología para el análisis de biomoléculas mediante la excitación de campo evanescente de fluoróforos unidos y la medición directa de los sucesos de unión a tiempo real como se describe en las patentes europeas EP 1 079 226 B1, EP 1 204 856 B1 y EP 1 371 967 B1. El principio funcional de este biosensor de campo evanescente es la interacción de un analito unido a la superficie con un ligando en solución mediante una interacción no covalente. El ligando en solución se une covalentemente a una molécula fluorescente.
20 La excitación preferida de la molécula fluorescente es coherente con la luz tal como se genera, por ejemplo, por un diodo láser y luego se detectan los fotones emitidos. Los fluoróforos adecuados para ello son, por ejemplo, los colorantes Cy5, Alexa o la proteína captadora de luz alo-ficocianina (APC).

La reacción bioquímica se lleva a cabo en un pequeño pocillo, similar a un pocillo de ELISA en forma y dimensiones con una entidad óptica adicional en la parte inferior. Como en el ELISA, el pocillo del biosensor y su parte inferior
25 óptica se producen mediante moldeo por inyección del material termoplástico, como, por ejemplo, poliestireno. Las principales diferencias entre el método de ELISA y los métodos evanescentes de biosensores son los marcadores del ligando en solución. Para ELISA, el marcador es una enzima y para la tecnología de evanescencia el ligando está marcado con una molécula fluorescente. La medición del fluoróforo unido, es decir, el ligando fluorescente en solución que se une al analito inmovilizado en la superficie evanescente, se logra mediante la excitación específica
30 del ligando marcado de manera fluorescente unido utilizando el principio de excitación del campo evanescente. La excitación selectiva del fluoróforo unido se produce por un campo evanescente de la luz utilizando una construcción óptica resultante en una excitación específica de una capa gruesa de aproximadamente 200 nm de líquido situada en el fondo del pocillo y que no excita al ligando marcado de manera fluorescente en exceso presente en el solución por encima de la superficie de unión. Sólo los ligandos marcados con fluorescencia que están en el campo
35 evanescente se excitan y emiten fotones. Este método permite la observación de una reacción de unión del ligando soluble con el ligando inmovilizado en tiempo real.

Aunque la mayoría de los ensayos inmunológicos utilizados en pruebas diagnósticas in vitro tienen un procedimiento largo y tedioso que implica tiempos de incubación, lavados, adición de reactivos o soluciones secundarias o terciarias para obtener un resultado de un biomarcador, el biosensor de evanescencia permite realizar ensayos
40 diagnósticos in vitro en poco tiempo. La instrumentación compleja y costosa de la automatización del ELISA o de los ensayos inmunológicos basados en perlas no es requerida ni necesaria cuando se utiliza el biosensor de evanescencia para aplicaciones de diagnóstico.

El método anterior se puede poner en práctica en conexión con un dispositivo de prueba diagnóstico para llevar a
45 cabo dicho método, comprendiendo al menos una superficie que tenga al menos el anticuerpo de la etapa (a) unido a la misma.

En este contexto, la superficie, el anticuerpo de la etapa (a), agentes de lisis y solubilización adecuados utilizados en la etapa (b), y el anticuerpo marcado con fluorescencia de la etapa (d) son como se definen anteriormente. Además, las definiciones dadas anteriormente se aplican también a este dispositivo.

Preferiblemente, el dispositivo de prueba de diagnóstico anterior tiene la forma de una cubeta, placa de
50 microtitulación o cartucho de prueba, preferentemente está hecho de vidrio o de un plástico, preferiblemente un plástico, tal como poliestireno, polipropileno, polietileno, tereftalato de polietileno, policicloolefina, poliacrilonitrilo, polimetilmetacrilato y/o mezclas y composiciones de estos plásticos. En principio, cualquier plástico que, básicamente, no absorba luz en el rango visible es adecuado. El plástico también se puede teñir de color azul claro, por ejemplo, con el fin de filtrar alguna emisión causada por la luz de dispersión. Las cubetas de plástico, placas de
55 microtitulación y los cartuchos de prueba pueden ser obtenidos económicamente por moldeo por inyección y preferiblemente tienen un volumen de reacción de 1 a 400 μl , especialmente preferido de 5 a 100 μl , y lo más preferido de 10 a 40 μl . Preferiblemente, las cubetas, placas de microtitulación o cartuchos de prueba se hacen en una sola pieza.

En este contexto, la expresión "cartucho de prueba" no se limita específicamente e incluye cualquier objeto que pueda ser utilizado para proporcionar una superficie sobre la que se une el anticuerpo de la etapa (a) y que puede ponerse en contacto con las soluciones o reactivos respectivos. Por ejemplo, el cartucho de prueba puede ser un cartucho desechable de medición de una sola vía, que contiene varios pocillos de medición totalmente separados, que son pre-acondicionados a las necesidades específicas de la medición.

En este contexto, ya que el cartucho de prueba típico tiene múltiples pocillos, varios ensayos se pueden ejecutar en paralelo. Los respectivos ejemplos incluyen la tipificación de varios alo-antígenos al mismo tiempo, incluyendo opcionalmente controles internos positivos y negativos para el control de la realización de las pruebas. Otro ejemplo podría ser la tipificación de uno o más alo-antígenos y el establecimiento de una curva de calibración al mismo tiempo.

En la presente solicitud, se han descrito métodos y pruebas para la tipificación de antígenos de plaquetas de diagnóstico para ensayos de anticuerpos basados en la tecnología de biosensores de evanescencia. Esta invención ofrece ensayos de fenotipado de plaquetas y análisis de anticuerpos para ser llevados a cabo con sólo una o dos simples manipulaciones y dando el resultado en diez minutos o menos. La presente invención no necesita de una instrumentación sofisticada o conocimiento en profundidad de la inmunología plaquetaria por el lado del operario. Los formatos de ensayo son productos únicos y dan al usuario final un resultado en diez minutos o menos. Para realizar el ensayo de acuerdo con algunas realizaciones, el usuario sólo tiene que añadir una muestra y medir en el lector de biosensor. Esta será la única etapa de trabajo manual requerida y el resultado está disponible sin ningún tipo de manipulaciones adicionales, tales como lavados y pipeteados.

Las figuras muestran:

Figura 1:

Formatos de ensayo para ensayos de tipificación de antígenos y ensayos de detección de anticuerpos

(A) Formato de ensayo para los ensayos de tipificación de antígenos. Un anticuerpo anti-glicoproteína (a) se inmoviliza sobre la superficie del sensor en la parte inferior del pocillo. La glicoproteína de membrana de plaquetas (b) de la muestra se une en un ensayo de una etapa con el reactivo específico de la glicoproteína alelo (c) modificado covalentemente con un fluoróforo (asterisco).

(B) El formato del ensayo para ensayos de anticuerpos de un solo paso y de dos pasos. Las plaquetas (a) que llevan la glicoproteína (d) se inmovilizan sobre la superficie del sensor y se hacen reaccionar con anticuerpos (b) en la muestra del paciente. Estos se detectan con un anticuerpo anti-inmunoglobulina fluorescente (c).

(C) El formato del ensayo para ensayos de anticuerpos de un solo paso y de dos pasos alternativos. Las plaquetas (a) que llevan la glicoproteína (d) se inmovilizan sobre la superficie del sensor y se hacen reaccionar con anticuerpos (b) en la muestra del paciente. Estos se detectan con plaquetas marcadas con fluorescencia (c) que llevan la misma glicoproteína (d).

Figura 2:

Esquema de ensayo para un ensayo basado en MAIPA

Un ensayo MAIPA tiene una parte de ensayo celular de unión a las plaquetas con anticuerpos anti-glicoproteína e IgG del plasma humano (A) y una parte de detección (B).

(A) Una plaqueta (a) con la glicoproteína de plaquetas (b) se pone en contacto con la muestra de plasma humano a ser analizada (e). La unión del anticuerpo anti-plaquetas humanas (d) se produce, dejando atrás el suero con un anticuerpo anti-plaquetario reducido o empobrecido (f). El exceso de plasma humano se lava manualmente. Posteriormente, se añade un anticuerpo monoclonal (c) dirigido contra la glicoproteína de plaquetas bajo examen que se une a dicha glicoproteína en la superficie de las plaquetas. Típicamente, se realizan cuatro reacciones para cuatro glicoproteínas diferentes con anticuerpos monoclonales contra gpIIb/IIIa, gpIa/IIa, gpIb/IX y HLA/beta-2-microglobulina. Después de que se forma el complejo, (b) y (c) interactúan y el exceso de anticuerpo monoclonal no unido (c) se lava manualmente. Usando un detergente que contiene tampón de lisis, el complejo tri-molecular hecho de anticuerpo específico de glicoproteína (c), la glicoproteína de plaquetas (b) y la inmunoglobulina humana (d) se solubiliza.

(B) Detección del complejo tri-molecular (b), (c), (d) en un ensayo de evanescencia de una etapa. Un anticuerpo anti-ratón IgG (g) está inmovilizado en la parte inferior del pocillo del biosensor y se incubaba con el complejo analito tri-molecular (b), (c), (d) y se detecta con el conjugado fluoróforo de inmunoglobulina anti-humana (h).

Figura 3:

Resultados obtenidos con un ensayo de tipificación HPA-1a

5 Se ensayaron muestras de sangre HPA-1a positivos y HPA-1a negativas tanto en un ensayo de tipificación comercial de HPA-1a (DiaMed, Cressier FR, Suiza), (OD 630 nm, eje x), como con el ensayo del biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención (fluorescencia dC cps, eje y).

Figura 4:

Resultados obtenidos con un ensayo de tipificación HPA-5b

Se ensayaron muestras de sangre conocidas de HPA-5b positivos y HPA-5b negativos con el ensayo de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención (fluorescencia dC cps, eje y).

10 Figura 5:

Ensayo MAIPA basado en ELISA y ensayo MAIPA de la presente invención

Esta figura muestra la comparación de los ensayos de MAIPA, ya sea con la señal de detección de ELISA (densidad óptica OD 630 nm en el eje x) y el resultado del biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención (fluorescencia dc cps en el eje y).

15 Figura 6:

Ensayo MAIPA basado en ELISA y ensayo MAIPA de la presente invención

20 Esta figura muestra la comparación de los ensayos de MAIPA donde cuatro glicoproteínas se ponen a prueba en tubos individuales y un MAIPA del biosensor de evanescencia acuerdo con la presente invención. Para las pruebas del biosensor de evanescencia, cuatro anticuerpos monoclonales diferentes que reaccionaban con las cuatro glicoproteínas de plaquetas individuales gpIIb/IIIa, gpIaIIa, gpIbIX y HLA se combinaron en un tubo de unión a un grupo de plaquetas que representan todos los posibles aloantígenos. La detección se realizó como se describió previamente con el biosensor de evanescencia. La señal de detección de ELISA (densidad óptica OD 630 nm en el eje x) y el resultado biosensor (fluorescencia dc cps en el eje y).

Figura 7:

25 Ensayo de anticuerpos de dos etapas

30 Resultados de un ensayo de anticuerpos de dos etapas, realizado de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 1B. Las plaquetas, ya sea con el fenotipo HPA-1a positivo o HPA-1a negativo (dos muestras cada uno) se recubrieron sobre la superficie del biosensor y se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal HPA-1a anti-humano diluido en diversas concentraciones. Los pocillos se lavan y el anticuerpo anti-HPA-1a humanizado unido se detecta con un conjugado fluoróforo de IgG secundario anti-humano. Las concentraciones anti HPA-1a en el eje x, la señal observada como fluorescencia dC cps se muestra en el eje y.

Figura 8:

Ensayo de anticuerpos de dos etapas

35 Esta figura muestra el resultado de un ensayo de anticuerpos de dos etapas de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 1B y esencialmente idéntico al ejemplo que se muestra en la Figura 7. Seis muestras de plasma humano se ensayaron frente a plaquetas HPA-1a positivos y HPA-1a negativos recubiertas en el biosensor evanescente. El eje x muestra el plasma individual y la señal obtenida se representa en el eje y.

Figura 9:

Ensayo de anticuerpos de una sola etapa

40 Esta figura muestra un formato idéntico de ensayo en el que la etapa de lavado se omitió y el ensayo de dos etapas mostrado en la Figura 7 se realiza como un ensayo de una etapa. Se hicieron tres revestimientos, plaquetas HPA1a+5b+, plaquetas HPA1a-5b- y un control no revestido designado 0-. La señal obtenida se muestra en el eje y como fluorescencia dC cps.

Figura 10:

45 Ensayo sándwich doble de antígeno anticuerpo para anticuerpos de toxoplasmosis

Esta prueba se realiza mediante el recubrimiento del antígeno de la Toxoplasmosis en la superficie del biosensor y otra alícuota del antígeno de Toxoplasmosis se marca con APC en solución. La IgG es biofuncional y un brazo

reacciona con el antígeno de Toxoplasmosis unido y el otro brazo de la IgG individual reacciona con el antígeno marcado con APC. Y es así como el cartucho se forma dando lugar a una señal. Sorprendentemente, esto funciona como un ensayo de una etapa. Se muestra una titulación del anticuerpo estándar de Toxoplasmosis en el eje x y la señal de fluorescencia de 10 min en el eje y. La sensibilidad se encuentra por debajo de aproximadamente 5 UI, según sea necesario.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por los siguientes ejemplos sin limitarse a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia):

Ensayo de tipificación de HPA-1a

10 Una prueba del biosensor de evanescencia de HPA-1a se lleva a cabo por reacción de una superficie recubierta de anticuerpo anti-gpIIbIIIa (anticuerpo monoclonal anti-gpIIbIIIa RFGP56), una parte de sangre anticoagulada EDTA y dos partes de una mezcla de detección que contiene el anticuerpo específico anti-HPA-1a conjugado con alo-ficocianina (APC).

15 Un chip biosensor de evanescencia se recubre con una solución de RFGP56 en PBS. El recubrimiento se realiza por dilución de la solución madre de RFGP56 a una solución de 10 microgramos por mililitro en PBS, añadiendo 30 microlitros de esta solución a cada pocillo e incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se retira la solución de revestimiento, el pocillo se lava 3 veces con PBS y se añade al pocillo finalmente 50 microlitros de solución de bloqueo. La solución de bloqueo es una solución del 1% de BSA en PBS y contiene el 0,25% de Tween 20. El bloqueo es de aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente y se termina mediante la eliminación de la
20 solución de bloqueo y la adición de la solución de la muestra a medir. Una parte de la sangre EDTA se mezcló con dos partes de un tampón de detección que contiene APC anti-HPA-1a en 7,5 microgramos por mililitro en un tampón PBS suplementado con el 4,5% de BSA, el 3% de sacarosa, EDTA 15 mM, el 0,08% de Tween 20, el 0,9% de NP40, el 0,75% de PEG6000, el 1,5% de PVPK90, 0,2 mg/ml de IIR y el 0,06% de Brilliant Black BN. 25 microlitros de la mezcla se ponen en un pocillo revestido y se mide la fluorescencia en tiempo real en 10 minutos utilizando un
25 instrumento biosensor de evanescencia y el dispositivo descrito en las patentes europeas EP1079226, EP1204856, EP1371967.

El aumento de los fotones medidos se da como un número entero y es el aumento de los fotones contados dentro de los primeros 10 minutos de la reacción para un pocillo específico. El aumento de los fotones medidos en un pocillo se da como el cambio de los fotones desde el tiempo cero segundos a tiempo 600 segundos como 'delta cuentas' (dc) con la unidad de medición cuentas por segundo o abreviado 'cps'. Los fotones de emisión de un pocillo
30 específico se miden durante la reacción bioquímica a intervalos de tiempo, cada medición es de un segundo, pero cualquier valor entre 10 milisegundos o 20 segundos por punto de medición también se puede utilizar. Los fotones medidos se representan en un gráfico en el eje Y frente al tiempo en el eje x y este procedimiento se lleva a cabo para cada pocillo individualmente. A continuación, se genera una curva de regresión lineal por el software del
35 instrumento lector y el aumento medio de los fotones por tiempo de observación de 10 minutos se calcula automáticamente.

Un dc de 23099 cuentas por segundo, cps, los fotones medidos en un segundo, significa para este específico pocillo que el número de fotones medidos se ha incrementado en 23099 cps en 10 minutos de medición. El aumento de los fotones a través del tiempo, dc en cps, es ahora una medida de la cantidad de analito en la muestra.

40 Para su comparación, las muestras de sangre se analizaron con el ensayo de tipificación de HPA-1a de DiaMed, Cressier FR, Suiza. El resultado mostrado en la figura 3 se obtiene representando en el eje x los resultados con el ensayo de tipificación HPA-1a DiaMed como OD630nm y en el eje Y los resultados de fluorescencia obtenidos con el biosensor de evanescencia. Más de 200 muestras de sangre con fenotipo conocido fueron probadas y no se observó ninguna discrepancia.

45 Ejemplo 2 (Ejemplo de referencia):

Ensayo de tipificación de HPA-5b

Un ensayo de tipificación de HPA-5b sencillo con el sistema de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo por la reacción de una superficie recubierta de anticuerpo anti-gpIaIIa (anticuerpo monoclonal anti-gpIaIIa AK7), una parte de sangre anticoagulada de EDTA y dos partes de una mezcla de detección
50 que contenía un anticuerpo anti HPA-5b específico conjugado con alo-ficocianina (APC). Métodos y tampones fueron los mismos que en el ejemplo 1 para la tipificación de HPA-1a.

Más de 100 muestras de sangre con fenotipos conocidos para HPA 5a y 5b se ensayaron y los resultados se muestran en la Figura 4. Hay una clara separación de las plaquetas HPA-5aa negativas y las plaquetas HPA-5ab positivas. No se observó ninguna discrepancia entre el fenotipo conocido y el resultado obtenido con el ensayo de

biosensor de evanescencia. Las pruebas con las plaquetas HPA-5bb y HPA5aa confirman la especificidad del ensayo.

Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia):

Ensayo de MAIPA usando detección de evanescencia

- 5 Un ensayo MAIPA tiene una parte de ensayo celular que sensibiliza las plaquetas con anticuerpos anti-glicoproteína y el anticuerpo a partir de plasma humano o suero a detectar como se esboza en la Figura 2A, y una parte de detección mostrada en la Figura 2B.

10 Las plaquetas (a) con la glicoproteína de plaquetas (b) se hacen reaccionar con un anticuerpo monoclonal (c) dirigido contra la glicoproteína de la plaqueta bajo examen. Típicamente, cuatro reacciones de cuatro glicoproteínas diferentes se realizan con anticuerpos monoclonales contra gpIIb/IIIa, gpIaIIa, gpIbIX y HLA/beta-2-microglobulina. Después de que el complejo se forma por la interacción de (b) y (c), el plasma o suero de la muestra humana a analizar se añade (e) y la unión del anticuerpo anti-HPA humana (d) se produce, dejando atrás el suero con un anticuerpo anti-plaquetas reducido o agotado (f). El exceso de plasma humano se lava manualmente. Usando un detergente que contiene tampón de lisis, el complejo tri-molecular hecho de anticuerpo específico de glicoproteína (c), glicoproteínas plaquetarias (B) y la inmunoglobulina humana (d) se solubiliza.

15 La detección del complejo tri-molecular (b), (c), (d) se realiza a continuación en un ensayo de evanescencia de una sola etapa de acuerdo con la presente invención. Un anticuerpo anti-ratón IgG (g) se inmoviliza en 10 microgramos por mililitro, como se describe en el Ejemplo 1 en la parte inferior del pocillo del biosensor, el exceso de reactivo se lava seguido de una etapa de bloqueo. Para mejorar la estabilidad del anticuerpo recubierto, los pocillos se lavan a continuación dos veces con PBS seguido de dos lavados con una solución de sacarosa al 2%. El pocillo del biosensor se seca a continuación al aire y se mantiene seco hasta su uso. Para realizar una prueba, las plaquetas recubiertas de anticuerpo se solubilizan con un tampón que contiene el 2% de BSA, el 0,25% de PVP, Hepes 10 mM, el 0,9% de NaCl, el 0,5% de Triton, el 0,09% de NaN₃. El lisado entonces se suplementa con el 0,04% de Brilliant Black BN y un conjugado IgG APC anti-humano (Jackson) a 5 microgramos por mililitro y se mide durante 10 minutos en el instrumento biosensor de fluorescencia.

20 Más de 100 muestras de suero se midieron con más de 400 puntos de medición individuales realizados por un MAIPA clásico con detección de ELISA o detección de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención. Los resultados se muestran en la Figura 5 con el trazado en el eje x de los resultados con ensayos Maipa establecidos y en el eje Y los resultados de fluorescencia obtenidos con el biosensor de evanescencia. La correlación entre los dos métodos es 0,84 y no se observa diferencia entre los métodos de detección.

25 Ejemplo 4 (Ejemplo de referencia):

Ensayo MAIPA utilizando de detección de evanescencia - Un tubo de MAIPA

30 El ensayo MAIPA utiliza rutinariamente cuatro tubos individuales en los que cada tubo se complementa con un anticuerpo monoclonal específico de glicoproteína de plaquetas; es decir, el tubo uno utiliza un anticuerpo anti-gpIIb/IIIa, el tubo dos utiliza un anticuerpo anti-gpIaIIa, el tubo tres utiliza un anticuerpo anti-gpIbIX y el tubo cuarto un anticuerpo anti HLA. El usuario final debe realizar una prueba de detección de anticuerpos con cuatro ensayos individuales. Para reducir la complejidad, el ensayo se realizó como un ensayo de detección de anticuerpos de un único tubo y a un conjunto de plaquetas se añadió un conjunto de los cuatro anticuerpos monoclonales específicos de glicoproteína y la unión se analizó con el ensayo de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención. Métodos y tampones fueron por otro lado idénticos a los dados en el Ejemplo 3.

35 100 muestras de suero se midieron por el MAIPA clásico con detección de ELISA o detección de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención. Los resultados se muestran en la Figura 6 con el trazado en el eje x de los resultados con ensayos Maipa establecidos y en el eje Y los resultados de fluorescencia obtenidos con el biosensor de evanescencia. La correlación entre los dos métodos es 0,84 y no se observa diferencia entre los dos métodos de detección. En comparación con el MAIPA clásico con cuatro reacciones de tubo individuales y detección ELISA, el nuevo método utiliza un tubo solamente con los cuatro anticuerpos monoclonales y detección de evanescencia de los complejos tri-moleculares resultantes. La ventaja de los nuevos métodos es una carga de trabajo muy reducida en la parte celular y en la parte de la detección del ensayo con sensibilidad idéntica. Esto permite ahora que el MAIPA de un solo tubo modificado con la detección de biosensor de evanescencia se haga en un tercio del tiempo necesario que un MAIPA clásico con un cuarto de las etapas de manipulación necesarias y una complejidad mucho menor para los procedimientos de manipulación. El nuevo formato es ahora adecuado como una prueba de detección de anticuerpos para los anticuerpos anti-plaquetas.

Ejemplo 5:

Ensayo de anticuerpos de HPA-1a

5 Un ensayo de anticuerpos de HPA-1a sencillo con el sistema de biosensor de evanescencia de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo por la reacción de una superficie del biosensor recubierto de plaquetas con un anticuerpo monoclonal anti HPA-1a y después lavando el exceso de anticuerpo anti HPA-1a no unido; la detección de la fracción de anti HPA-1a unido se realiza con un anticuerpo secundario marcado APC IgG anti-humano.

10 El recubrimiento del biosensor con plaquetas se realiza mediante el lavado de las plaquetas 3 veces en PBS y luego el recubrimiento de las plaquetas lavadas en PBS a aproximadamente 150.000 por microlitro en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Esto es seguido por tres lavados con PBS y una lisis hipotónica en tampón fosfato 10 mM con NaCl 10 mM durante 1 h a TA. Entonces hay tres lavados con PBS y una digestión con proteasa parcial con papaína durante 1 h a 37°C (ID-papaína, DiaMed, Cressier, Suiza), seguido de tres lavados con PBS y luego una etapa de bloqueo con BSA al 3% en PBS durante 1 h. Los pocillos se lavan tres veces con PBS, dos veces con el 1% de sacarosa y luego se secan al aire después de lo cual están listos para su uso.

15 El ensayo de unión pone a prueba diversas cantidades de anticuerpo monoclonal anti HPA-1a diluido en suero de ternera fetal, FCS, que contiene EDTA 10 mM durante 10 minutos en la superficie del biosensor, lavando los pocillos tres veces con PBS y detectando IgG unida anti HPA-1a con IgG APC anti-humano (Jackson) IgG a 5 microgramos por ml en FCS suplementado con EDTA 10 mM. Las medidas son como en el Ejemplo 1 con el biosensor de evanescencia durante 10 min.

20 Los resultados mostrados en la Fig. 7 se obtienen mediante el trazado sobre el eje x de la concentración de anticuerpo anti-HPA1a y en el eje Y los resultados de fluorescencia en la fluorescencia dc cps tal como se obtiene con el biosensor de evanescencia. La especificidad con respecto al genotipo de las plaquetas 1a y 1b es correcta. Se observa a bajas concentraciones una curva respuesta a la dosis lineal que a concentraciones superiores a 1 microgramo por mililitro de anticuerpo entra en una meseta.

25 La inmovilización de las plaquetas a la superficie del sensor se puede efectuar con muchas tecnologías de inmovilización diferentes. Las posibilidades son, por ejemplo, recubrimiento directo por absorción física, otras posibilidades son recubrir un anticuerpo de proteínas de superficie anti-plaquetas como, por ejemplo, el clon anti-gpIIb/IIIa RFGP56 o biotinilar plaquetas intactas enteras que conducen a una biotinilación de proteínas de superficie de las plaquetas y, posteriormente, la unión a una superficie de biosensor de avidina. El revestimiento de dextrano y el acoplamiento covalente o revestimientos de poli-L-lisina, seguido de acoplamientos electrostáticos y/o covalentes son sólo ejemplos de las posibilidades técnicas en este sentido. Otros anticuerpos antiplaquetarios tales como anti-HPA-5b o anti-plaquetas auto-anticuerpos pueden ser detectados utilizando el mismo método.

Ejemplo 6:

Ensayo de anticuerpos de HPA-1a con muestras de plasma humano

35 El rendimiento del ensayo de anticuerpos HPA-1a descrito en el Ejemplo 5 se evaluó adicionalmente con un pequeño número de sueros humanos. La producción del ensayo y el método de ensayo y tampones fueron como se describe en el Ejemplo 5. El sistema de biosensor de evanescencia se lleva a cabo por reacción de una superficie de biosensor recubierto de plaquetas con el anticuerpo monoclonal anti HPA-1a y después lavando el exceso del anticuerpo anti HPA-1a no unido y la detección de la fracción del anti-HPA-1a unido con un anticuerpo secundario marcado IgG APC anti-humano.

40 El ensayo de unión puso a prueba diluciones al 1% de seis plasmas humanos diferentes según su capacidad para unirse con los biosensores recubiertos de plaquetas recubiertos con plaquetas HPA1a positivas o HPA1a negativas. Las muestras de plasma humano fueron cuatro de plasma humano negativo y un positivo y un control negativo del laboratorio de referencia de plaquetas Lyon EFS, Lyon Francia con un diámetro exterior de 0,7 MAIPA para el plasma positivo y <0,1 DO para el plasma negativo. Este DO de 0,1 es el valor de corte para la positividad de MAIP o 7 veces la señal más fuerte que el valor de corte.

45 La Figura 8 muestra el suero positivo de anti HPA-1a para reaccionar fuertemente con las plaquetas positivas HPA-1a y sólo con una reacción de fondo a las plaquetas negativas HPA-1a. La relación señal-ruido es similar a los resultados MAIPA. Los sueros de control negativo HPA1a, así como los otros sueros negativos no dieron ninguna reacción por encima de los niveles de fondo.

Ejemplo 7:

Ensayo de anticuerpos de una sola etapa para el anticuerpo HPA-1a

50 Para mejorar aún más la facilidad de uso en la realización del ensayo de anticuerpos de plaquetas se prepararon biosensores de plaquetas como se describe anteriormente por el revestimiento y secado de plaquetas en los pocillos.

- 5 A continuación, el ensayo se realizó diluyendo el plasma humano marcado M del Ejemplo 6 tomando una parte de plasma en 200 partes de FCS suplementado con EDTA 10 mM. Se prepararon dos muestras, en la que la primera muestra utilizó plasma M y a la segunda muestra se le añadió un anticuerpo HPA-1a anti-humano. Se añadió IgG APC anti-humano (Jackson) a una concentración final de 20 microgramos por mililitro y la mezcla se analizó con un biosensor recubierto de plaquetas. Tres revestimientos diferentes se utilizaron para este ensayo, las plaquetas HPA1a positivos, plaquetas HPA 1a negativos y pocillos no recubiertos vacíos como control negativo para el biosensor y la línea de fondo del instrumento. Las mezclas se pipetearon en los pocillos y se midieron como se describe en los ejemplos anteriores durante 10 minutos en un instrumento biosensor de evanescencia y los resultados se registraron.
- 10 La figura 9 muestra una señal sólo para el biosensor revestido con las plaquetas HPA1a+ con plasma M añadido mientras que el plasma M no añadido dio un resultado negativo. El biosensor de plaquetas HPA1a negativo y el biosensor solo dieron como resultado sólo la señal de fondo. Esto confirma la sensibilidad y la especificidad de las pruebas del biosensor de evanescencia según la presente invención en un ensayo de anticuerpo de una sola etapa. Se ha demostrado a través del ejemplo de tipificación del aloantígeno HPA-1a que el método de evanescencia es adecuado para todas las tipificaciones de aloantígeno de plaquetas y pruebas de anticuerpos.
- 15

Ejemplo 8 (Ejemplo de referencia)

- 20 Se realiza un ensayo de anticuerpos de doble antígeno de una sola etapa para la toxoplasmosis mediante el cultivo de toxoplasma en un cultivo de células y se lleva a cabo la purificación del antígeno a partir del cultivo por repetidas etapas de sonicación y centrifugación (DiaMed Eurogen, Turnhout, Bélgica). El antígeno está en la forma de una materia especial y se utiliza tal como está. Una alícuota se utiliza para recubrir el chip biosensor a 10 microgramos por mililitro. Una segunda alícuota se marca con APC como se describe. La prueba se realiza tomando dos partes de estándar IgG anti-toxoplasmosis y mezclando con una parte de una mezcla de detección triple concentrada tamponada con Tris caseína al 1%, el 3% de BSA y el 0,9% de Tween 20 y 10 microgramos por mililitro de antígeno-APC de toxoplasmosis. Esta mezcla se transfiere a un pocillo recubierto de antígeno de toxoplasmosis y se mide.
- 25 Los resultados se muestran en la Fig. 10.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de anticuerpos humanos dirigidos contra aloantígenos de plaquetas humanas (HPA), en una muestra, que comprende las etapas:
- 5 (a) proporcionar al menos una superficie que tenga al menos plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas unidas a la misma, en donde los HPA de interés que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son conocidos;
- 10 (b) poner en contacto dicha superficie con dicha muestra, en el que los anticuerpos humanos dirigidos contra los HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, contenidos en dicha muestra, se inmovilizan sobre dicha superficie uniéndose específicamente a las plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas de la etapa (a);
- 15 (c) poner en contacto dicha superficie con un agente de detección marcado con fluorescencia, en el que dicho agente de detección se une específicamente a anticuerpos humanos dirigidos contra los HPA que están presentes en dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas, y en el que dicho agente de detección, los respectivos anticuerpos humanos contenidos en dicha muestra, y las plaquetas humanas o fracciones de membrana de plaquetas de la etapa (a) forman un complejo unido a la superficie;
- (d) excitar dicho complejo unido a la superficie con un campo evanescente de una fuente de luz;
- (e) medir la fluorescencia emitida a partir de dicho complejo unido a la superficie; y
- (f) detectar los anticuerpos humanos contra los HPA que están presentes en dicho plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas en base a la fluorescencia emitida medida en la etapa (e),
- 20 en donde las plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas son plaquetas o fragmentos de plaquetas que comprenden glicoproteínas nativas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los HPA son HPA-1a y/o HPA-5b.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente de detección marcado con fluorescencia de la etapa (c) se selecciona del grupo que consiste en
- 25 (i) anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos contra anticuerpos humanos, y
- (ii) plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas marcadas con fluorescencia, en el que dichas plaquetas o fracciones de membrana de plaquetas llevan los mismos HPA que las plaquetas o fracciones de membranas de plaquetas de la etapa (a)
- 30 4. Un método para la detección simultánea de (i) al menos un aloantígeno de plaquetas humanas (HPA) en plaquetas humanas contenidas en una muestra, y (ii) anticuerpos humanos dirigidos contra aloantígenos plaquetarios humanos (HPA), en una muestra, que comprende las etapas de:
- (α) realizar un método para la detección de al menos un aloantígeno de plaquetas humano (HPA) en plaquetas humanas contenidas en una muestra, que es sangre entera anti-coagulada en una concentración de más del 25%, que comprende las etapas de:
- 35 (a) proporcionar al menos una superficie que tiene al menos un anticuerpo unido a la misma, en el que dicho anticuerpo se dirige contra la glicoproteína que lleva al menos un HPA a detectar;
- (b) lisar las plaquetas contenidas en la muestra y solubilizar las proteínas de la membrana de dichas plaquetas;
- (c) poner en contacto dicha superficie con la muestra lisada y solubilizada de la etapa (b), en el que las respectivas glicoproteínas contenidas en dicha muestra se inmovilizan sobre dicha superficie al unirse específicamente al anticuerpo de la etapa (a);
- 40 (d) poner en contacto dicha superficie con un anticuerpo marcado con fluorescencia, en el que dicho anticuerpo se dirige contra al menos un HPA a detectar, y en el que dicho anticuerpo, las respectivas glicoproteínas contenidas en dicha muestra, y el anticuerpo de la etapa (a) forman un complejo unido a la superficie;
- (e) excitar dicho complejo unido a la superficie con un campo evanescente de una fuente de luz;
- 45 (f) medir la fluorescencia emitida a partir de dicho complejo unido a la superficie; y
- (g) detectar el al menos un HPA basado en la fluorescencia emitida medida en la etapa (f).
- (β) realizar el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

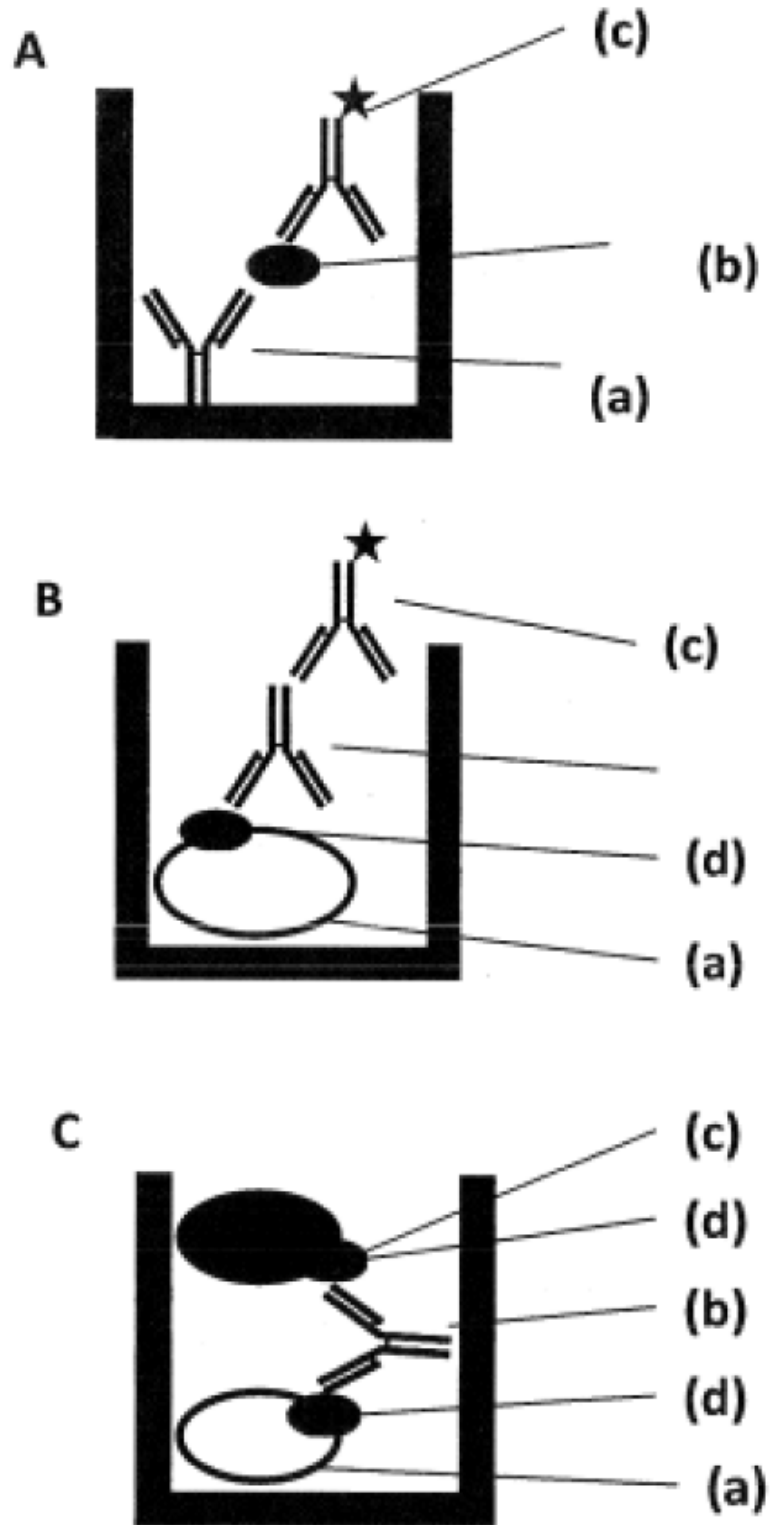


Figura 1

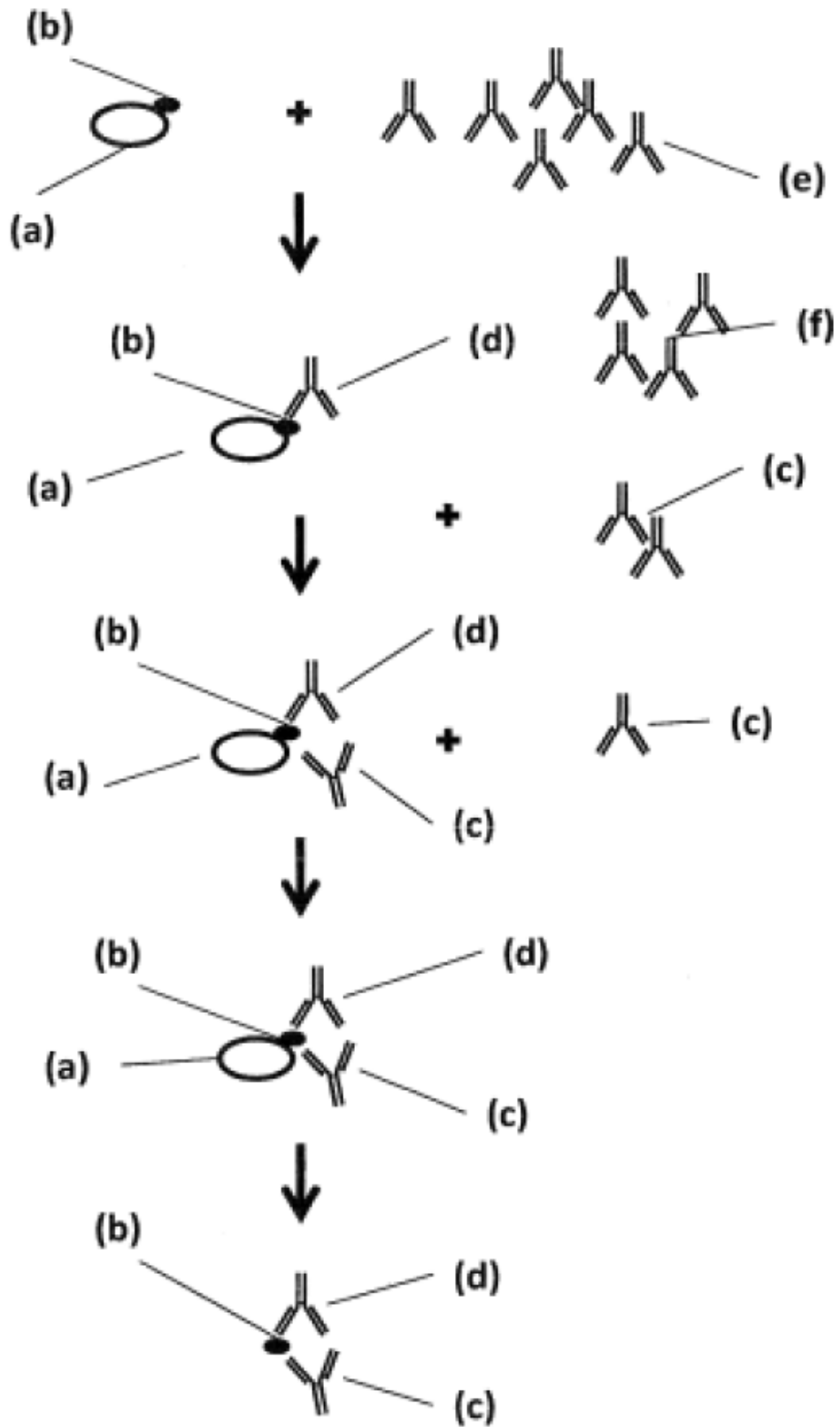


Figura 2a

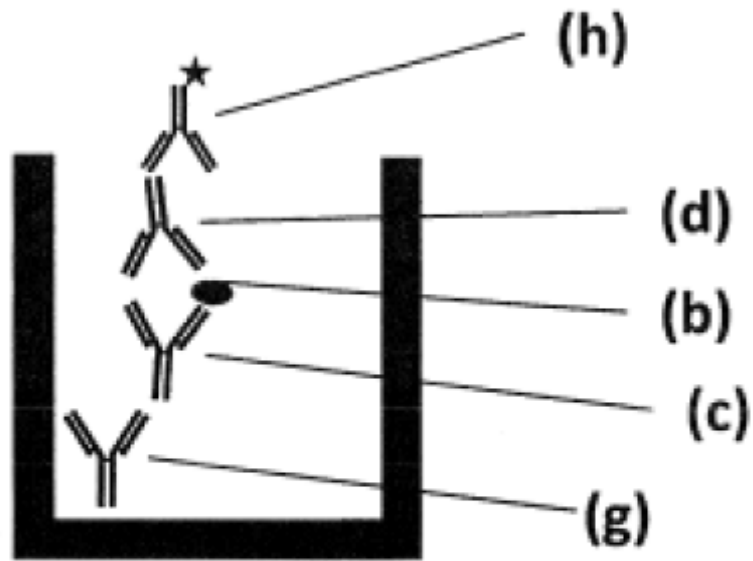


Figura 2b

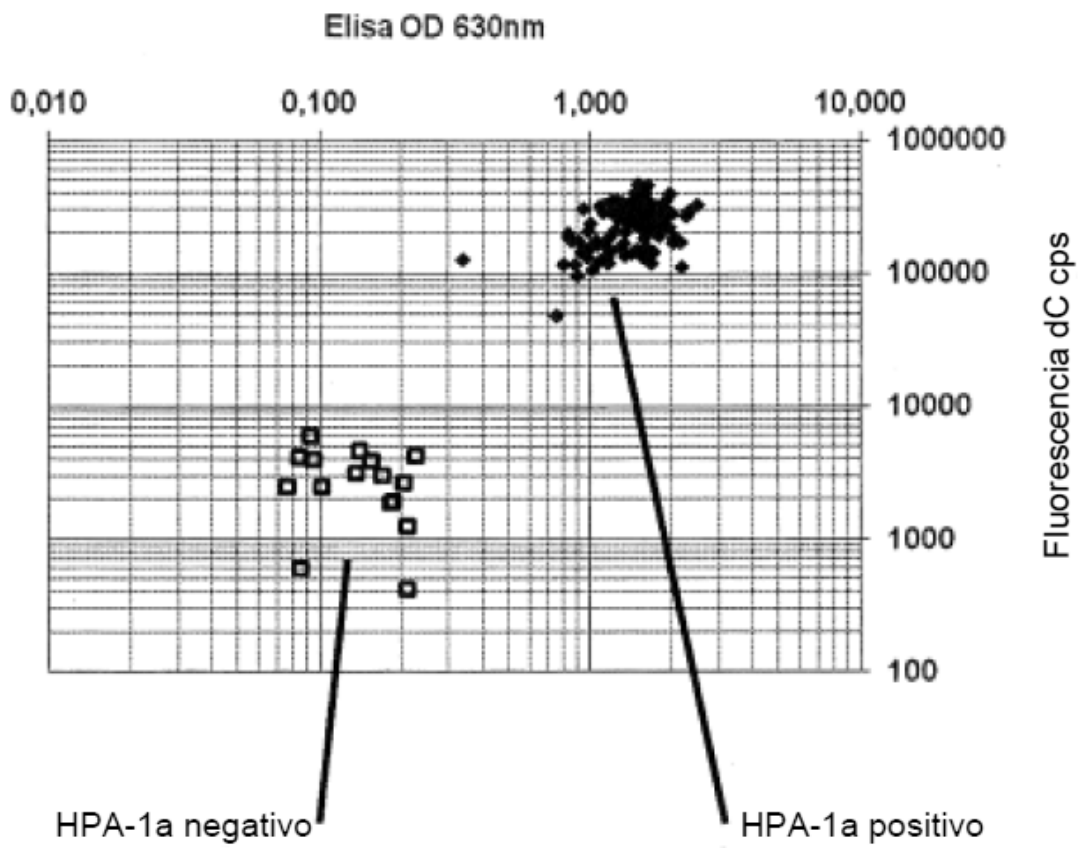


Figura 3

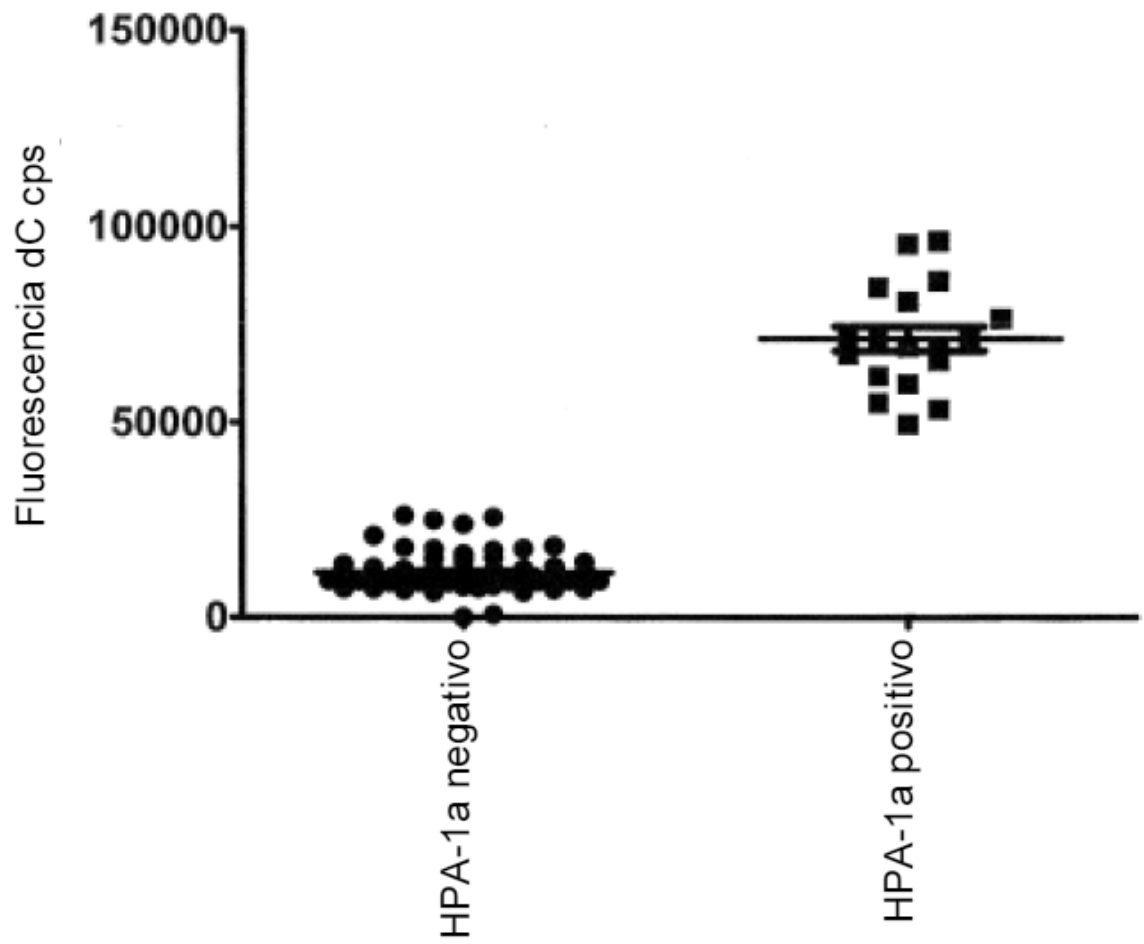


Figura 4

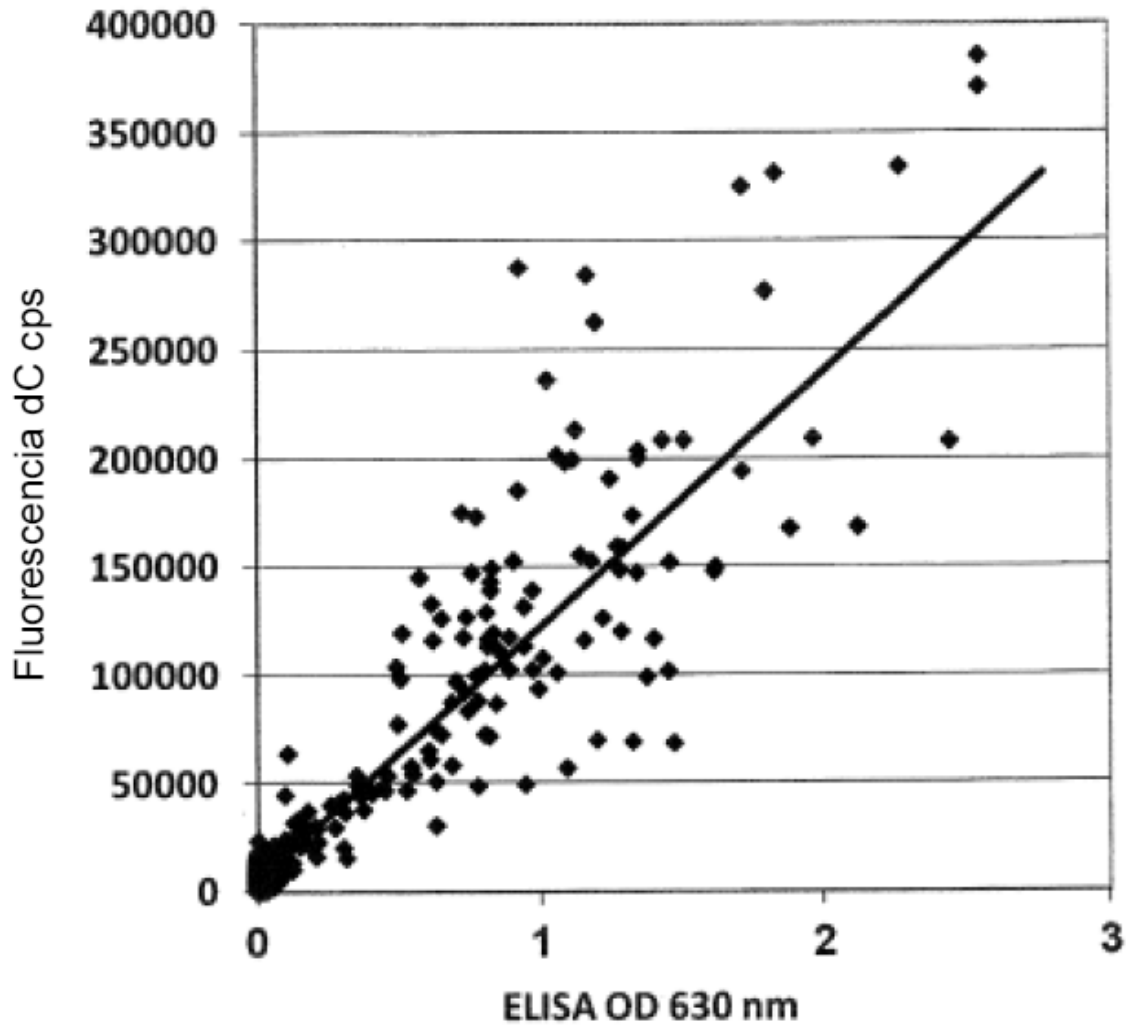


Figura 5

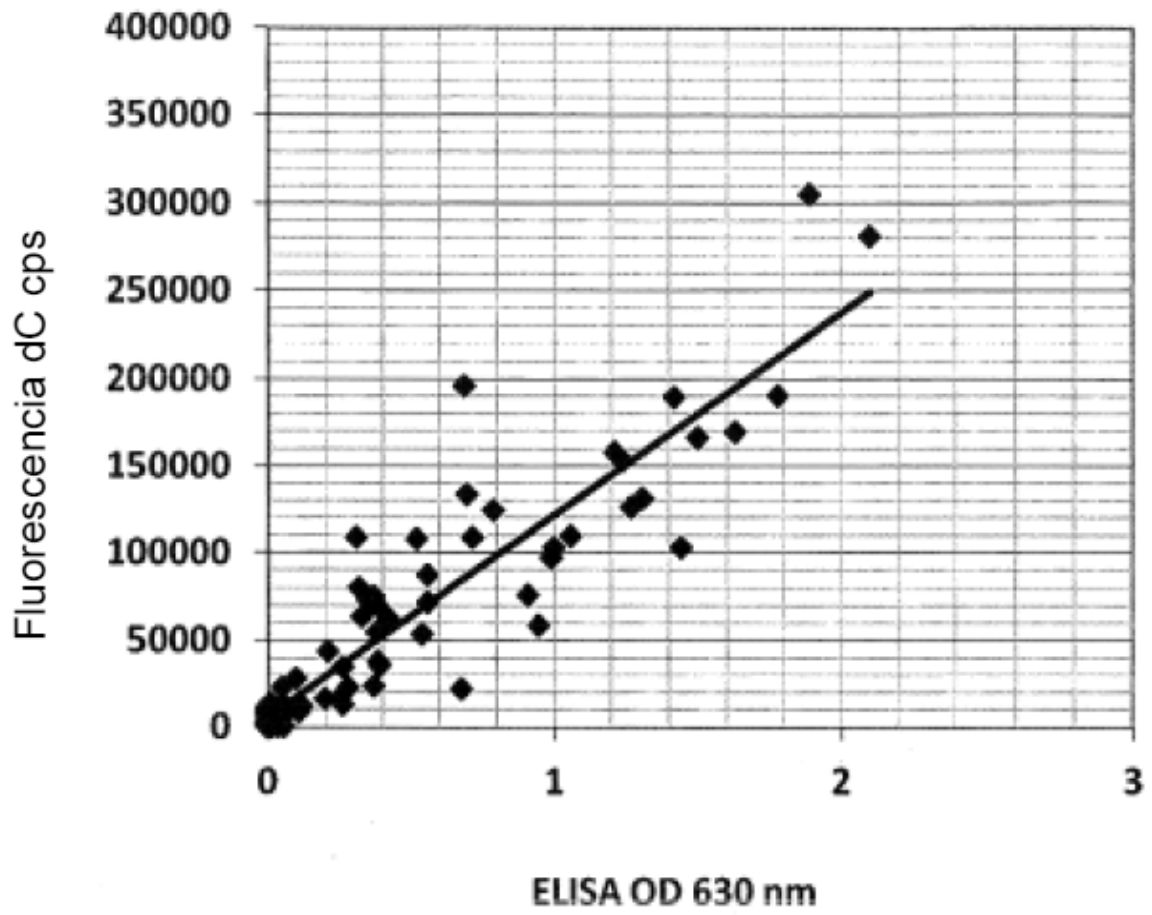


Figura 6

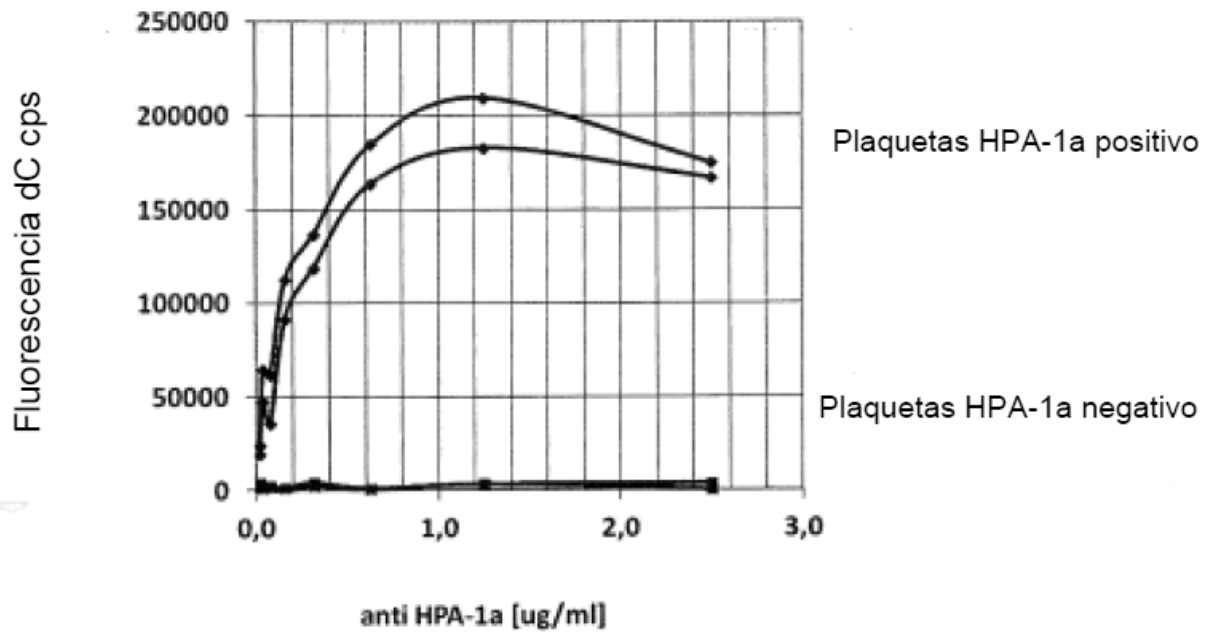


Figura 7

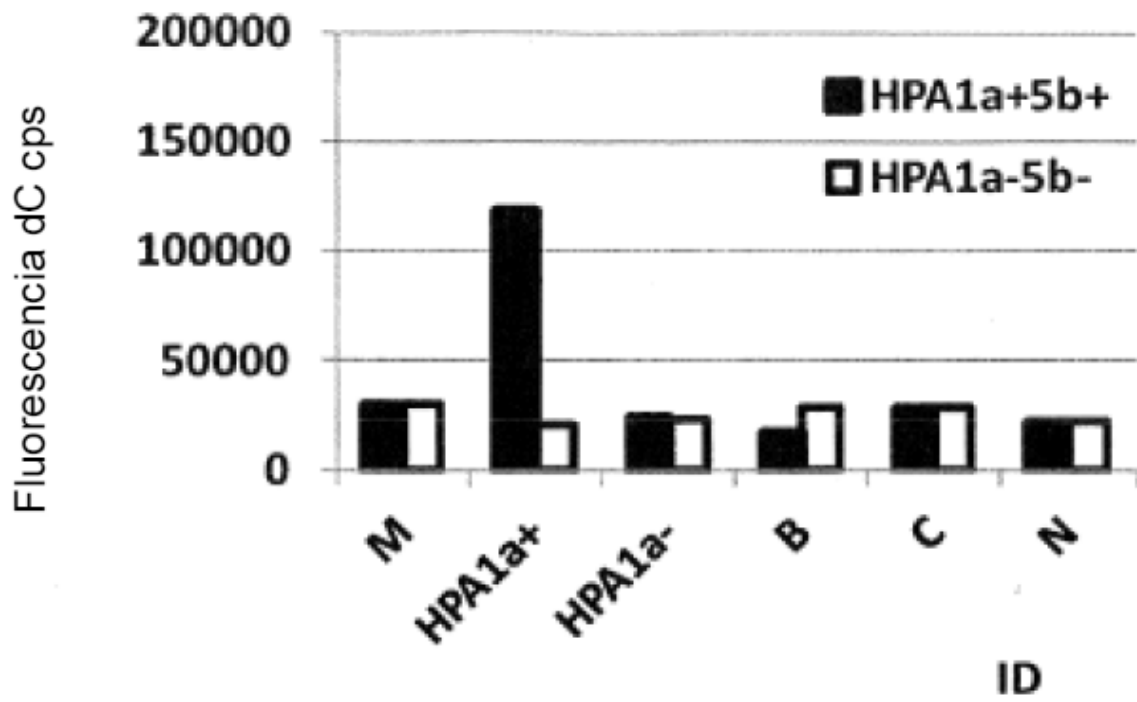


Figura 8

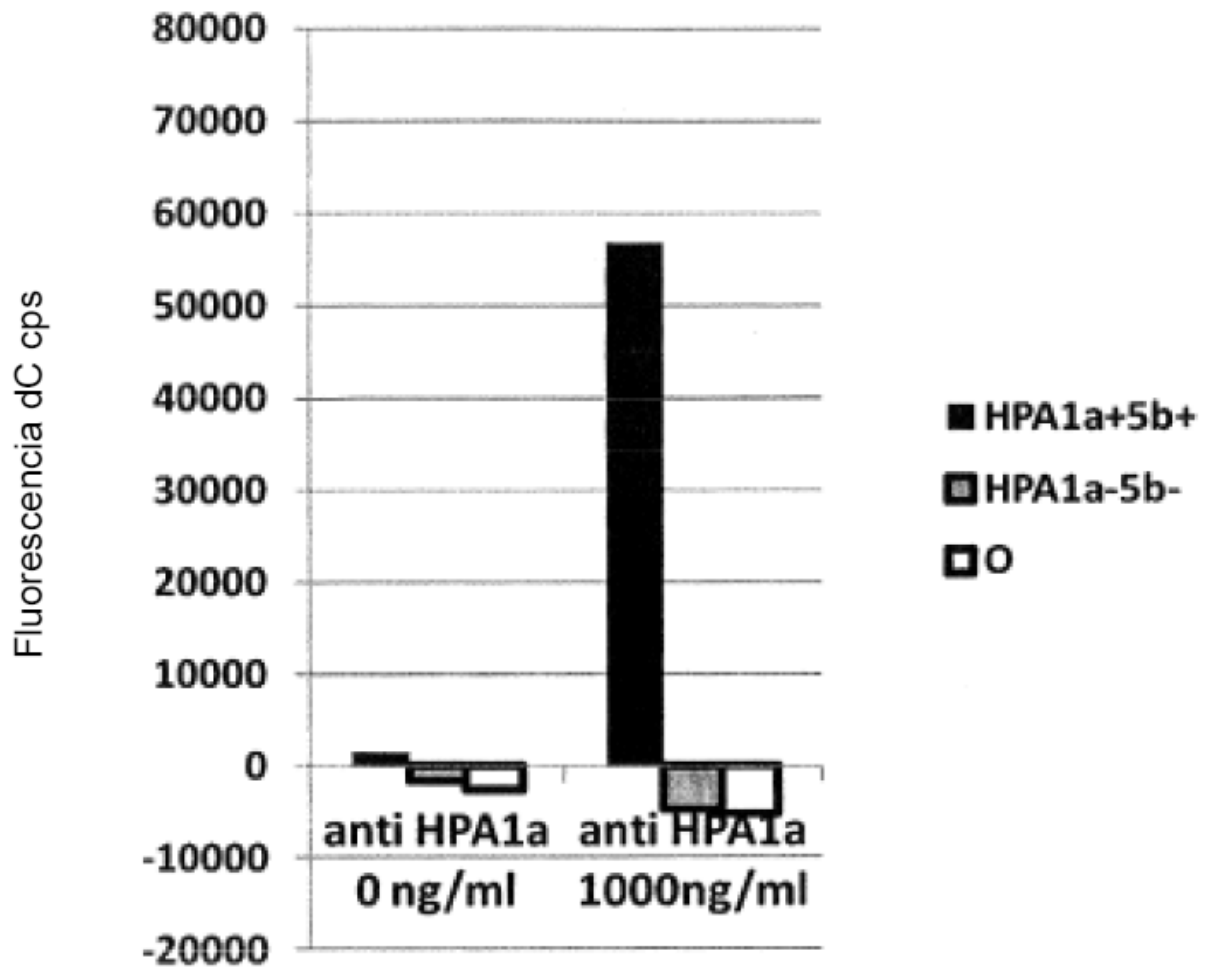


Figura 9

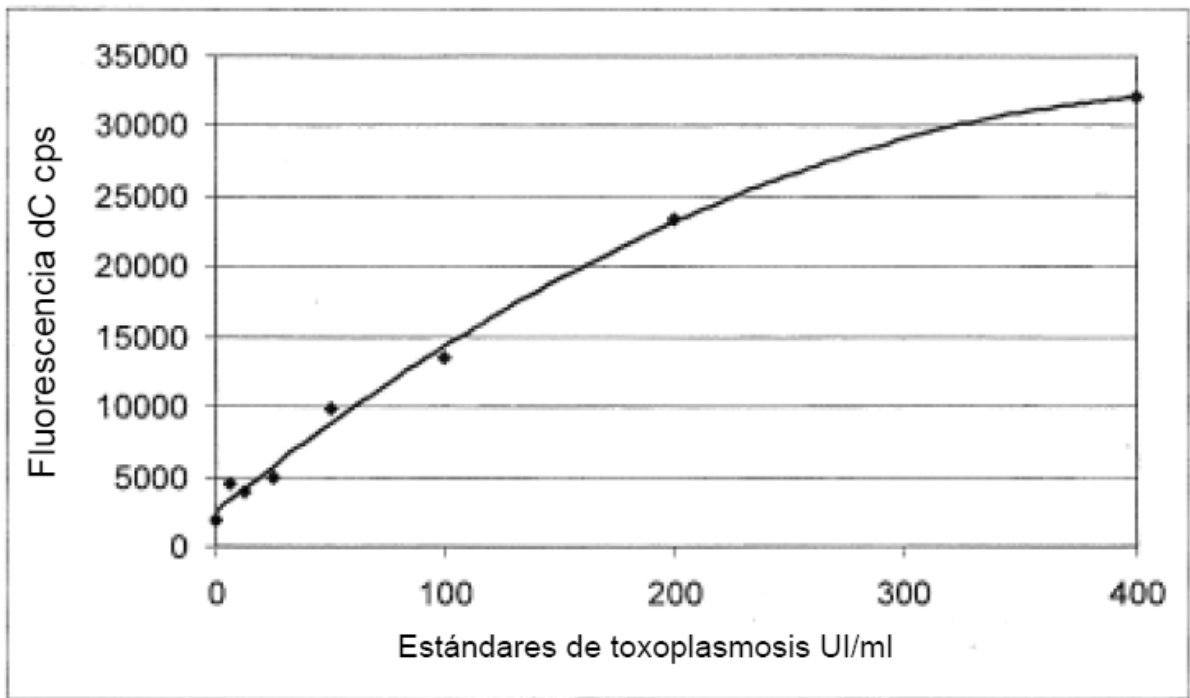


Figura 10