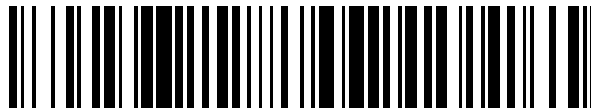


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 813**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007 E 16193284 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3168618**

54 Título: **Métodos altamente sensibles para el análisis de troponina**

30 Prioridad:

04.04.2006 US 789304 P
19.04.2006 US 793664 P
26.05.2006 US 808622 P
28.11.2006 US 861498 P
04.12.2006 US 872986 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 703 813 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

Métodos altamente sensibles para el análisis de troponina

5 **Antecedentes de la invención**

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

Los marcadores utilizados actualmente para el daño cardíaco tienen desventajas que limitan su utilidad clínica. Los ensayos enzimáticos cardíacos han servido de base para determinar si hay o no daño al músculo cardíaco. Desafortunadamente, el ensayo habitual de la creatina cinasa-MB (CK-MB) no es confiable en la exclusión del infarto hasta las 10 a 12 horas después de la aparición de dolor torácico. El diagnóstico precoz tendría ventajas muy específicas con respecto a la terapia fibrinolítica y el triaje. Lam Q. et al., *CLIN CHEM*, 52 (2), 2006, 298-300 y Uettwiller-Geiger D. et al., *CLIN CHEM*, 48 (6), 2002, 869-876 desvelan ensayos automatizados de troponina I con un límite de detección de 4 pg/ml. Sin embargo, su sensibilidad funcional no permite utilizar concentraciones umbral en el intervalo de pg/ml de un solo dígito para el diagnóstico o pronóstico del infarto de miocardio.

Sumario de la invención

25 La invención proporciona un método para determinar un diagnóstico o pronóstico en un individuo que comprende:

- (i) medir la concentración de la troponina cardíaca I (cTnI) a partir de una muestra de suero del individuo, en la que dicha concentración se determina mediante un ensayo de cTnI con un límite de detección para dicha cTnI en dicha muestra de menos de 5 pg/ml;
- 30 (ii) comparar la concentración medida a una concentración umbral de 7 pg/ml; y
- (iii) determinar un diagnóstico o pronóstico de infarto de miocardio en el individuo, si la concentración de la muestra es mayor que la concentración umbral;

en el que el individuo es un ser humano.

35 En algunos casos, la memoria descriptiva proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de una única molécula de troponina o un fragmento o complejo de la misma en una muestra, incluyendo i) marcar la molécula, fragmento, o complejo, si está presente, con un marcador; y ii) detectar la presencia o ausencia del marcador, donde la detección de la presencia del marcador indica la presencia de la única molécula, fragmento, o complejo de troponina en la muestra. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, una única molécula de troponina se puede detectar a un límite de detección de menos de aproximadamente 100 pg/ml. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, una única molécula de troponina se puede detectar a un nivel de detección de menos de aproximadamente 20 pg/ml. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el marcador incluye un resto fluorescente. En algunos casos, el resto fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual, el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente incluye un colorante. Los ejemplos de colorantes incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 y Alexa Fluor 700. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente incluye Alexa Fluor 647. En algunos casos, el resto fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el marcador incluye además un compañero de unión de la molécula de troponina, fragmento, o complejo. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el compañero de unión incluye un anticuerpo específico para la molécula de troponina, fragmento, o complejo. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es específico para una región específica de la molécula de troponina. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es específico para una región que comprende los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardíaca. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, los métodos incluyen además la captura de troponina o complejo de

troponina sobre un soporte sólido. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el soporte sólido puede ser una placa de microtitulación o perlas paramagnéticas. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el soporte sólido incluye un compañero de captura específico para la troponina o el complejo de troponina que está unido al soporte sólido. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión del compañero de captura con el soporte sólido es no covalente. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión del compañero de captura con el soporte sólido es covalente. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión covalente del compañero de captura es de manera que el compañero de captura está unido al soporte sólido en una orientación específica. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la orientación específica sirve para maximizar la unión específica de la troponina o el complejo de troponina con el compañero de captura. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el compañero de captura comprende un anticuerpo. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 87-91 de la troponina I cardíaca. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 41-49 de la troponina I cardíaca. De acuerdo con la invención, la muestra es suero humano. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el marcador incluye un resto fluorescente y la etapa ii) incluye hacer pasar el marcador por medio de un detector de una única molécula. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el detector de una única molécula incluye: a) una fuente de radiación electromagnética para estimular el resto fluorescente; b) una célula de flujo capilar para hacer pasar el resto fluorescente; c) una fuente de fuerza motriz para mover el resto fluorescente en la célula de flujo capilar; d) un espacio de interrogación definido dentro de la célula de flujo capilar para recibir la radiación electromagnética emitida desde la fuente electromagnética; e) un detector de radiación electromagnética operativamente conectado al espacio de interrogación para medir una característica electromagnética del resto fluorescente estimulado; y f) una lente del objetivo del microscopio situada entre el espacio de interrogación y el detector, donde la lente es una lente de alta apertura numérica.

En algunos casos, la memoria descriptiva describe un método para determinar un diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento en un individuo que incluye: i) determinar una concentración de troponina cardíaca en una muestra o determinar las concentraciones de troponina cardíaca en una serie de las muestras procedentes del individuo, donde la concentración se determina mediante un ensayo de troponina cardíaca con un límite de detección para la troponina cardíaca en la muestra de menos de aproximadamente 50 pg/ml; y ii) determinar un diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento en el individuo, basados en la concentración en la muestra, o en las concentraciones en la serie de muestras. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la etapa ii) incluye un análisis tal como comparar la concentración o la serie de concentraciones con un valor normal para la concentración, comparar la concentración o la serie de concentraciones con un nivel de umbral predeterminado, comparar la concentración o series de las concentraciones con un valor de referencia y determinar una velocidad de cambio de la concentración para la serie de concentraciones. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la etapa ii) incluye comparar la concentración de troponina en la muestra con una concentración umbral predeterminada y determinar un diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento si la concentración de la muestra es mayor que el nivel umbral. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la concentración umbral se determina por la determinación de una concentración del percentil 99 de la troponina en un grupo de individuos normales y el establecimiento de la concentración umbral en la concentración del percentil 99. En algunos casos, se toma al menos una muestra durante o después de un ensayo de esfuerzo cardíaco. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la concentración de troponina cardíaca es una concentración de la troponina cardíaca total. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la concentración de troponina cardíaca es una concentración de un complejo de troponina cardíaca, fragmento de troponina cardíaca, la troponina cardíaca fosforilada, la troponina cardíaca oxidada, o una combinación de los mismos. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la concentración de troponina cardíaca se compara con la troponina cardíaca total. En los métodos de la invención, el diagnóstico, el pronóstico es un diagnóstico o pronóstico del infarto de miocardio. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el diagnóstico, el pronóstico o método de tratamiento comprende la estratificación del riesgo para el nivel de riesgo del infarto de miocardio. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la concentración o la serie de concentraciones se determina en o cerca del momento en el que el individuo se presenta a un profesional de la salud con uno o más síntomas indicativos de isquemia miocárdica o infarto o la posibilidad del mismo. En algunos casos, el o los síntomas pueden ser dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, los niveles de enzimas anormales, o falta de aire. En algunos casos, la concentración se determina por un método que incluye la detección de moléculas únicas de troponina o complejos, o fragmentos de la misma. En algunos casos, los métodos que se describen en el presente documento implican la marcación de la troponina o un complejo de troponina con un marcador que comprende un resto fluorescente. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser en la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente incluye una molécula que contiene al menos un sistema

de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente incluye un colorante seleccionado entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 700. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el resto fluorescente comprende Alexa Fluor 647. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el marcador comprende además un compañero de unión para la troponina. En algunos casos, el compañero de unión comprende un anticuerpo específico para la troponina. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, los métodos incluyen además la captura de troponina o complejo de troponina sobre un soporte sólido. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el soporte sólido puede ser una placa de microtitulación o perlas paramagnéticas. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el soporte sólido incluye un compañero de captura específico para la troponina o el complejo de troponina que está unido al soporte sólido. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión del compañero de captura con el soporte sólido es no covalente. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión del compañero de captura con el soporte sólido es covalente. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la unión covalente del compañero de captura es de manera que el compañero de captura está unido al soporte sólido en una orientación específica. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la orientación específica sirve para maximizar la unión específica de la troponina o el complejo de troponina con el compañero de captura. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la etapa i) implica además la evaluación de otro indicador para el individuo y la etapa ii) implica determinar un diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento en el individuo, basados en la concentración de troponina y la evaluación del otro indicador del marcador no de troponina en la muestra, o en las concentraciones en la serie de muestras. En algunos casos, el otro indicador es un indicador clínico de infarto o isquemia miocárdica. En algunos casos, el otro indicador es la concentración de uno o más marcadores no de troponina en la muestra o la serie de muestras. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, el uno o más marcadores son marcadores de isquemia cardíaca, o marcadores de inflamación y de inestabilidad de la placa. En algunos casos, el uno o más marcadores de isquemia cardíaca pueden ser creatina cinasa (CK) y su banda miocárdica (MB) de la fracción miocárdica CK, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (LDH), α -hidroxibutirato deshidrogenasa, la mioglobina, el glutamato oxaloacetato transaminasa, glucógeno fosforilasa BB, ácidos grasos libres no unidos, proteína de unión a ácidos grasos de corazón (H-FABP), albúmina modificada por isquemia, miosina de cadena ligera 1, o miosina de cadena ligera 2. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, los uno o más marcadores incluyen uno o más marcadores específicos de daño miocárdico. En algunos casos de los métodos que se describen en el presente documento, la afección se selecciona entre el grupo que consiste en fiebre reumática aguda, amiloidosis, trauma cardíaco (incluyendo contusión, ablación, electroestimulación, descarga, cardioversión, cateterización y cirugía cardíaca), lesión por reperfusión, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal en fase terminal, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II (enfermedad de Pompe), trasplante de corazón, hemoglobinopatía con hemosiderosis transfusional, hipertensión, incluyendo la hipertensión gestacional, hipotensión, con frecuencia con arritmias, hipotiroidismo, miocarditis, pericarditis, cirugía no cardíaca post-operatoria, embolia pulmonar y sepsis.

La memoria descriptiva también describe las composiciones.

En algunos casos la memoria descriptiva describe una composición para la detección de una isoforma de troponina incluyendo un compañero de unión con la isoforma de troponina unida a un resto fluorescente, donde el resto fluorescente es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos de las composiciones, el compañero de unión comprende un anticuerpo para la isoforma de troponina. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, la isoforma de troponina es una isoforma cardíaca. En algunos casos, la isoforma cardíaca se selecciona entre el grupo que consiste de cTnI y cTnT. En algunos casos, la isoforma cardíaca es cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de la molécula de troponina. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región que comprende los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardíaca. En algunos casos de las composiciones, el resto fluorescente comprende una molécula que comprende al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. En algunos casos, el resto fluorescente incluye un colorante que puede ser Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 700. En algunos casos, el resto fluorescente comprende Alexa Fluor 647.

En el presente documento se describe una composición que comprende un conjunto de patrones para determinar una concentración de una troponina cardíaca, donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardíaca de menos de aproximadamente 10 pg/ml.

En el presente documento se describe un kit que contiene una composición que incluye un anticuerpo para la

troponina cardiaca unido a un resto de colorante fluorescente, donde el resto es capaz de emitir al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios, donde la composición se envasa en un embalaje adecuado. En algunos casos de los kits, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca o la troponina T cardiaca. En algunos casos, la troponina cardiaca es la troponina I cardiaca. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además las instrucciones. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además una composición que contiene un anticuerpo de captura para la troponina I cardiaca unido a un soporte sólido. En algunos casos, el soporte sólido comprende una placa de microtitulación o micropartículas paramagnéticas. En algunos casos de los kits, los kits incluyen además un componente seleccionado entre el grupo que consiste en tampón de lavado, tampón de ensayo, tampón de elución y el diluyente del calibrador. Algunos casos de los kits incluyen además un patrón para la troponina cardiaca.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

Figura 4. Curva patrón linealizada para el intervalo de concentraciones de cTnI.

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

Figura 6. Correlación de los resultados del ensayo de cTnI determinada utilizando el sistema de análisis de la memoria descriptiva con las mediciones patrón proporcionadas por el Instituto Nacional de Patrones y Tecnología ($R^2 = 0,9999$).

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

Figura 8. Distribución de las concentraciones biológicas normales de cTnI (sin isquemia) y las concentraciones de cTnI en muestras de suero de pacientes con dolor torácico.

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

Descripción detallada de la invención

Sumario

I. Introducción

II. Troponina cardiaca

III. Etiquetas para la troponina cardiaca

A. Compañeros de unión para troponina

1. Anticuerpos

2. Anticuerpos de reacción con cruzamiento

B. Restos fluorescentes para ser utilizadas con compañeros de unión

1. Colorantes

2. Puntos cuánticos

C. Composiciones de compañero de unión-resto fluorescente

IV. Análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca

A. Muestra

- B. Preparación de la muestra
- C. Detección de la troponina y determinación de la concentración

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

5

- A. Aparato/Sistema
- B. Analizador de partículas únicas

10

1. Fuente de radiación electromagnética
2. Célula de flujo capilar
3. Fuerza motriz
4. Detectores

15

- C. Sistema de muestreo
- D. Sistema de preparación de la muestra
- E. Recuperación de la muestra

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

20

- A. Muestras
- B. Determinación de diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento

25

1. Infarto agudo de miocardio
2. Afecciones distintas del IAM a. Toxicidad cardiaca

- C. Métodos comerciales

VII. Composiciones

VIII. Kits

30

I. Introducción

35

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

40

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

45

50

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

55

Debido a que el nivel de troponina encontrado en la circulación de los individuos sanos es muy bajo y las troponinas cardiacas específicas no proceden de fuentes extra-cardiacas, las troponinas son marcadores muy sensibles y específicos de lesión cardiaca. Además del infarto cardiaco, una serie de otras afecciones puede causar daño al músculo cardiaco y la detección precoz de dichos daños resultaría útil para los clínicos. Sin embargo, los métodos actuales de detección y cuantificación de la troponina cardiaca no poseen suficiente sensibilidad para detectar la liberación de troponina cardiaca en la sangre, hasta que los niveles hayan alcanzado concentraciones anormalmente altas, por ejemplo, 0,1 ng/ml o mayor.

60

Por tanto, los métodos de la invención incluyen métodos para el diagnóstico o pronóstico basado en la detección altamente sensible y cuantificación de la troponina cardiaca.

65

II. Troponina cardiaca

Cuando las dos formas únicas de troponina cardiaca, la troponina I cardiaca (cTnI) y la troponina cardiaca (cTnT)

son liberadas en la sangre procedentes del músculo cardiaco, pueden existir varias especies de cada una en la sangre. Estas incluyen diversos complejos de las dos formas, entre sí y/o con la troponina C cardiaca (cTnC). Además, las dos formas se someten a la degradación proteolítica prácticamente inmediata, dando como resultado una diversidad de fragmentos. También, pueden existir diversas formas fosforiladas y oxidadas de las troponinas en la sangre. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 6.991.907. A menos que se especifique lo contrario, "troponina cardiaca", como se usa en el presente documento, abarca todas las formas de troponina cardiaca.

En algunos casos, la memoria descriptiva describe métodos y composiciones para la detección y/o determinación de la concentración de troponina cardiaca total, es decir, la suma de la totalidad o una parte sustancial de la troponina cardiaca en una muestra, por ejemplo, muestra de sangre, suero o plasma, si está libre, formando un complejo, un fragmento proteolítico, fosforilado, oxidado, o modificado de otro modo. Se apreciará que no tiene por qué alcanzarse una medición total absoluta, siempre y cuando se determine una relación constante del total, que pueda compararse con los valores patrón. También se apreciará que, si una forma de troponina es un constituyente menor del total, la ausencia o los niveles bajos de detección de esa forma no afectarán apreciablemente a las medidas de la troponina total. Por tanto, como se usa en el presente documento, la "troponina cardiaca total" se refiere a una medición que tiene por objeto medir todas o sustancialmente todas las formas de una troponina cardiaca particular, por ejemplo, toda la cTnI, o toda la cTnT, en una muestra, donde la coherencia muestra a muestra es de manera que se puedan extraer conclusiones clínicamente relevantes de las comparaciones de las muestras con patrones, o de la comparación de una muestra con otra.

En algunos casos, la memoria descriptiva describe métodos y composiciones para la detección y/o determinación de la concentración de una o más de las diversas formas de troponina en la muestra como una entidad separada, por ejemplo, cTnI que forma un complejo, cTnI libre, cTnI turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada), o cTnT que forma un complejo, cTnT libre, cTnT turbia (por ejemplo, oxidada o fosforilada) y, por lo general, puede proporcionar una concentración de esa forma en la muestra. En estos últimos casos, pueden determinarse relaciones o valores absolutos para las diferentes entidades. Por tanto, en algunos casos, la memoria descriptiva describe métodos de detección y, normalmente, de determinación de la concentración de una o más formas de troponina que forma un complejo, o uno o más fragmentos de troponina, o una o más formas oxidadas o fosforiladas de troponina. En algunos casos, se detecta más de una forma y las concentraciones de las diversas formas pueden determinarse, por ejemplo, mediante la realización de múltiples ensayos en una sola muestra para las diferentes entidades, o mediante la realización de ensayos separados en alícuotas a partir de las mismas muestras o similares. Se pueden obtener relaciones de las concentraciones de las diversas formas. Por ejemplo, se puede determinar una relación de la concentración de una forma particular, por ejemplo, un fragmento, complejo, o forma modificada, de la troponina cardiaca con la concentración de la troponina cardiaca total. Estas relaciones y/o valores absolutos pueden proporcionar información clínica significativa. Por ejemplo, la relación relativa de fragmentos de la troponina cardiaca puede indicar el tiempo transcurrido desde la liberación en la sangre y, por tanto, indirectamente, la duración de tiempo desde, por ejemplo, un infarto de miocardio. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 6.991.907.

III. Marcadores para la troponina cardiaca

En algunos casos, la memoria descriptiva describe los métodos y composiciones que incluyen marcadores para la detección altamente sensible y la cuantificación de la troponina cardiaca.

Un experto en la materia reconocerá que muchas de las estrategias se pueden utilizar para moléculas diana marcadas para permitir su detección o discriminación en una mezcla de partículas. Los marcadores se pueden unir por cualquier medio conocido, incluyendo métodos que utilizan las interacciones no específicas o específicas del marcador y diana. Los marcadores pueden proporcionar una señal detectable o afectar a la movilidad de la partícula en un campo eléctrico. Además, la marcación se puede realizar directamente o a través de compañeros de unión.

En algunos casos, el marcador comprende un compañero de unión con la troponina unida a un resto fluorescente.

A. Compañeros de unión para la troponina

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

1. Anticuerpos

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

Se apreciará que la elección del epítipo o región de troponina contra los que se genera el anticuerpo determinará su especificidad, por ejemplo, para la troponina total, para determinados fragmentos, para la troponina que forma un complejo, para la troponina modificada y similares. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de aminoácidos de la troponina cardiaca. En algunos casos, el anticuerpo es específico para los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca humana. Ambos anticuerpos monoclonales y policlonales son útiles como compañeros de unión. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal específico para los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca humana. En algunos casos, este anticuerpo no se ve afectado por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina, y no presentan reacción cruzada con la troponina I del músculo esquelético.

Los métodos para producir anticuerpos están bien establecidos. Las secuencias específicas cardiacas para la troponina I y troponina T se describen en *FEBS Lett.* 270, 57-61 (1990) y *Genomics* 21, 311-316 (1994). Un experto en la materia reconocerá que muchos procedimientos están disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en la materia apreciará también que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también se pueden preparar a partir de la información genética mediante diversos procedimientos (*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)). Los métodos para producir anticuerpos contra las diversas formas de las troponinas que forman un complejo, fragmentos, fosforiladas y oxidadas se desvelan en las Patentes de los Estados Unidos N.º 5.579.687; 6.991.907; y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20050164317. Un péptido sintético compuesto por 14 aminoácidos que imita una secuencia específica de troponina I cardiaca y los métodos utilizados para preparar anticuerpos para el péptido se describen en la Solicitud de la Patente Internacional N.º PCT/US94/05468. Los anticuerpos monoclonales y policlonales contra las troponinas cardiacas libres y que forman un complejo también están disponibles en el mercado (HyTest, HyTest Ltd., Turku Finland; Abcam Inc., Cambridge, MA, EE.UU.; Life Diagnostics, Inc., West Chester, PA, EE.UU.; Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA 01742-3049 EE.UU.; BiosPacific, Emeryville, CA).

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI. El anticuerpo puede ser específico para regiones específicas de la cTnI, por ejemplo, los aminoácidos 27-41 de troponina I cardiaca humana. Pueden utilizarse pares de compañeros de unión de captura y compañeros de unión de detección, por ejemplo, pares de anticuerpos de captura y detección, en los casos que se describen en el presente documento. Por tanto, en algunos casos, se utiliza un protocolo de ensayo heterogéneo en el cual, por lo general, se utilizan dos compañeros de unión, por ejemplo, dos anticuerpos. Un compañero de unión es un compañero de captura, por lo general inmovilizado sobre un soporte sólido y el otro compañero de unión es un compañero de unión de detección, por lo general con un marcador detectable unido. En algunos casos, el elemento de compañero de unión de captura de un par es un anticuerpo que es específico para todas o sustancialmente todas las formas de troponina cardiaca. Un ejemplo es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para troponina I cardiaca (cTnI) libre aa 41-49 y cTnI que forma complejos con otros componentes de troponina. Preferentemente, este anticuerpo no se ve afectado por la formación de complejos de troponina, la heparina, la fosforilación y la oxidación, y no presentan reacción cruzada con troponina I del músculo esquelético. Por tanto, se piensa que el anticuerpo se une a una cTnI total. Otro ejemplo es un anticuerpo monoclonal, específico para a.a. 87-91 de la troponina I cardiaca (cTnI) y no presenta reacción cruzada con la troponina I del músculo esquelético. Dichos anticuerpos están disponibles de BiosPacific, Emeryville, CA. Se conocen o pueden diseñarse otros pares de anticuerpos.

Anticuerpos de reacción cruzada En algunos casos es útil usar un anticuerpo que reaccione de forma cruzada con una diversidad de especies ya sea como un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección, o ambas cosas. Dichos casos incluyen la medición de la toxicidad del fármaco determinando, por ejemplo, la liberación de troponina

cardiaca en la sangre como marcador de daño cardiaco. Un anticuerpo de reacción cruzada permite que se hagan estudios de toxicidad en una especie, por ejemplo, una especie no humana y la transferencia directa de los resultados para estudios u observaciones clínicas de otra especie, por ejemplo, seres humanos, utilizando el mismo anticuerpo o par de anticuerpos en los reactivos de los ensayos, disminuyendo de este modo la variabilidad entre ensayos. Por tanto, en algunos casos, uno o más de los anticuerpos para su uso como un compañero de unión con el marcador, por ejemplo, la troponina cardiaca, tal como la troponina I cardiaca, puede ser un anticuerpo de reacción cruzada. En algunos casos, el anticuerpo reacciona de forma cruzada con el marcador, por ejemplo, troponina cardiaca, a partir de al menos dos especies seleccionadas entre el grupo que consiste en ser humano, mono, perro y ratón. En algunos casos el anticuerpo reacciona de forma cruzada con el marcador, por ejemplo, troponina cardiaca, de entre todo el grupo que consiste en ser humano, mono, perro y ratón.

B. Restos fluorescentes para ser utilizadas con compañeros de unión

En algunos casos, el compañero de unión, por ejemplo, el anticuerpo, se une a un resto fluorescente. La fluorescencia del resto será suficiente para permitir la detección en un detector de una única molécula, tal como los detectores de una única molécula que se describen en el presente documento. Una "resto fluorescente", como se usa esa expresión en el presente documento, incluye una o más entidades fluorescentes cuya fluorescencia total es de manera que el resto se pueda detectar en los detectores de una única molécula que se describen en el presente documento. Por tanto, un resto fluorescente puede comprender una única entidad (por ejemplo, un punto cuántico o molécula fluorescente) o una pluralidad de entidades (por ejemplo, una pluralidad de moléculas fluorescentes). Se apreciará que cuando "resto", como se usa ese término en el presente documento, se refiere a un grupo de entidades fluorescentes, por ejemplo, una pluralidad de moléculas de colorante fluorescente, cada entidad individual puede estar unida al compañero de unión por separado o las entidades pueden ser unidas entre sí, siempre y cuando las entidades como un grupo proporcionen suficiente fluorescencia para ser detectadas.

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

Además, el resto tiene propiedades que son coherentes con su uso en el ensayo de elección. En algunos casos, el ensayo es un inmunoensayo, donde el resto fluorescente se une a un anticuerpo; el resto debe tener propiedades de manera que no se agregue con otros anticuerpos o proteínas, o no experimente más agregación que la que es coherente con la exactitud y la precisión requerida del ensayo. En algunos casos, los restos fluorescentes que se prefieren son los restos fluorescentes, por ejemplo, moléculas de colorante que tienen una combinación de 1) coeficiente de absorción alto; 2) rendimiento cuántico alto; 3) fotoestabilidad alta (fotoblanqueo bajo); y 4) compatibilidad con la marcación de la biomolécula de interés (por ejemplo, proteína) de manera que se pueda analizar usando los analizadores y sistemas que se describen en el presente documento (por ejemplo, no causa la precipitación de la proteína de interés, o la precipitación de una proteína a la que se ha unido el resto).

Los restos fluorescentes, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorante fluorescente, que son útiles en algunos casos que se describen en el presente documento pueden definirse en términos de sus características de emisión de fotones cuando son estimulados por la radiación EM. Por ejemplo, algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000, fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Se apreciará que la energía total se puede conseguir por muchas diferentes combinaciones de potencia de salida del láser y la duración del tiempo de exposición del resto de colorante. Por ejemplo, un láser de una potencia de salida de 1 mW se puede utilizar durante 3 ms, 3 mW durante 1 ms, 6 mW durante 0,5 ms, 12 mW durante 0,25 ms y así sucesivamente.

En algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 100 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 150 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente, por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 300 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan un resto de colorante fluorescente por ejemplo, una única molécula de colorante fluorescente o una pluralidad de moléculas de colorantes fluorescentes, que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 500 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios.

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

60 1. Colorantes

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

casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 75 fotones, cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, donde el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene la molécula y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 100 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, donde el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene la molécula y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 150 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene la molécula y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. Algunos casos utilizan una molécula de colorante fluorescente que es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación de la molécula, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene la molécula y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios.

Una lista no exhaustiva de entidades fluorescentes útiles para su uso en los restos fluorescentes descritos en el presente documento se proporciona en la Tabla 1, a continuación. En algunos casos, la entidad fluorescente se selecciona entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 647, 700, 750, fluoresceína, B-ficoeritrina, alofococianina, PBXL-3 y Qdot 605.

TABLA 1
ENTIDADES FLUORESCENTES

Colorante	Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	Pm
Bímmano	380	5,700	458	282,31
Dapoxil	373	22.000	551	362,83
Ácido dimetilamino cumarina-4-acético	375	22.000	470	344,32
Azul de marina	365	19.000	460	367,26
Ácido 8-anilino naftaleno-1-sulfónico	372		480	
azul Cascada	376	23.000	420	607,42
Alexa Fluor 405	402	35.000	421	1028,26
azul Cascada	400	29.000	420	607,42
Amarillo Cascada	402	24.000	545	563,54
Azul Pacífico	410	46.000	455	339,21
PyMPO	415	26.000	570	582,41
Alexa 430	433	15.000	539	701,75
Atto-425	438		486	
NBD	465	22.000	535	391,34
Alexa 488	495	73.000	519	643,41
Fluoresceína	494	79.000	518	376,32
Oregon Green 488	496	76.000	524	509,38
Atto 495	495		522	
Cy2	489	150.000	506	713,78
DY-480-XL	500	40.000	630	514,60
DY-485-XL	485	20.000	560	502,59
DY-490-XL	486	27.000	532	536,58
DY-500-XL	505	90.000	555	596,68
DY-520-XL	520	40.000	664	514,60
Alexa Fluor 532	531	81.000	554	723,77
BODIPY 530/550	534	77.000	554	513,31
6-HEX	535	98.000	556	680,07
6-JOE	522	75.000	550	602,34
Rodamina 6G	525	108.000	555	555,59
Atto-520	520		542	
Cy3B	558	130.000	572	658,00
Alexa Fluor 610	612	138.000	628	
Alexa Fluor 633	632	159.000	647	aprox. 1200
Alexa Fluor 647	650	250.000	668	aprox. 1250
BODIPY 630/650	625	101.000	640	660,50
Cy5	649	250.000	670	791,99
Alexa Fluor 660	663	110.000	690	
Alexa Fluor 680	679	184.000	702	
Alexa Fluor 700	702	192.000	723	

ES 2 703 813 T3

Colorante	Ex (nm)	E (M)-1	Em (nm)	Pm
Alexa Fluor 750	749	240.000	782	
B-ficoeritrina	546.565	2.410.000	575	240.000
R-ficoeritrina	480.546.565	1.960.000	578	240.000
Alofocianina	650	700.000	660	700.000
PBXL-1	545		666	
PBXL-3	614		662	

Colorantes Atto-tec

Nombre	Ex (nm)	Em (nm)	QY	h (ns)
Atto 425	436	486	0,9	3,5
Atto 495	495	522	0,45	2,4
Atto 520	520	542	0,9	3,6
Atto 560	561	585	0,92	3,4
Atto 590	598	634	0,8	3,7
Atto 610	605	630	0,7	3,3
Atto 655	665	690	0,3	1,9
Atto 680	680	702	0,3	1,8

Flúores Dyomics

Etiqueta	Ex(nm)	Absorbancia molar * [l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹]	Em (nm)	peso molecular # [g · mol ⁻¹]
DY-495/5	495	70.000	520	489,47
DY-495/6	495	70.000	520	489,47
DY-495X/5	495	70.000	520	525,95
DY-495X/6	495	70.000	520	525,95
DY-505/5	505	85.000	530	485,49
DY-505/6	505	85.000	530	485,49
DY-505X/5	505	85.000	530	523,97
DY-505X/6	505	85.000	530	523,97
DY-550	553	122.000	578	667,76
DY-555	555	100.000	580	636,18
DY-610	609	81.000	629	667,75
DY-615	621	200.000	641	578,73
DY-630	636	200.000	657	634,84
DY-631	637	185.000	658	736,88
DY-633	637	180.000	657	751,92
DY-635	647	175.000	671	658,86
DY-636	645	190.000	671	760,91
DY-650	653	170.000	674	686,92

Etiqueta	Ex(nm)	Absorbancia molar * [l · mol ⁻¹ · cm ⁻¹]	Em (nm)	peso molecular # [g · mol ⁻¹]
DY-651	653	160.000	678	888,96
DYQ-660	660	117.000	-	668,86
DYQ-661	661	116.000	-	770,90
DY-675	674	110.000	699	706,91
DY-676	674	145.000	699	807,95
DY-680	690	125.000	709	634,84
DY-681	691	125.000	708	736,88
DY-700	702	96.000	723	668,86
DY-701	706	115.000	731	770,90
DY-730	734	185.000	750	660,88
DY-731	736	225.000	759	762,92
DY-750	747	240.000	776	712,96
DY-751	751	220.000	779	814,99
DY-776	771	147.000	801	834,98
DY-780-OH	770	70.000	810	757,34
DY-780-P	770	70.000	810	957,55
DY-781	783	98.000	800	762,92
DY-782	782	102.000	800	660,88
EVOblue-10	651	101,440	664	389,88
EVOblue-30	652	102.000	672	447,51

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

5

Los colorantes adecuados para su uso como se describe en el presente documento incluyen colorantes de carbocianina modificados. La modificación de colorantes de carbocianina incluye la modificación de un anillo de

indolio del colorante de carbocianina para permitir un grupo reactivo o sustancia conjugada en la posición número 3. La modificación del anillo de indolio proporciona conjugados de colorantes que son de manera uniforme y sustancialmente más fluorescentes en las proteínas, ácidos nucleicos y otros biopolímeros, que los conjugados marcados con colorantes de carbocianina estructuralmente similares unidos a través del átomo de nitrógeno en la posición número uno. Además de tener una emisión de fluorescencia más intensa que los colorantes estructuralmente similares a longitudes de onda prácticamente idénticas y la disminución de artefactos en sus espectros de absorción sobre la conjugación con biopolímeros, los colorantes de carbocianina modificados tienen mayor fotoestabilidad y una absorbancia superior (coeficientes de extinción) en las longitudes de onda de absorbancia máxima que los colorantes de estructura similar. Por tanto, los colorantes de carbocianina modificados dan como resultado una mayor sensibilidad en los ensayos que utilizan los colorantes modificados y sus conjugados. Los colorantes modificados preferidos incluyen compuestos que tienen al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o una sustancia conjugada. Otros compuestos colorantes incluyen compuestos que incorporan un resto del anillo azabenzazolio y al menos un resto sulfonato. Los colorantes de carbocianina modificados que se pueden utilizar para detectar partículas únicas en diversos casos que se describen en el presente documento se describen en la Patente de los Estados Unidos 6.977.305. Por tanto, en algunos casos los marcadores descritos en el presente documento utilizan un colorante fluorescente que incluye un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas.

En algunos casos, el marcador comprende un resto fluorescente que incluye uno o más colorantes Alexa (Molecular Probes, Eugene, OR). Los colorantes Alexa se desvelan en las Patentes de los Estados Unidos 6.977.305; 6.974.874; 6.130.101; y 6.974.305. Algunos casos utilizan un colorante seleccionado entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750. Algunos casos utilizan un colorante seleccionado entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750. Algunos casos utilizan la molécula de Alexa Fluor 647, que tiene un máximo de absorción entre aproximadamente 650 y 660 nm y un máximo de emisión entre aproximadamente 660 y 670 nm. El colorante Alexa Fluor 647 se usa solo o en combinación con otros colorantes Alexa Fluor.

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

2. Puntos cuánticos

En algunos casos, el resto marcador fluorescente que se utiliza para detectar una molécula en una muestra usando los sistemas de análisis que se describen en el presente documento es un punto cuántico. Los puntos cuánticos (QD, por sus siglas en inglés), también conocidos como nanocristales semiconductores o átomos artificiales, son cristales de semiconductores que contienen cualquier cantidad entre 100 a 1.000 electrones y oscilan de 2-10 nm. Algunos QD pueden tener entre 10-20 nm de diámetro. Los QD tienen altos rendimientos cuánticos, que los hace particularmente útiles para aplicaciones ópticas. Los QD son fluoróforos que presentan fluorescencia mediante la formación de excitones, que se pueden considerar del estado excitado de fluoróforos tradicionales, pero tienen una vida útil mucho más larga de hasta 200 nanosegundos. Esta propiedad ofrece QD con un fotoblanqueo bajo. El nivel de energía de los QD se puede controlar cambiando el tamaño y la forma del QD y la profundidad del potencial de los QD. Una de las características ópticas de QD excitónicos pequeños es la coloración, que se determina por el tamaño del punto. Cuanto mayor sea el punto, es más rojo, o más hacia el extremo rojo del espectro de la fluorescencia. Cuanto más pequeño sea el punto, más azul o más hacia el extremo azul está. La energía de banda prohibida que determina la energía y por tanto el color de la luz fluorescente es inversamente proporcional al cuadrado del tamaño del QD. Los QD más grandes tienen más niveles de energía están estrechamente espaciados, lo que permite al QD absorber fotones que contienen menos energía, es decir, aquellos más cerca del extremo rojo del espectro. Debido a que la frecuencia de emisión de unos puntos depende de la banda prohibida, por tanto, es posible controlar la longitud de onda de salida de un punto con una precisión extrema. En algunos casos, la proteína que se detecta con el sistema de análisis de una partícula única está marcada con un QD. En algunos casos, el analizador de partícula única se utiliza para detectar una proteína marcada con un QD y el uso de un filtro para permitir la detección de diferentes proteínas en diferentes longitudes de onda. Los QD tienen una amplia excitación y propiedades de emisión estrechas que cuando se utiliza con filtración del color requieren solo una única fuente electromagnética para el análisis múltiple de múltiples dianas en una única muestra para resolver señales individuales. Por tanto, en algunos casos, el sistema de análisis comprende un láser de onda continua y partículas que están cada una marcada con un solo QD. Los QD preparados de forma coloidal son de libre flotación y se puede

unir a una diversidad de moléculas a través de grupos funcionales de coordinación de metal. Estos grupos incluyen, pero no se limitan a tiol, amina, nitrilo, fosfina, óxido de fosfina, ácido fosfónico, ácidos carboxílicos u otros ligandos. Mediante la unión de moléculas adecuadas a la superficie, los puntos cuánticos se pueden dispersar o disolver en casi cualquier disolvente o incorporar en una diversidad de películas inorgánicas y orgánicas. Los puntos cuánticos (QD) pueden acoplarse a estreptavidina directamente a través de una reacción de acoplamiento de éster de maleimida o a anticuerpos a través de una reacción de acoplamiento maleimida-tiol. Esto produce un material con una biomolécula unida covalentemente en la superficie, que produce conjugados con actividad específica alta. En algunos casos, la proteína que se detecta con el analizador de partícula única se marca con un punto cuántico. En algunos casos el punto cuántico tiene entre 10 y 20 nm de diámetro. En otros casos, el punto cuántico tiene entre 2 y 10 nm de diámetro. Los puntos cuánticos útiles incluyen QD 605, QD 610, QD 655 y QD 705. Un punto cuántico preferido particularmente es QD 605.

C. Composiciones de compañero de unión-resto fluorescente (marcadores)

Los marcadores descritos en el presente documento contienen generalmente un compañero de unión, por ejemplo, anticuerpo, unido a un resto fluorescente para proporcionar la fluorescencia requisito para la detección y cuantificación en los instrumentos que se describen en el presente documento. Cualquier combinación adecuada de compañero de unión y resto fluorescente en los detectores de una única molécula descrita en el presente documento se pueden usar como un marcador como se describe en el presente documento. Algunos casos proporcionan un marcador para una molécula de troponina cardiaca, o fragmento, complejo, forma fosforilada u oxidada de la misma, donde el marcador incluye un anticuerpo a una troponina cardiaca y un resto fluorescente. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, un anticuerpo para cTnT o cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo para cTnI. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de la troponina cardiaca, por ejemplo, específica a los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan composiciones que comprenden un resto fluorescente unida a un anticuerpo anti-cTnI, por ejemplo, un anticuerpo policlonal tal como un anticuerpo policlonal de cabra de los designados G129C disponible de BiosPacific, Emeryville. Un resto fluorescente puede estar unido de manera que el marcador sea capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000, fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser en la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el marcador y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser no sea de más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos, el resto fluorescente puede ser un resto fluorescente que sea capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 50, 100, 150, o 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, donde el láser se centra en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser no sea de más de aproximadamente 3 microjulios. El resto fluorescente puede ser un resto fluorescente que incluya una o más moléculas de colorante con una estructura que incluye un sistema de anillo de indolio sustituido en el cual el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancias conjugadas. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 647, 700, o 750. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 700, o 750. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 488. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 555. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 610. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 647. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 680. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 700. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 750.

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

anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 2 a 10 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 2 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 2 a 6 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 2 a 4 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 3 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 3 a 6 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana. Algunos casos proporcionan una composición para la detección de la troponina I cardiaca que incluye un promedio de aproximadamente 4 a 8 moléculas de Alexa Fluor 647, molécula unida a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de cabra anti-cTnI, específico para los aminoácidos 27-41 de cTnI humana.

La unión del resto fluorescente, o entidades fluorescentes que componen el resto fluorescente, con el compañero de unión, por ejemplo, anticuerpo, puede ser por cualquier medio adecuado; dichos métodos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan métodos de ejemplo en los Ejemplos. En algunos casos, después de la unión del resto fluorescente con el compañero de unión para formar un marcador para su uso en los métodos que se describen en el presente documento y antes de la utilización del marcador para la marcación de la proteína de interés, es útil realizar una etapa de filtración. Por ejemplo, un marcador de anticuerpo-colorante se puede filtrar antes de su uso, por ejemplo, a través de un filtro de 0,2 micrómetros, o cualquier filtro adecuado para la retirada de los agregados. Otros reactivos para su uso en los ensayos que se describen en el presente documento también se pueden filtrar, por ejemplo, a través de un filtro de 0,2 micrómetros, o cualquier filtro adecuado. Sin pretender quedar ligado a ninguna teoría, se cree que dicha filtración retira una parte de los agregados de, por ejemplo, los marcadores anticuerpo-colorante. Como dichos agregados se unirán como una unidad a la proteína de interés, pero tras la liberación en tampón de elución probablemente se disgreguen, pueden dar como resultado positivos falsos; es decir, se detectarán varios marcadores a partir de un agregado que se ha unido a una única molécula de proteína de interés. Independientemente de la teoría, se ha encontrado que la filtración reduce los falsos positivos en el ensayo posterior y mejora la exactitud y precisión.

IV. Análisis de alta sensibilidad de troponina cardiaca

La memoria descriptiva proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de una única molécula de troponina cardiaca o un fragmento o complejo de la misma en una muestra, mediante i) la marcación de la molécula, fragmento, o complejo, si está presente, con un marcador; y ii) la detección de la presencia o ausencia del marcador, donde la detección de la presencia del marcador indica la presencia de la única molécula, fragmento, o complejo de troponina cardiaca en la muestra. Como se usa en el presente documento, "molécula de troponina cardiaca" incluye una molécula que contiene sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de origen natural del tipo particular de troponina cardiaca, incluyendo formas modificadas después de la traducción, por ejemplo, formas fosforiladas, así como formas oxidadas o alteradas químicamente de otra manera. Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de una molécula incluye una molécula de troponina cardiaca que contiene menos de la secuencia de aminoácidos de origen natural completa, incluyendo modificaciones en cuanto a la molécula completa. Como se usa en el presente documento, un "complejo" de una molécula de troponina cardiaca incluye una molécula de troponina cardiaca o un fragmento que se asocia a una o más otras moléculas o sustancias, por ejemplo, que se asocia a una o más otras moléculas de troponina cardiaca. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 100 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 50 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 20 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 10 pg/ml. El método reivindicado es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 5 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 3 pg/ml. En algunos casos, el método es capaz de detectar la troponina en un límite de detección de menos de aproximadamente 1 pg/ml. Los límites de detección se pueden determinar mediante el uso del material patrón de referencia adecuado del Instituto Nacional de Patrones y de Tecnología, por ejemplo, cTnI patrón.

En el presente documento se proporcionan métodos para determinar una concentración de troponina cardiaca en

una muestra mediante la detección de moléculas únicas de la troponina en la muestra. La "detección" de una única molécula de troponina incluye la detección de la molécula directamente o indirectamente. En el caso de detección indirecta, pueden determinarse marcadores que corresponden a moléculas únicas de troponina cardiaca, por ejemplo, un marcador que se ha unido a las moléculas únicas de troponina cardiaca.

5 En dichos casos, los tipos de troponina cardiaca para la detección son como se describen en el presente documento, por ejemplo, cTnT, cTnI, la troponina cardiaca total (por ejemplo, cTnI total o cTnT total) o libre, que forma un complejo, o fragmentos de la troponina cardiaca.

10 A. Muestra

La muestra puede ser cualquier muestra adecuada. Por lo general, la muestra es una muestra biológica, por ejemplo, un fluido biológico. Dichos fluidos incluyen, sin limitación, condensado de aire exhalado (EBC, por sus siglas en inglés), líquido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), sangre, suero, plasma, orina, 15 líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, líquido gástrico, líquido linfático, líquido intersticial, homogeneizado de tejido, extractos de células, saliva, esputo, heces, secreciones fisiológicas, lágrimas, moco, sudor, leche, semen, líquido seminal, secreciones vaginales, líquido de úlceras y otras erupciones superficiales, ampollas y abscesos, y extractos de tejidos, incluyendo biopsias de tejidos normales, malignas y sospechosas o cualesquier otros constituyentes del cuerpo que pueden contener la partícula diana de 20 interés. También son de interés otras muestras similares, tales como cultivo de células o tejidos o caldo de cultivo.

La muestra de acuerdo con el método reivindicado es suero humano.

25 B. Preparación de la muestra

En general, puede usarse cualquier método de preparación de la muestra para producir un marcador que corresponde a una molécula de troponina cardiaca que se desea medir, donde el marcador es detectable en los instrumentos que se describen en el presente documento. Como se conoce en la técnica, la preparación de 30 muestras en la que se añade un marcador a una o más partículas se puede realizar en un formato homogéneo o heterogéneo. En algunos casos, la preparación de la muestra se establece en un formato homogéneo. En el sistema de análisis que emplea un formato homogéneo, el marcador no unido no se retira de la muestra. Véase, por ejemplo, la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1. En algunos casos, la partícula o partículas de interés se marcan mediante la adición de anticuerpo o anticuerpos 35 marcados que se unen a la partícula o partículas de interés.

En algunos casos, se utiliza un formato de ensayo heterogéneo, donde, por lo general, se emplea una etapa para retirar el marcador no unido. Dichos formatos de ensayo son bien conocidos en la técnica. Un formato de ensayo particularmente útil es un ensayo de tipo sándwich, por ejemplo, un inmunoensayo de tipo sándwich. En este formato, la molécula de interés, por ejemplo, marcador de un estado biológico, es capturado, por ejemplo, sobre un 40 soporte sólido, utilizando un compañero de unión de captura. Después, las moléculas no deseadas y otras sustancias pueden lavarse opcionalmente, seguido de la unión de un marcador que comprende un compañero de unión de detección y un marcador detectable, por ejemplo, resto fluorescente. Otros lavados retiran el marcador no unido, después se libera el marcador detectable, por lo general, aunque no necesariamente todavía unido al compañero de unión de detección. En casos alternativos, se añaden la muestra y el marcador al compañero de 45 unión de captura sin un lavado entre medias, por ejemplo, al mismo tiempo. Otras variaciones serán evidentes para un experto en la materia.

En algunos casos, el método para la detección de partículas de troponina utiliza un ensayo de tipo sándwich con anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales como compañeros de unión de captura. El método comprende 50 la unión de moléculas de troponina en una muestra con un anticuerpo de captura que está inmovilizado en una superficie de unión y la unión del anticuerpo de detección con la molécula de troponina para formar un complejo "de tipo sándwich". El anticuerpo de detección comprende un marcador fluorescente detectable, como se describe en el presente documento, que se detecta, por ejemplo, usando los analizadores de una única molécula que se describen en el presente documento. Tanto los anticuerpos de captura como los de detección se unen específicamente a la 55 troponina. Se conocen muchos ejemplos de inmunoensayos de tipo sándwich y algunos se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.168.146 de Grubb et al. y la Patente de los Estados Unidos N.º 4.366.241 de Tom et al. Otros ejemplos específicos para la troponina cardiaca se describen en los Ejemplos.

El compañero de unión de captura puede estar unido a un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o 60 perlas paramagnéticas. En algunos casos, se describe un compañero de unión para una troponina cardiaca unido a una perla paramagnética. Se puede utilizar cualquier compañero de unión adecuado que es específico para el tipo de troponina cardiaca que se desea capturar. El compañero de unión puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser específico para troponina cardiaca (cTnI o cTnT) libre o para la troponina cardiaca que forma complejo, troponina cardiaca modificada, o fragmentos de la troponina cardiaca, como 65 se describe en el presente documento, o específico a todas o prácticamente todas las formas de troponina cardiaca, por ejemplo, cTnI o cTnT, que probablemente se encuentran en la muestra de interés. La producción y fuentes de

anticuerpos para la troponina cardiaca se describen en el presente documento. Los anticuerpos preferidos para medir la troponina total son aquellos que no se ven afectados sustancialmente por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina y que no presentan reacción cruzada con troponina del músculo esquelético, por ejemplo, la troponina I. En algunos casos, el anticuerpo es específico para una región específica de una troponina cardiaca. En algunos casos, la región incluye los aminoácidos 41 - 49 de la troponina I cardiaca humana. En algunos casos, la región incluye los aminoácidos 87-91 de la troponina I cardiaca humana. Dichos anticuerpos son bien conocidos en la técnica y están disponibles en, por ejemplo, BiosPacific, Emeryville, CA. Un ejemplo de un anticuerpo de captura útil en los casos de la invención es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que reacciona con los 41-49 de la troponina I cardiaca (cTnI) libre y cTnI formar complejos con otros componentes de troponina. Preferentemente, este anticuerpo no se ve afectado por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina y no presentan reacción cruzada con troponina del músculo esquelético I. Un anticuerpo a modo de ejemplo de este tipo es el Clon de Anticuerpo Monoclonal Número A34650228P, disponible de BiosPacific, Emeryville, CA. Otro ejemplo de un anticuerpo de captura útil en los casos de la invención es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, que reacciona con los aa 87-91 de la troponina I cardiaca (cTnI) libre y cTnI que forma complejos con otros componentes de troponina. Preferentemente, este anticuerpo no se ve afectado por la heparina, la fosforilación, la oxidación y la formación de complejos de troponina y no presenta reacción cruzada con la troponina I del músculo esquelético. Un anticuerpo a modo de ejemplo de este tipo es el Clon de Anticuerpo Monoclonal Número A34440228P, disponible de BiosPacific, Everyville, CA. Se apreciará que los anticuerpos identificados en el presente documento, tan útiles como un anticuerpo de captura también pueden ser útiles como anticuerpos de detección y viceversa.

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

Un protocolo de ejemplo para la unión orientada de un anticuerpo a un soporte sólido es de la siguiente manera: IgG se disuelve en tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 a una concentración final de 1 mg/ml. Se añade un volumen igual de peryodato de sodio 20 mM enfriado con hielo en acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5. La IgG se deja oxidar durante ½ hora en hielo. El exceso de reactivo de peryodato se inactivó mediante la adición de un volumen de 0,15 de glicerol 1 M. Los subproductos de bajo peso molecular de la reacción de oxidación se retiran por ultrafiltración. La fracción de IgG oxidada se diluyó a una concentración adecuada (por lo general de 0,5 microgramos de IgG por ml) y se hizo reaccionar con placas de múltiples pocillos activadas con hidrazina durante al menos dos horas a temperatura ambiente. La IgG sin unir se retira por medio del lavado de la placa de múltiples pocillos con solución salina tamponada con borato u otro tampón adecuado. La placa se puede secar durante el almacenamiento, si se desea. Un protocolo similar se puede seguir para micropelras si el material de la micropelra es adecuado para dicha unión.

En algunos casos, el soporte sólido es una placa de microtitulación. En algunos casos, el soporte sólido es una perla paramagnética. Una perla paramagnética de ejemplo es la estreptavidina C1 (Dynal, 650,01-03). Otras perlas adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Los métodos para la unión de anticuerpos con las perlas paramagnéticas son bien conocidos en la técnica. En los Ejemplos se proporciona una ilustración.

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

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

compañero de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 30 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el compañero de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 20 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el compañero de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 15 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el compañero de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 10 minutos. En algunos casos, el tiempo permitido para la unión de la proteína de interés con el compañero de unión de captura, por ejemplo, anticuerpo, es menos de aproximadamente 5 minutos.

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

Algunos reactivos de diagnóstico de inmunoensayo incluyendo los anticuerpos de captura y de señal utilizados para medir los analitos diana se pueden derivar de los sueros de animales. Los anticuerpos heterófilos humanos endógenos, o anticuerpos anti-humanos de animales, que tienen la capacidad de unirse a las inmunoglobulinas de otras especies, están presentes en el suero o plasma de más del 10 % de los pacientes. Estos anticuerpos heterófilos circulantes pueden interferir con las mediciones de inmunoensayo. En inmunoensayos de tipo sándwich, estos anticuerpos heterófilos pueden tender un puente de los anticuerpos de captura y detección (diagnóstico), produciendo de este modo una señal de falsos positivos, o pueden bloquear la unión de los anticuerpos de diagnóstico, produciendo de ese modo una señal de falsos negativos. En inmunoensayos competitivos, los anticuerpos heterófilos se pueden unir al anticuerpo analítico e inhibir su unión a la troponina. También se pueden ya sea bloquear o aumentar la separación del complejo de troponina-anticuerpo de la troponina libre, especialmente cuando se utilizan anticuerpos antiespecies en los sistemas de separación. Por tanto, el impacto de estas interferencias de anticuerpos heterófilos es difícil de predecir. Por tanto, sería ventajoso bloquear la unión de cualquier anticuerpo heterófilo. En algunos casos, el inmunoensayo incluye la etapa de caída de la muestra de anticuerpos heterófilos usando uno o más bloqueadores de anticuerpos heterófilos. Los métodos para la eliminación de anticuerpos heterófilos a partir de muestras que se van a probar en inmunoensayos son conocidos e incluyen: el calentamiento de la muestra en un tampón de acetato de sodio, pH 5,0, durante 15 minutos a 90 °C y centrifugación a 1200g durante 10 minutos, o los anticuerpos heterófilos se pueden precipitar utilizando polietilenglicol (PEG); inmunoeextracción de la interferencia de las inmunoglobulinas heterófilas a partir de la muestra utilizando la proteína A o proteína G; o la adición de IgG de ratón no inmune. Los casos de los métodos que se describen en el presente documento contemplan la preparación de la muestra antes del análisis con el detector de única molécula. La idoneidad del método de tratamiento previo se puede determinar. Los productos bioquímicos para minimizar la interferencia del inmunoensayo causada por los anticuerpos heterófilos están disponibles en el mercado. Por ejemplo, un producto llamado MAK33, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 para h-CK-MM, se puede obtener de Boehringer Mannheim. El producto MAK33 plus contiene una combinación de IgG1 e IgG1-Fab. El polyMAK33 contiene IgG1-Fab polimerizada con IgG1 y el Polymac 2b/2a contiene IgG2a-Fab polimerizada con IgG2b. Una segunda fuente comercial de productos bioquímicos para neutralizar los anticuerpos heterófilos es un reactivo inhibidor de la inmunoglobulina comercializado por Bioreclamation Inc, East Meadow, NY. Este producto es una preparación de inmunoglobulinas (IgG e IgM) de múltiples especies, principalmente IgG2a murino, IgG2b, e IgG3 de ratones Balb/c. En algunos casos el anticuerpo heterófilo puede ser inmunoextraído de la muestra utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, agotar la muestra del anticuerpo heterófilo mediante la unión del anticuerpo que interfiere con la proteína A o G. En algunos casos, el anticuerpo heterófilo se neutraliza usando uno o más bloqueadores de anticuerpos heterófilos. Los bloqueadores de los heterófilos se pueden seleccionar entre el grupo que consiste de bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-isotipo, bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-idiotipo y bloqueadores de anticuerpos heterófilos anti-anti-idiotipo. En algunos casos se puede utilizar una

combinación de bloqueadores de anticuerpos heterófilos.

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

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

Después, el marcador se eluye de la proteína de interés. Los tampones de elución preferidas son eficaces en la liberación del marcador sin generar un fondo significativo. También es útil si el tampón de elución es bacteriostático. Los tampones de elución de uso incluyen un agente caotrópico, por ejemplo, urea o un compuesto de guanidinio; una tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con borato; un transportador de proteína, por ejemplo, una albúmina, tal como albúmina humana, bovina, o pescado, o una IgG, para recubrir la pared del tubo capilar en el instrumento de detección; y un tensioactivo, por ejemplo, un detergente iónico o no iónico, seleccionado de manera que produzca un fondo relativamente bajo, por ejemplo, Tween 20, Triton X-100, o SDS.

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

En otro ejemplo, el ensayo de unión en fase sólida puede emplear un formato de ensayo de unión competitiva. Uno de dichos métodos comprende a) unión competitiva con un anticuerpo de captura inmovilizado sobre una superficie de unión i) una partícula de troponina en una muestra y ii) un análogo marcado de la partícula de troponina que comprende un marcador detectable (el reactivo de detección) y b) medir la cantidad del marcador utilizando un analizador de partícula única. Otro de dichos métodos comprende a) unión competitiva con un anticuerpo que tiene un marcador detectable (el reactivo de detección) i) una partícula de troponina en una muestra y ii) un análogo de la partícula de troponina que está inmovilizado sobre una superficie de unión (el reactivo de captura) y b) medir la cantidad del marcador utilizando un analizador de partícula única. Un "análogo de una troponina" se refiere, en el presente documento, a una especie que compite con la troponina por la unión con un anticuerpo de captura. Ejemplos de inmunoensayos competitivos se describen en la Patente de los Estados Unidos N.º 4.235.601 de Deutsch et al., la Patente de los Estados Unidos N.º 4.442.204 de Liotta y la Patente de los Estados Unidos N.º 5,208,53 de Buechler et al.

C. Detección de la troponina y determinación de la concentración

Después de la elución, el marcador se hace pasar a través de un detector de una única molécula en, por ejemplo, el tampón de elución. Una muestra en procesamiento puede contener no marcador, un solo marcador o una pluralidad de marcadores. El número de marcadores corresponde o es proporcional (si se utilizan diluciones de muestras o restos) al número de moléculas de troponina cardíaca capturada durante la etapa de captura.

Puede utilizarse cualquier detector adecuado de una única molécula capaz de detectar el marcador utilizada con la proteína de interés. Los detectores adecuados de una única molécula se describen en el presente documento. Normalmente, el detector será parte de un sistema que incluye un muestreador automático para el muestreo de las muestras preparadas y, opcionalmente, un sistema de recuperación para recuperar las muestras.

En algunos casos, la muestra en procesamiento se analiza en un analizador de molécula única que utiliza un sistema de flujo capilar y que incluye una célula de flujo capilar, un láser para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, un detector para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una fuente de fuerza motriz para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación. En algunos casos, el analizador de molécula única comprende además una lente objetivo del microscopio que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación, por ejemplo, una alta abertura numérica del objetivo del microscopio. En algunos casos, el láser y el detector están en una configuración confocal. En algunos casos, el láser es un láser de onda

continua. En algunos casos, el detector es un detector de fotodiodos en avalancha. En algunos casos, la fuente de fuerza motriz es una bomba para proporcionar la presión. Algunos casos proporcionan un sistema de análisis que incluye un sistema de muestreo capaz de muestrear automáticamente una pluralidad de muestras proporcionando una comunicación del líquido entre un recipiente de muestra y el espacio de interrogación. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,001 y 500 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 100 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 10 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 5 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 0,5 pl, o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 300 pl, o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 50 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 5 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 0,5 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 2 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 50 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 5 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 0,5 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 0,2 pl, o entre aproximadamente 0,1 pl y aproximadamente 25 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,004 pl y 100 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,02 pl y 50 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,001 pl y 10 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,001 pl y 10 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,01 pl y 5 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 5 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,05 pl y 5 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,05 pl y 10 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,5 pl y aproximadamente 5 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 0,5 pl.

En algunos casos, el detector de molécula única utilizado en los métodos que se describen en el presente documento utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una célula de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 50 pl. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos de la invención utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una célula de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0,8, un detector de fotodiodos en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0,004 pl y aproximadamente 100 pl. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos que se describen en el presente documento utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una célula de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0,8, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 10 pl. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos que se describen en el presente documento utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una célula de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0,8, un detector de fotodiodo en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 5 pl. En algunos casos, el detector de una única molécula utilizada en los métodos que se describen en el presente documento utiliza un sistema de flujo capilar, e incluye una célula de flujo capilar, un láser de onda continua para iluminar un espacio de interrogación en el capilar a través del cual se hace pasar la muestra en procesamiento, una lente de objetivo del microscopio de alta apertura numérica que recoge la luz emitida desde la muestra en procesamiento a medida que pasa a través del espacio de interrogación en donde la lente tiene una apertura numérica de al menos aproximadamente 0,8, un detector de fotodiodos en avalancha para detectar la radiación emitida desde el espacio de interrogación y una bomba para proporcionar la presión para mover una muestra en procesamiento a través del espacio de interrogación, donde el espacio de interrogación es entre aproximadamente 0,5 pl y aproximadamente 5 pl.

En algunos casos, el detector de una única molécula es capaz de determinar una concentración de una molécula de

interés en una muestra donde la muestra puede variar en concentración en un intervalo de al menos aproximadamente 100 veces, o 1000 veces, o 10.000 veces, o 100.000 veces, o 300.000 veces, o 1.000.000 veces, o 10.000.000 veces, o 30.000.000 veces.

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

35 Los sistemas y detector de única molécula se describen con más detalle a continuación. Otros casos de analizadores de una única molécula útiles en los métodos de la invención, tales como detectores con más de una ventana de interrogación, los detectores utilizan flujo electrocinético o electroforético y similares, se pueden encontrar en la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1.

45 El instrumento se puede lavar entre los ensayos. Se puede utilizar un tampón de lavado que mantiene las concentraciones de sal y de tensioactivo descritas de la muestra, en algunos casos para mantener el acondicionamiento del capilar; es decir, para mantener la superficie del capilar relativamente constante entre las muestras para reducir la variabilidad.

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

65 A pesar de que otros tiempos del intervalo se pueden utilizar, en algunos casos se seleccionan en el intervalo de aproximadamente 1 microsegundo a aproximadamente 5 ms. En algunos casos, el tiempo del intervalo es más de

aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, o 5000 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es menos de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, o 5000 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 1000 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 750 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 40 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1 a 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 a 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 a 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 6 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 7 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 8 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 9 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 10 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 11 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 12 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 13 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 14 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 5 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo descrito es aproximadamente 15 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 16 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 17 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 18 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 19 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 20 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 25 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 30 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 40 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 50 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 100 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 250 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 500 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 750 microsegundos. En algunos casos, el tiempo del intervalo es aproximadamente 1000 microsegundos.

En algunos casos, el nivel de ruido de fondo se determina a partir de la media del nivel de ruido, o la media cuadrática del ruido. En otros casos, se elige un valor de ruido típico que describe un valor estadístico. En la mayoría de los casos, se espera que el ruido siga una distribución de Poisson. Por tanto, en algunos casos, determinar la concentración de un complejo de partículas de marcador en una muestra comprende determinar el nivel de ruido de fondo.

Por tanto, a medida que un marcador fluye a través de la célula de flujo capilar, se irradia mediante el haz de láser para generar una ráfaga de fotones. Los fotones emitidos por el marcador se discriminan de la luz de fondo o emisión de ruido de fondo, considerando que solo las ráfagas de fotones tienen energía por encima de un nivel de energía umbral predeterminado que representa la cantidad de ruido de fondo que está presente en la muestra. El ruido de fondo comprende por lo general baja emisión de frecuencia producida, por ejemplo, por la fluorescencia intrínseca de las partículas no marcadores que están presentes en la muestra, la tampón o diluyente utilizados en la preparación de la muestra para el análisis, la dispersión Raman y el ruido electrónico. En algunos casos, el valor asignado al ruido de fondo se calcula como la media de la señal de ruido de fondo detectado en una pluralidad de intervalos, que son mediciones de las señales de fotones que son detectadas en un espacio de interrogación durante un período de tiempo predeterminado. Así, en algunos casos, el ruido de fondo se calcula para cada muestra como un número específico para esa muestra.

Teniendo en cuenta el valor del ruido de fondo, se puede asignar el nivel de energía de umbral. Como se ha analizado anteriormente, el valor umbral se determina para discriminar señales verdaderas (debido a la fluorescencia de un marcador) del ruido de fondo. Se debe tener cuidado en la elección de un valor de umbral de

manera que, se reduce al mínimo el número de falsas señales positivas de ruido aleatorio, mientras que el número de señales verdaderas que se rechazan también se minimiza. Los métodos para elegir un valor de umbral incluyen determinar un valor fijo por encima del nivel de ruido y calcular un valor de umbral basado en la distribución de la señal de ruido. En un caso, el umbral se fija en un número fijo de desviaciones patrón por encima del nivel de fondo.

5 Suponiendo una distribución de Poisson del ruido, usando este método se puede estimar el número de señales de falsos positivos durante el transcurso de tiempo del experimento. En algunos casos, el nivel de umbral se calcula como un valor de 4 sigma por encima del ruido de fondo. Por ejemplo, dado un nivel medio de ruido de fondo de 200 fotones, el sistema de análisis establece un nivel de umbral de $4\sqrt{200}$ por encima de la media del nivel de fondo/ruido de 200 fotones, que es 256 fotones. Por tanto, en algunos casos, determinar la concentración de un

10 marcador en una muestra incluye establecer el nivel de umbral por encima del cual las señales de fotones representan la presencia de un marcador. Por el contrario, las señales de fotones que tienen un nivel de energía que no es mayor que la del nivel de umbral indican la ausencia de un marcador.

Se toman muchas mediciones de intervalo para determinar la concentración de una muestra y la ausencia o presencia de un marcador se confirma para cada medición de intervalo. Normalmente, 60.000 mediciones o más se pueden hacer en un minuto (por ejemplo, en los casos en los que el tamaño del intervalo es de 1 ms para tamaños del intervalo más pequeños el número de mediciones es proporcionalmente mayor, por ejemplo, 6.000.000 mediciones por minuto para un tamaño intervalo de 10 microsegundos). Por tanto, ninguna medición única es crucial y el método proporciona un alto margen de error. Los intervalos que se determinan como que no contienen un

15 marcador (intervalos "no") se descuentan y solo las mediciones hechas en los intervalos que se determinan como que contienen marcador (intervalos "sí") se cuentan para determinar la concentración del marcador en la muestra en procesamiento. Descontando las mediciones realizadas en el intervalo "no" o intervalos que están desprovistos de marcador, aumenta la relación señal-ruido y la exactitud de las mediciones. Por tanto, en algunos casos, determinar la concentración de un marcador en una muestra comprende detectar las mediciones de intervalo que reflejan la

20 presencia de un marcador.

La relación de señal-ruido o la sensibilidad del sistema de análisis se pueden aumentar minimizando el tiempo que se detecta el ruido de fondo, durante una medición del intervalo en la que se detecta un complejo de partícula-marcador. Por ejemplo, en una medición del intervalo que dura 1 milisegundo, durante el cual se detecta un

30 complejo de partícula-marcador cuando pasa a través de un espacio de interrogación en 250 microsegundos, 750 microsegundos del 1 milisegundo se gastan para detectar la emisión de ruido de fondo. La relación señal-ruido se puede mejorar disminuyendo el tiempo del intervalo. En algunos casos, el tiempo del intervalo es 1 milisegundo. En otros casos, el tiempo del intervalo es de 750, 500, 250 microsegundos, 100 microsegundos, 50 microsegundos, 25 microsegundos o 10 microsegundos. Otros tiempos del intervalo son como se describen en el presente documento.

Otros factores que afectan las medidas son el brillo o penumbra del resto fluorescente, la velocidad de flujo y la potencia del láser. Varias combinaciones de los factores relevantes que permiten la detección del marcador serán evidentes para los expertos en la materia. En algunos casos, el tiempo del intervalo se ajusta sin cambiar la

35 velocidad de flujo. Se apreciará por los expertos en la materia que a medida que disminuye el tiempo del intervalo, la salida de potencia del láser dirigida al espacio de interrogación debe aumentar para mantener una energía total constante aplicada al espacio de interrogación durante el tiempo del intervalo. Por ejemplo, si el tiempo del intervalo se disminuye de 1000 microsegundos a 250 microsegundos, como una primera aproximación, la salida de potencia del láser se debe aumentar aproximadamente cuatro veces. Estos ajustes permiten para la detección del mismo número de fotones en unos 250 ms como el número de fotones contados durante los 1000 ms, dados los ajustes

40 anteriores y permiten un análisis más rápido de la muestra con menores fondos y por tanto una mayor sensibilidad. Además, las velocidades de flujo se pueden ajustar con el fin de acelerar el procesamiento de la muestra. Estos números son meramente ejemplares y el profesional experto puede ajustar los parámetros según sea necesario para lograr el resultado deseado.

En algunos casos, el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de la corriente de muestra. Cuando el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de la corriente de muestra, solo se necesitan el número de marcadores contados y el volumen que pasa a través de una sección transversal de la

50 corriente de muestra en una longitud fija de tiempo, para calcular la concentración del marcador en la muestra en procesamiento. En algunos casos, el espacio de interrogación se puede definir para que sea menor que el área de la sección transversal de corriente de la muestra, por ejemplo, mediante el espacio de interrogación que se define por el tamaño del punto iluminado por el rayo láser. En algunos casos, el espacio de interrogación se puede definir mediante el ajuste de las aberturas 306 (Figura 1A) o 358 y 359 (Figura 1B) del analizador y la reducción del volumen iluminado que es reflejado por la lente del objetivo al detector. En los casos en los que el espacio de interrogación se define para ser más pequeño que el área de la sección transversal de la corriente de la muestra, la

55 concentración del marcador se puede determinar por interpolación de la señal emitida por el complejo a partir de una curva patrón que se genera usando una o más muestras de concentraciones patrón conocidas. En aún otros casos, la concentración del marcador se puede determinar mediante la comparación de las partículas medidas con un patrón de marcador interno. En casos, en los que se analiza una muestra diluida, el factor de dilución se tiene en cuenta en el cálculo de la concentración de la molécula de interés en la muestra de partida.

60 Como se ha analizado anteriormente, cuando el espacio de interrogación abarca la sección transversal completa de

- la corriente de muestra, solo el número de marcadores contado que pasa a través de una sección transversal de la corriente de muestra en una longitud fija de tiempo (intervalo) y el volumen de la muestra que fue interrogado en el intervalo, se necesitan para calcular la concentración de la muestra. El número total de marcadores contenidas en los intervalos "sí" se determina y se relaciona con el volumen de la muestra representada por el número total de intervalos utilizados en el análisis para determinar la concentración de marcadores en la muestra en procesamiento. Por tanto, en un caso, determinar la concentración de un marcador en una muestra en procesamiento comprende determinar el número total de marcadores detectadas intervalos "sí" y relacionar el número total de marcadores detectadas con el volumen total de la muestra que se analizó. El volumen total de la muestra que se analiza es el volumen de la muestra que se pasa a través de la célula de flujo capilar y a través del espacio de interrogación en un intervalo de tiempo especificado. Como alternativa, la concentración del complejo de marcador en una muestra se determina por interpolación de la señal emitida por el marcador en una serie de intervalos a partir de una curva patrón que se genera determinando la señal emitida por los marcadores en el mismo número de intervalos de muestras patrón que contiene concentraciones conocidas del marcador.
- En algunos casos, el número de marcadores individuales que se detecta en un intervalo está relacionado con la concentración relativa de la partícula en la muestra en procesamiento. A concentraciones relativamente bajas, por ejemplo, a concentraciones inferiores a cerca de 10-16 M el número de marcadores es proporcional a la señal de fotones que se detecta en un intervalo. Por tanto, a bajas concentraciones de marcador se proporciona la señal de fotones como una señal digital. A concentraciones relativamente altas, por ejemplo, a concentraciones mayores de aproximadamente 10-16 M, la proporcionalidad de la señal de fotones con un marcador se pierde como la probabilidad de dos o más marcadores que cruzan el espacio de interrogación en aproximadamente el mismo momento y que se cuenta como uno se vuelve significativa. Por tanto, en algunos casos, las partículas individuales en una muestra de una concentración mayor que aproximadamente 10-16 M se resuelven por la disminución de la longitud de tiempo de la medición del intervalo.
- Como alternativa, en otros casos, el total de la señal de fotón que es emitida por una pluralidad de partículas que están presentes en cualquier intervalo se detecta. Estos ejemplos permiten detectores de una única molécula en donde el intervalo dinámico es al menos 3, 3,5, 4, 4,5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, o más de 8 logs.
- El "intervalo dinámico", como se usa ese término en el presente documento, se refiere al intervalo de concentraciones de la muestra que puede ser cuantificado por el instrumento sin necesidad de dilución u otro tratamiento para alterar la concentración de las muestras sucesivas de diferentes concentraciones, donde las concentraciones se determinan con una precisión adecuada para el uso previsto. Por ejemplo, si una placa de microtitulación contiene una muestra de una concentración 1 femtomolar para un analito de interés en un pocillo, una muestra de concentración 10.000 femtomolar para un analito de interés en otro pocillo y una muestra de concentración 100 femtomolar para el analito en un tercer pocillo, así, un instrumento con un intervalo dinámico de al menos 4 logs y un límite inferior de cuantificación de 1 femtomolar es capaz de cuantificar con precisión la concentración de todas las muestras sin la necesidad de tratamiento adicional para ajustar la concentración, por ejemplo, la dilución. La precisión se puede determinar por métodos patrón, por ejemplo, usando una serie de patrones de concentraciones que abarcan todo el intervalo dinámico y la construcción de una curva patrón. Las medidas patrón de ajuste de la curva patrón resultante se puede usar como una medida de precisión, por ejemplo, un r^2 mayor de aproximadamente 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, o 0,99.
- El aumento de intervalo dinámico se logra mediante la alteración de la forma en que se analizan los datos procedentes del detector y/o mediante el uso de un atenuador entre el detector y el espacio de interrogación. En el extremo inferior del intervalo, donde la muestra en procesamiento está suficientemente diluida de manera que cada evento de detección, es decir, cada ráfaga de fotones por encima de un nivel de umbral en un intervalo (los "fotones de eventos"), probablemente represente solo un marcador, se analizan los datos para contar eventos de detección como moléculas únicas. Es decir, cada intervalo se analiza como un simple "sí" o "no" por la presencia de marcador, como se ha descrito anteriormente. Para una muestra en procesamiento más concentrada, donde la probabilidad de que dos o más marcadores que ocupan un solo intervalo llega a ser significativa, el número de fotones de eventos en un número significativo de intervalos se encuentra que es sustancialmente mayor que el número esperado para un solo marcador, por ejemplo, el número de fotones de eventos en un número significativo de intervalos corresponde a dos veces, tres veces, o más, que el número de fotones de eventos esperados para un solo marcador. Para estas muestras, el instrumento cambia su método de análisis de datos a uno que integra el número total de fotones de eventos para los intervalos de la muestra en procesamiento. Este total será proporcional al número total de marcadores que estaba en todos los intervalos. Para una muestra en procesamiento aún más concentrada, donde muchos marcadores están presentes en la mayoría de los intervalos, el ruido de fondo se convierte en una porción insignificante de la señal total de cada intervalo y el instrumento cambia su método de análisis de datos a uno que cuenta los fotones totales por intervalo (incluyendo el fondo). Un aumento aún mayor del intervalo dinámico se puede lograr mediante el uso de un atenuador entre la célula de flujo y el detector, cuando las concentraciones son de manera que la intensidad de luz que llega al detector de otra manera supera la capacidad del detector para contar los fotones con precisión, es decir, saturan el detector.
- El instrumento puede incluir un sistema de análisis de datos que recibe la entrada del detector y determina el método de análisis adecuado para la muestra que se está realizando y los valores de salidas basados en dicho análisis. El

sistema de análisis de datos puede promover instrucciones de salida a usar o no usar un atenuador, si un atenuador está incluido en el instrumento.

Utilizando dichos métodos, el intervalo dinámico del instrumento se puede aumentar claramente. Por tanto, en algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un intervalo dinámico de más de aproximadamente 1000 (3 log), 10.000 (4 log), 100.000 (5 log), 350.000 (5,5 log), 1.000.000 (6 log), 3.500.000 (6,5 log), 10.000.000 (7 log), 35.000.000 (7,5 log), o 100.000.000 (8 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un intervalo dinámico de más de aproximadamente 100.000 (5 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un intervalo dinámico de más de aproximadamente 1.000.000 (6 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir concentraciones de las muestras sobre un intervalo dinámico de más de aproximadamente 10.000.000 (7 log). En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un intervalo dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 1000; 10.000; 100.000; 350.000; 1.000.000; 3.500.000; 10.000.000, o 35.000.000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un intervalo dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 10.000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un intervalo dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 100.000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un intervalo dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 1.000.000 femtomolar. En algunos casos, el instrumento es capaz de medir las concentraciones de las muestras en un intervalo dinámico desde aproximadamente 1-10 femtomolar hasta al menos aproximadamente 10.000.000.

En algunos casos, un sistema de análisis o analizador descrito en el presente documento es capaz de detectar un analito, por ejemplo, un biomarcador en un límite de detección de menos de 1 nanomolar o 1 picomolar, o 1 femtomolar, o 1 attomolar, o 1 zeptomolar. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito, o de múltiples analitos, por ejemplo, un biomarcador o biomarcadores, de una muestra a otra muestra de menos de aproximadamente el 0,1, el 1, el 2, el 5, el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 80 % cuando el biomarcador está presente a una concentración de menos de 1 nanomolar o 1 picomolar, o 1 femtomolar, o 1 attomolar, o 1 zeptomolar, en las muestras y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,0001 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 1 picomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 100 femtomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 50 femtomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 5 femtomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 50 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 5 femtomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 5 μ l. En algunos casos, el sistema de análisis o analizador es capaz de detectar un cambio en la concentración del analito a partir de una primera muestra a una segunda muestra de menos de aproximadamente el 20 %, cuando el analito está presente en una concentración de menos de aproximadamente 1 femtomolar y cuando el tamaño de cada una de las muestras es menos de aproximadamente 5 μ l.

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

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

A. Aparato/Sistema

En un caso, los métodos que se describen en el presente documento utilizan un sistema de análisis capaz de detectar una partícula única en una muestra. En un caso, el sistema de análisis es capaz de detectar una partícula única de una partícula marcada con fluorescencia en donde el sistema de análisis detecta la energía emitida por un marcador fluorescente excitado en respuesta a la exposición por una fuente de radiación electromagnética cuando la partícula única está presente en un espacio de interrogación definido dentro de una célula de flujo capilar conectado de forma fluida al sistema de muestreo del sistema de análisis. En un caso adicional del sistema de análisis, la

partícula única se mueve a través del espacio de interrogación de la célula de flujo capilar por medio de una fuerza motriz. En otro caso del sistema de análisis, un sistema de muestreo automático puede ser incluido en el sistema de análisis para la introducción de la muestra en el sistema de análisis. En otro caso del sistema de análisis, un sistema de preparación de la muestra puede ser incluido en el sistema de análisis para la preparación de una muestra. En un caso adicional, el sistema de análisis puede contener un sistema de recuperación de la muestra para la recuperación de al menos una porción de la muestra después de que el análisis se completa.

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

En un caso típico, la fuente de radiación electromagnética excita un resto fluorescente unida a un marcador a medida que el marcador pasa a través del espacio de interrogación de la célula de flujo capilar. En algunos casos, el resto marcador fluorescente incluye una o más moléculas de colorante fluorescente. En algunos casos, el resto de marcador fluorescente es un punto cuántico. Cualquier resto fluorescente como se describe en el presente documento se puede utilizar en el marcador.

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

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

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

B. Analizador de partículas únicas

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

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

En un caso, la lente 305 del objetivo del microscopio tiene una alta apertura numérica del objetivo del microscopio. Como se usa en el presente documento, "lente de alta apertura numérica" incluye una lente con una apertura numérica de igual o mayor que 0,6. La apertura numérica es una medida del número de rayos de luz de formación de imágenes altamente difractadas capturadas por el objetivo. Una apertura numérica más alta permite que los rayos oblicuos cada vez más entren en la lente del objetivo y por tanto producen una imagen más altamente resuelto. Además, el brillo de una imagen aumenta con una apertura numérica superior. En el sistema de análisis, se puede utilizar lentes de alta apertura numérica están disponibles en el mercado de una diversidad de vendedores y

5 cualquier lente que tenga una abertura numérica igual o mayor que aproximadamente 0,6. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 1,3. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 1,0. En algunos casos, la lente tiene una
10 abertura numérica de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,2. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,0. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,9. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,3. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,0. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0,6. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0,7. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0,8. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 0,9. En algunos casos, la lente tiene una abertura numérica de al menos aproximadamente 1,0. En algunos casos, la abertura de la lente 305 de objetivo del microscopio es aproximadamente 1,25. En un caso, donde se utiliza una lente 305 de objetivo del microscopio de 15 0,8, se puede utilizar una lente Nikon 60X/0,8 NA Achromat (Nikon, Inc., USA)..

En algunos casos, la fuente 301 de radiación electromagnética es un láser que emite luz en el espectro visible. En todos los casos, la fuente de radiación electromagnética se ajusta de manera que la longitud de onda del láser se ajuste de manera que sea de una longitud de onda suficiente para excitar el marcador fluorescente unida a la
20 partícula. En algunos casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 639 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 532 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 422 nm. En otros casos, el láser es un láser de onda continua con una longitud de onda de 405 nm. Se puede utilizar cualquier láser de onda continua con una longitud de onda adecuada para excitar un resto fluorescente como se utiliza en los métodos y composiciones que se describen en el presente documento.
25

En un sistema 300 de análisis de partícula única ya que cada partícula pasa a través del haz 311 de la fuente de radiación electromagnética, la partícula entra en un estado excitado. Cuando la partícula se relaja de su estado excitado, se emite una ráfaga detectable de luz. El ciclo de excitación-emisión se repite muchas veces por cada
30 partícula en la longitud de tiempo que toma para que pase a través del haz permitiendo que el sistema 300 de análisis detecte decenas a miles de fotones para cada partícula a medida que pasan a través de un espacio 314 de interrogación. Los fotones emitidos por partículas fluorescentes son registrados por el detector 309 (Figura 1A) con un retardo de tiempo indicativo del tiempo para que el complejo de marcador de partículas pase a través del espacio de interrogación. La intensidad de fotones se registra por el detector 309 y el tiempo de muestreo se divide en intervalos, que son, segmentos de tiempo, arbitrarios, uniformes con anchos de canal de tiempo libremente
35 seleccionables. El número de señales contenidas en cada intervalo evaluado. Uno o una combinación de varios métodos de análisis estadísticos se emplean con el fin de determinar cuándo una partícula se encuentra presente. Dichos métodos incluyen determinar el ruido basal del sistema de análisis y el ajuste de una intensidad de señal para el marcador fluorescente en un nivel estadístico por encima del ruido basal para eliminar falsas señales positivas del detector.
40

La fuente 301 de radiación electromagnética se enfoca sobre una célula 313 de flujo capilar del sistema 300 de análisis, donde la célula 313 de flujo capilar está conectada de forma fluida al sistema de muestra. Un espacio 314 de interrogación se muestra en la figura 2A. El haz 311 de la fuente 301 de radiación electromagnética de longitud
45 continua de la figura 1A se enfoca ópticamente a una profundidad especificada dentro de la célula 313 de flujo capilar. El haz 311 se dirige hacia la célula 313 de flujo capilar llena de muestra en un ángulo perpendicular a la célula 313 de flujo capilar. El haz 311 se opera a una longitud de onda predeterminada que se selecciona para excitar un marcador fluorescente particular, utilizada para marcar la partícula de interés. El tamaño o el volumen del espacio 314 de interrogación se determina por el diámetro del haz 311 junto con la profundidad a la que el haz 311 se centra. Como alternativa, el espacio de interrogación se puede determinar mediante el análisis de una muestra de calibración de concentración conocida a través del sistema de análisis.
50

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

diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 10 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 12 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 13 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 14 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 15 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 16 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 17 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 18 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es de aproximadamente 19 micrómetros. En algunos casos, el diámetro del punto enfocado del haz es aproximadamente 20 micrómetros.

En una instancia alternativa del sistema de análisis de partícula única, puede usarse más de una fuente de radiación electromagnética para excitar las partículas marcadas con marcadores fluorescentes de diferentes longitudes de onda. En otro caso alternativo, se puede utilizar más de un espacio de interrogación en la célula de flujo capilar. En otro caso alternativo, se pueden emplear múltiples detectores para detectar longitudes de onda de emisión diferentes de los marcadores fluorescentes. Una ilustración que incorpora cada uno de estos casos alternativos de un sistema de análisis se muestra en la figura 1B. Estos ejemplos se muestran en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/078998 A1.

En algunos casos del sistema 300 de análisis, se requiere una fuerza motriz para mover una partícula a través de la célula 313 de flujo capilar del sistema 300 de análisis. En un caso, la fuerza motriz puede ser una forma de presión. La presión usada para mover una partícula a través de la célula de flujo capilar puede ser generada por una bomba. En algunas realizaciones, se puede utilizar una bomba de HPLC Scivex, Inc. En algunos casos donde se utiliza una bomba como una fuerza motriz, la muestra puede pasar a través de la célula de flujo capilar a una velocidad de 1 µl/min a aproximadamente 20 µl/min, o aproximadamente 5 µl/min a aproximadamente 20 µl/min. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la célula de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 5 µl/min. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la célula de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 10 µl/min. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la célula de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 15 µl/min. En algunos casos, la muestra puede pasar a través de la célula de flujo capilar a una velocidad de aproximadamente 20 µl/min. En algunos casos, se puede utilizar una fuerza electrocinética para mover la partícula a través del sistema de análisis. Este método ha sido descrito previamente en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/078998 A1.

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

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

En algunos casos, la óptica de la fuente de radiación electromagnética y la óptica del detector están dispuestas en una configuración óptica confocal. En dicha configuración, la fuente 301 de radiación electromagnética y el detector 309 están alineadas en el mismo plano focal. La configuración confocal hace el analizador más robusto debido a que la fuente 301 de radiación electromagnética y la óptica del detector 309 no necesitarían ser realineadas si el sistema de análisis se mueve. Esta configuración también hace el uso del analizador más simplificado ya que elimina la necesidad de volver a alinear los componentes del sistema de análisis. La configuración confocal para el analizador 300 (Figura 1A) y el analizador 355 (Figura 1B) se muestran en las Figuras 3A y 3B respectivamente. La figura 3A muestra que el haz 311 a partir de una fuente 301 de radiación electromagnética se enfoca por el objetivo 315 del microscopio, para formar un espacio 314 de interrogación (Figura 2A) dentro de la célula 313 de flujo capilar. Para separar la luz fluorescente de la luz láser, se utiliza un espejo 316 dicróico, que refleja la luz láser, pero deja pasar la luz fluorescente. El filtro 317 que se coloca en frente del detector elimina cualquier luz no fluorescente en el detector. En algunos casos, un sistema de análisis configurado en una configuración confocal puede comprender dos o más espacios de interrogación. Dicho método se ha desvelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/078998 A1.

El láser puede ser un láser de colorante sintonizable, tal como un láser de helio-neón. El láser se puede configurar para emitir una longitud de onda de 632,8 nm. Como alternativa, la longitud de onda del láser se puede configurar para emitir una longitud de onda de 543,5 nm o 1523 nm. Como alternativa, el láser electromagnético puede ser un láser de iones de argón. En dicho caso, el láser de iones de argón puede ser operado como un láser de gas continuo

en aproximadamente 25 diferentes longitudes de onda en el espectro visible, la longitud de onda ajustada entre 408,9 y 686,1 nm, pero en su ajuste de rendimiento óptimo entre 488 y 514,5 nm.

1 Fuente de radiación electromagnética

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

15 En algunos casos, el sistema de análisis consta de una fuente 301 de radiación electromagnética. Se puede usar cualquier número de fuentes de radiación en cualquier sistema 300 de análisis. Se han descrito múltiples fuentes de radiación electromagnética previamente en la anterior Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1. En algunos casos, todas las fuentes de radiación continua de onda electromagnética (EM) emiten radiación electromagnética a las mismas longitudes de onda. En otros casos, diferentes fuentes emiten diferentes longitudes de onda de radiación EM.

20 En un caso, la fuente o fuentes de EM 301, 351, 352 son láseres de onda continua que producen longitudes de onda de entre 200 nm y 1000 nm. Dichas fuentes EM tienen la ventaja de ser pequeñas, duraderas y relativamente económicas. Además, por lo general tienen la capacidad de generar señales fluorescentes más grandes que otras fuentes de luz. Los ejemplos específicos de fuentes EM de onda continua adecuadas incluyen, pero no se limitan a: los láseres de los tipos de argón, criptón, helio-neón, helio-cadmio, así como, los láseres de diodo sintonizables (regiones de rojo a infrarrojos), cada uno con la posibilidad de duplicación de frecuencia. Los láseres proporcionan iluminación continua con ningún accesorio electrónico o dispositivo mecánico, tales como obturadores, para interrumpir su iluminación. En un caso donde se utiliza un láser de onda continua, una fuente de radiación electromagnética de 3 mW puede ser de energía suficiente para excitar un marcador fluorescente. Un haz de un láser de onda continua de dicha salida de energía puede tener entre 2 a 5 μm de diámetro. El tiempo de exposición de la partícula al haz de láser con el fin de ser expuesto a 3 mW puede ser un período de tiempo de aproximadamente 1 ms. En casos alternativos, el tiempo de exposición al haz de láser puede ser igual o inferior a aproximadamente 500 μs . En un caso alternativo, el tiempo de exposición puede ser igual o inferior a aproximadamente 100 μs . En un caso alternativo, el tiempo de exposición puede ser igual o inferior a aproximadamente 50 μs . En un caso alternativo, el tiempo de exposición puede ser igual o inferior a aproximadamente 10 μs .

40 Los LED son otra fuente de iluminación de alta fiabilidad, de bajo coste. Los recientes avances en LED ultrabrillantes y colorantes de sección transversal de alta absorción y rendimiento cuántico apoyan la aplicabilidad de los LED a la detección de una partícula única. Dichos láseres se pueden utilizar solos o en combinación con otras fuentes de luz tales como lámparas de arco de mercurio, lámparas de arco elementales, lámparas halógenas, descargas de arco, descargas de plasma, diodos emisores de luz, o combinación de éstos.

45 En otros casos, la fuente de EM podría ser en la forma de un láser de onda de pulso. En dicho caso, el tamaño del pulso del láser es un factor importante. En dicho caso, el tamaño, el punto de enfoque y la energía total emitida por el láser es importante y debe ser de suficiente energía como para ser capaz de excitar el marcador fluorescente. Cuando se utiliza un láser de pulso, puede ser necesario un pulso de duración más larga. En algunos casos se puede usar un pulso de láser de 2 nanosegundos. En algunos casos se puede usar un pulso de láser de 5 nanosegundos. En algunos casos se puede utilizar un pulso entre 2 y 5 nanosegundos.

50 La intensidad del láser óptima depende de las características fotoblanqueo de los colorantes individuales y la longitud de tiempo requerido para atravesar el espacio de interrogación (incluyendo la velocidad de la partícula, la distancia entre espacios de interrogación si hay más de uno se utiliza y el tamaño de el o los espacios de interrogación). Para obtener una señal máxima, es deseable iluminar la muestra a la intensidad más alta que no dará como resultado el fotoblanqueo de un alto porcentaje de los colorantes. La intensidad preferida es una de manera que no más del 5 % de los colorantes se blanqueen en el momento en el que la partícula ha atravesado el espacio de interrogación.

60 La potencia del láser se ajusta en función del tipo de moléculas de colorante que necesitan ser estimuladas y la longitud de tiempo que las moléculas de colorante se estimulan y/o la velocidad con la que las moléculas de colorante pasan a través de la célula de flujo capilar. La potencia del láser se define como la velocidad a la cual la energía es entregada por el haz y se mide en unidades de Julios/segundo, o Watts. Se apreciará que cuanto mayor es la potencia de salida del láser, menor puede ser el tiempo que el láser ilumina la partícula, mientras que proporciona una cantidad constante de energía para el espacio de interrogación, mientras que la partícula pasa a través del espacio. Por tanto, en algunos casos, la combinación de potencia y el tiempo de iluminación láser es de manera que la energía total recibida por el espacio de interrogación durante el tiempo de iluminación sea de más de aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100

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

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

2. Célula de flujo capilar

La célula de flujo capilar está conectada de forma fluida al sistema de muestra. En un caso, el espacio 314 de interrogación de un sistema de análisis, se determina por el área de la sección transversal del haz 311 correspondiente y por un segmento del haz dentro del campo de visión del detector 309. En un caso del sistema de análisis, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen, como se define en el presente documento, entre aproximadamente 0,01 y 500 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 100 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 10 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 1 pl, o entre aproximadamente 0,01 pl y 0,5 pl, o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 300 pl, o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 50 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 5 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 0,5 pl o entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 2 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 50 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 5 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 0,5 pl, o entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 0,2 pl, o entre aproximadamente 0,1 pl y aproximadamente 25 pl. En algunos casos, el espacio de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,01 pl y 10 pl. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,01 pl y 1 pl. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 5 pl. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,02 pl y aproximadamente 0,5 pl. En algunos casos, el espacio 314 de interrogación tiene un volumen entre aproximadamente 0,05 pl y aproximadamente 0,2 pl. Otros volúmenes de espacio útil de interrogación son como se describen en el presente documento. Se debe entender por un experto en la materia que el espacio 314 de interrogación se puede seleccionar para un máximo rendimiento del analizador. Aunque se han mostrado muy pequeños espacios de interrogación para minimizar el ruido de fondo, los grandes espacios de interrogación tienen la ventaja de que las muestras de baja concentración se pueden analizar en un plazo de tiempo razonable. En casos en los que se utilizan dos espacios de interrogación 370 y 371, se pueden utilizar volúmenes tales como los que se describen en el presente documento para un único espacio 314 de interrogación.

En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que varían de aproximadamente 1000 femtomolar (fM) a aproximadamente 1 zeptomolar (zM). En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que van desde aproximadamente 1000 fM a aproximadamente 1 attomolar (aM). En un caso, los espacios de interrogación son lo suficientemente grandes para permitir la detección de partículas en concentraciones que van desde aproximadamente 10 fM a aproximadamente 1 attomolar (aM). En muchos casos, los grandes espacios de interrogación permiten la detección de partículas en concentraciones de menos de aproximadamente 1 fM sin dispositivos o técnicas de pre-concentración adicional. Un experto en la materia

reconocerá que el tamaño del espacio de interrogación más adecuado depende de la luminosidad de las partículas para ser detectado, el nivel de señal de fondo y la concentración de la muestra que se va a analizar.

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

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

Las limitaciones físicas a los espacios de interrogación también se pueden proporcionar por una pared sólida. En un caso, la pared es una o más de las paredes de una célula 313 de flujo (Figura 2A), cuando el líquido de muestra está contenido dentro de un capilar. En un caso, la célula está hecha de vidrio, pero se pueden utilizar otras sustancias transparentes a la luz en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000 nm o superior, tal como cuarzo, sílice fundida y materiales orgánicos tales como teflón, nylon, plásticos, tales como cloruro de polivinilo, poliestireno y polietileno, o cualquier combinación de los mismos. Aunque otras formas de sección transversal (por ejemplo, rectangular, cilíndrica) se pueden usar, en un caso la célula 313 de flujo capilar tiene una sección transversal cuadrada. En otro ejemplo, el espacio de interrogación puede definirse al menos en parte por un canal (no mostrado) grabado en un chip (no mostrado). Consideraciones similares se aplican a los casos en los que se utilizan dos espacios de interrogación (370 y 371 en la Fig. 2B).

El espacio de interrogación está bañado en un líquido. En un caso, el líquido es acuoso. En otros casos, el líquido es no acuoso o una combinación de líquidos acuosos y no acuosos. Además, el líquido puede contener agentes para ajustar el pH, composición iónica, o agentes de tamizado, tales como macropartículas solubles o polímeros o geles. Se contempla que las válvulas u otros dispositivos pueden estar presentes entre los espacios de interrogación para interrumpir temporalmente la conexión del líquido. Los espacios de interrogación interrumpidos temporalmente se considera que están conectados por líquido.

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

En algunos casos, los detectores de una única molécula que se describen en el presente documento comprenden no más de un espacio de interrogación. En algunos casos, se utilizan múltiples espacios de interrogación. Se han descrito múltiples espacios de interrogación previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1. Un experto en la materia reconocerá que en algunos casos el analizador contendrá 2, 3, 4, 5, 6 o más espacios de interrogación distintos.

3. Fuerza motriz

En un caso del sistema de análisis, las partículas se mueven a través del espacio de interrogación por una fuerza motriz. En algunos casos, la fuerza motriz para las partículas en movimiento es la presión. En algunos casos, la presión es suministrada por una bomba y la fuente de presión de aire, una fuente de vacío, una centrífuga, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la fuerza motriz para las partículas en movimiento es una fuerza electrocinética. El uso de una fuerza electrocinética como una fuerza motriz se ha desvelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1.

En un caso, la presión se puede utilizar como una fuerza motriz para mover las partículas a través del espacio de interrogación de la célula de flujo capilar. En un caso adicional, la presión se suministra para mover la muestra por

medio de una bomba. Se conocen en la técnica bombas adecuadas. En un caso, se pueden utilizar bombas fabricadas para aplicaciones de HPLC, tales como las fabricadas por Scivax, Inc., como fuerza motriz. En otros casos, las bombas fabricadas para aplicaciones de microfluidos se pueden utilizar cuando se bombean volúmenes más pequeños de muestra. Dichas bombas se describen en las Patentes de los Estados Unidos N.º

- 5 5.094.594, 5.730.187, 6.033.628 y 6.533.553, que desvelan los dispositivos que pueden bombear volúmenes de líquido en el intervalo de nanolitros o picolitros. Preferentemente todos los materiales dentro de la bomba que entran en contacto con la muestra están hechos de materiales altamente inertes, por ejemplo, polieterecetona (PEEK), sílice fundida o zafiro.
- 10 Una fuerza motriz es necesaria para mover la muestra a través de la célula de flujo capilar para empujar la muestra a través del espacio de interrogación para el análisis. También se requiere una fuerza motriz para empujar una muestra de lavado a través de la célula de flujo capilar después de que la muestra se ha hecho pasar a través. También se requiere una fuerza motriz para empujar la muestra de vuelta a un recipiente de recuperación de la muestra, cuando se emplea la recuperación de la muestra. Las bombas convencionales vienen en una diversidad de
- 15 tamaños y el tamaño adecuado se puede elegir para adaptarse a los requisitos esperados de tamaño de la muestra y el flujo. En algunos casos, se utilizan bombas separadas para el análisis de la muestra y para el lavado del sistema. La bomba de análisis puede tener una capacidad de aproximadamente 0,000001 ml a aproximadamente 10 ml, o aproximadamente 0,001 ml a aproximadamente 1 ml, o aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 0,2 ml, o aproximadamente 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, o 0,5 ml. Las bombas de lavado pueden ser de mayor capacidad que las bombas de análisis. Las bombas de lavado pueden tener un volumen de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 20 ml, o aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml, o aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2 ml, o aproximadamente o aproximadamente 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, o 10 ml. Estos tamaños de bomba son solo ilustrativos y los expertos en la materia apreciarán que el tamaño de la bomba puede ser elegido de acuerdo con la aplicación, tamaño de la muestra, la viscosidad de líquido que se va a bombear, las dimensiones de
- 20 tubos, velocidad de flujo, temperatura y otros factores bien conocidos en la técnica. En algunos casos, las bombas del sistema son impulsados por motores paso a paso, que son fáciles de controlar con mucha precisión con un microprocesador.

En los casos preferidos, las bombas de lavado y análisis se utilizan en serie, con válvulas de retención especiales para controlar la dirección del flujo. La tubería está diseñada de manera que cuando la bomba de análisis extrae la muestra máxima, la muestra no alcance la propia bomba. Esto se consigue mediante la elección del DI y la longitud de la tubería entre la bomba de análisis y el capilar de análisis de manera que el volumen del tubo sea mayor que el volumen de eyección de la bomba de análisis.

35 4. Detectores

En un caso, se detecta la luz (por ejemplo, la luz en el intervalo ultravioleta, visible o infrarrojo) emitida por un marcador fluorescente después de la exposición a la radiación electromagnética. El detector 309 (Figura 1A), o detectores (364, 365, Figura 1B), es capaz de capturar la amplitud y duración de las ráfagas de fotones a partir de

40 un complejo de resto-marcador fluorescente y convertir adicionalmente la amplitud y la duración de la ráfaga de fotones en señales eléctricas. Los dispositivos de detección, tales como cámaras CCD, cámaras del módulo de entrada de vídeo y cámaras Streak se pueden utilizar para producir imágenes con señales contiguas. En otro caso, se pueden utilizar dispositivos tales como un bolómetro, un fotodiodo, una matriz de fotodiodos, fotodiodos en avalancha y fotomultiplicadores que producen señales secuenciales. También se puede utilizar cualquier combinación de los detectores anteriormente mencionados. En un caso, se utilizan fotodiodos en avalancha para la detección de fotones.

Utilizando la óptica específica entre un espacio 314 de interrogación (Figura 2A) y su correspondiente detector 309 (Figura 1A), pueden detectarse varias características distintivas de la radiación electromagnética emitida incluyendo:

50 longitud de onda de emisión, intensidad de emisión, tamaño de ráfaga, duración de la ráfaga y la polarización de fluorescencia. En algunos casos, el detector 309 es un fotodiodo que se utiliza en polarización inversa. Un fotodiodo situado en polarización inversa por lo general tiene una resistencia muy alta. Esta resistencia se reduce cuando la luz de una frecuencia adecuada brilla en la unión P/N. Por tanto, un diodo polarizado en sentido inverso se puede utilizar como un detector mediante el control de la ejecución actual a través de este. Los circuitos basados en este efecto son más sensibles a la luz que los basados en el sesgo cero.

En un caso del sistema de análisis, el fotodiodo puede ser un fotodiodo en avalancha, que puede ser operado con mucho mayor polarización inversa de fotodiodos convencionales, permitiendo así que cada transportador de fotogenerado se multiplique por ruptura en avalancha, lo da como resultado la ganancia interna dentro del fotodiodo, lo que aumenta la capacidad de respuesta eficaz (sensibilidad) del dispositivo. La elección del fotodiodo se determina por la longitud de onda de energía o emisión emitida por la partícula marcada con fluorescencia. En algunos casos, el fotodiodo es un fotodiodo de silicio que detecta la energía en el intervalo de 190 - 1100 nm; en otro caso, el fotodiodo es un fotodiodo de germanio que detecta la energía en el intervalo de 800 - 1700 nm; en otro caso, el fotodiodo es un fotodiodo de arseniuro de indio y galio que detecta la energía en el intervalo de 800 - 2600 nm; y aún

65 en otros casos, el fotodiodo es un fotodiodo de sulfuro de plomo que detecta la energía en el intervalo de entre menos de 1000 nm a 3500 nm. En algunos casos, el fotodiodo en avalancha es un detector de fotón único diseñado

para detectar energía en el intervalo de longitud de onda 400 nm a 1100 nm. Los detectores de fotón único están disponibles en el mercado (por ejemplo, Perkin Elmer, Wellesley, MA).

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

20 Un sistema que comprende dos o más detectores se puede utilizar para detectar partículas únicas que están cada una marcada con dos o más marcadores que emiten luz en diferentes espectros. Por ejemplo, dos detectores diferentes pueden detectar un anticuerpo que se ha marcado con dos marcadores de colorantes diferentes. Como alternativa, un sistema de análisis que comprende dos detectores se puede utilizar para detectar partículas de diferentes tipos, cada tipo se marca con moléculas de colorante diferentes, o con una mezcla de dos o más moléculas de colorante. Por ejemplo, dos detectores diferentes se pueden usar para detectar dos tipos diferentes de anticuerpos que reconocen dos proteínas diferentes, estando marcado cada tipo con un marcador de colorante diferente o con una mezcla de dos o más moléculas de colorante del marcador. Mediante la variación de la relación de las dos o más moléculas de colorante del marcador, pueden detectarse dos o más tipos de partículas diferentes individualmente utilizando dos detectores. Se entiende que tres o más detectores se pueden utilizar.

30 Se debe entender por un experto en la materia que uno o más detectores se pueden configurar en cada espacio de interrogación ya sea que uno o más espacios de interrogación se definan dentro de una célula de flujo, y que cada detector puede estar configurado para detectar cualquiera de las características de la radiación electromagnética emitida enumeradas anteriormente. El uso de múltiples detectores, por ejemplo, para múltiples espacios de interrogación, se ha desvelado previamente en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1. Una vez que una partícula se marca para que sea detectable (o si la partícula posee una característica intrínseca que la haga detectable), se puede utilizar cualquier mecanismo de detección adecuado conocido en la técnica, por ejemplo una cámara CCD, una cámara de módulo de entrada de vídeo, una cámara Streak, un bolómetro, un fotodiodo, una matriz de fotodiodos, fotodiodos en avalancha y fotomultiplicadores que producen señales secuenciales y combinaciones de los mismos. Se pueden detectar diferentes características de la radiación electromagnética incluyendo: longitud de onda de emisión, intensidad de emisión, tamaño de ráfaga, duración de la ráfaga, la polarización de fluorescencia y cualquier combinación de los mismos.

45 C. Sistema de muestreo

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

50 En algunos casos, el sistema de análisis que se describe en el presente documento incluye un sistema de muestreo para la introducción de una alícuota de una muestra en el analizador de partícula única para el análisis. Se puede utilizar cualquier mecanismo que pueda introducir una muestra. Las muestras se pueden elaborar utilizando ya sea una succión de vacío creada por una bomba o por la presión aplicada a la muestra que empujaría el líquido en el tubo, o por cualquier otro mecanismo que sirva para introducir la muestra en el tubo de muestreo. Generalmente, pero no necesariamente, el sistema de muestreo introduce una muestra de volumen de muestra conocido en el analizador de partícula única; en algunos casos donde se detecta la presencia o ausencia de una partícula o partículas, el conocimiento preciso del tamaño de la muestra no es crítico. En casos preferidos el sistema de muestreo proporciona muestreo automatizado para una sola muestra o una pluralidad de muestras. En los casos donde se introduce una muestra de volumen conocido en el sistema, el sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis de más de aproximadamente 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, o 2000 µl. En algunos casos el sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis de menos de aproximadamente 2000, 1000, 500, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,1, 0,01, o 0,001 µl. En algunos casos el sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis de entre aproximadamente 0,01 y 1500 µl, o aproximadamente 0,1 y 1000 µl, o aproximadamente 1 y 500 µl, o aproximadamente 1 y 100 µl, o aproximadamente 1 y 50 µl, o aproximadamente 1 y 20 µl. En algunos casos, el

sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis de entre aproximadamente 5 µl y 200 µl, o aproximadamente 5 µl y aproximadamente 100 µl, o aproximadamente 5 µl y 50 µl. En algunos casos, el sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis de entre aproximadamente 10 µl y 200 µl, o entre aproximadamente 10 µl y 100 µl, o entre aproximadamente 10 µl y 50 µl. En algunos casos, el sistema de muestreo proporciona una muestra para el análisis entre aproximadamente 0,5 µl y aproximadamente 50 µl.

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

Se requiere exactitud del volumen de la muestra y precisión del volumen muestra a muestra del sistema de muestreo, para el análisis que nos ocupa. En algunos casos, la precisión del volumen de muestreo se determina por las bombas utilizadas, por lo general representados por un CV de menos de aproximadamente el 50, el 40, el 30, el 20, el 10, el 5, el 4, el 3, el 2, el 1, el 0,5, el 0,1, el 0,05 o el 0,01 % de volumen de muestra. En algunos casos, la precisión muestra a muestra del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente el 50, el 40, el 30, el 20, el 10, el 5, el 4, el 3, el 2, el 1, el 0,5, el 0,1, el 0,05 o el 0,01 % de volumen de muestra. En algunos casos, la precisión intraensayo del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente el 10, el 5, el 1, el 0,5 o el 0,1 %. En algunos casos, la precisión interensayo del sistema de muestreo está representada por un CV de menos de aproximadamente el 10, el 5 o el 1 %. En algunos casos, la precisión inter-ensayo del sistema de muestreo muestra un CV de menos de aproximadamente 5 %.

En algunos casos, el sistema de muestreo proporciona el traslado de la muestra, la ventaja de que no se requiere una etapa de lavado adicional entre muestras. Por tanto, en algunos casos, el traslado de muestra es menos de aproximadamente el 1, el 0,5, el 0,1, el 0,05, el 0,04, el 0,03, el 0,02, el 0,01, el 0,005 o el 0,001 %. En algunos casos, el traslado de la muestra es menos de aproximadamente el 0,02 %. En algunos casos, el traslado de la muestra es menos de aproximadamente el 0,01 %.

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

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

D. Sistema de preparación de la muestra

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

En algunos casos, el sistema de análisis incluye un sistema de preparación de la muestra que realiza todos o algunos de los procesos necesarios para proporcionar una muestra lista para el análisis por el analizador de partícula única. Este sistema puede realizar cualquiera o todas las etapas indicadas anteriormente para la preparación de la muestra. En algunos casos las muestras se procesan parcialmente por el sistema de preparación de la muestra del sistema de análisis. Por tanto, en algunos casos, una muestra puede ser parcialmente procesada fuera del primer sistema de análisis. Por ejemplo, la muestra se puede centrifugar primero. Después, la muestra puede procesarse parcialmente en el interior del analizador por un sistema de preparación de la muestra. El procesamiento en el interior del analizador incluye la marcación de la muestra, mezclando la muestra con un tampón

y otras etapas de procesamiento que serán conocidas para un experto en la materia. En algunos casos, una muestra de sangre se procesa fuera del sistema de análisis para proporcionar una muestra de suero o plasma, que se introduce en el sistema de análisis y, además se procesa por un sistema de preparación de la muestra para marcar la partícula o partículas de interés y, opcionalmente, para eliminar el marcador no unido. En otros casos la preparación de la muestra puede incluir el inmunoagotamiento de la muestra para eliminar las partículas que no son de interés o para eliminar las partículas que pueden interferir con el análisis de la muestra. En aún otros casos, la muestra se puede someter a agotamiento de partículas que pueden interferir con el análisis de la muestra. Por ejemplo, la preparación de muestras puede incluir el agotamiento de los anticuerpos heterófilos, que son conocidos para interferir con inmunoensayos que utilizan anticuerpos no humanos para detectar directa o indirectamente una partícula de interés. Del mismo modo, otras proteínas que interfieren con las mediciones de las partículas de interés pueden retirarse de la muestra usando anticuerpos que reconocen las proteínas que interfieren.

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

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

En algunos casos, se realiza la preparación de muestras ya sea fuera del sistema de análisis o en el componente de la preparación de muestras del sistema de análisis, en una o más placas de microtitulación, tal como una placa de 96 pocillos. Depósitos de reactivos, tampones y similares pueden estar en comunicación fluida intermitente con los pocillos de la placa por medio de tubos u otras estructuras adecuadas, como son bien conocidos en la técnica. Las muestras se pueden preparar por separado en placas de 96 pocillos o tubos. El aislamiento de la muestra, la unión del marcador y, si fuera necesario, etapas de separación del marcador, se pueden hacer en una placa. En algunos casos, las partículas preparadas después se liberan de la placa y las muestras se mueven en tubos para el muestreo en el sistema de análisis de muestras. En algunos casos, todas las etapas de la preparación de la muestra se realizan en una placa y el sistema de análisis adquiere muestra directamente de la placa. Aunque este caso se describe en términos de una placa de 96 pocillos, se apreciará que se puede utilizar cualquier recipiente para contener una o más muestras y que sea adecuado para la preparación de la muestra. Por ejemplo, se pueden utilizar placas de microtitulación convencionales de 384 o 1536 pocillos. De manera más general, en algunos casos, el sistema de preparación de la muestra es capaz de contener y preparar más de aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 500, 1000, 5000, o 10.000 muestras. En algunos casos, se pueden tomar muestras de múltiples muestras para su análisis en múltiples sistemas analizadores. Por tanto, en algunos casos, 2 muestras, o más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 50, o 100 muestras son muestreadas desde el sistema de preparación de la muestra y se ejecutan en paralelo en múltiples sistemas de análisis de la muestra.

Los sistemas de microfluidos también se pueden usar para la preparación de la muestra y como sistemas de preparación de muestras que son parte de sistemas de analizadores, especialmente para muestras sospechosas de contener concentraciones suficientes altas de partículas, que la detección requiera muestras más pequeñas. Los principios y técnicas de manipulación de microfluidos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.º 4.979.824; 5.770.029; 5.755.942; 5.746.901; 5.681.751; 5.658.413; 5.653.939; 5.653.859; 5.645.702; 5.605.662; 5.571.410; 5.543.838; 5.480.614, 5.716.825; 5.603.351; 5.858.195; 5.863.801; 5.955.028; 5.989.402; 6.041.515; 6.071.478; 6.355.420; 6.495.104; 6.386.219; 6.606.609; 6.802.342; 6.749.734; 6.623.613; 6.554.744; 6.361.671; 6.143.152; 6.132.580; 5.274.240; 6.689.323; 6.783.992; 6.537.437; 6.599.436; 6.811.668 y la solicitud de patente PCT publicada N.º WO9955461(A1). Las muestras se pueden preparar en serie o en paralelo, para usar en un sistema de análisis único o múltiple.

Preferentemente, la muestra comprende un tampón. El tampón se puede mezclar con la muestra fuera del sistema de análisis, o puede ser proporcionada por el mecanismo de preparación de la muestra. Aunque se puede utilizar

cualquier tampón adecuado, el tampón preferible tiene un fondo bajo de fluorescencia, es inerte a la partícula marcada de forma detectable, puede mantener el pH de trabajo y, en los casos en donde la fuerza motriz es electrocinética, tiene la fuerza iónica adecuada para la electroforesis. La concentración del tampón puede tener cualquier concentración adecuada, tal como en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mM.

5 Cualquier sistema de tampón se puede utilizar siempre y cuando se provea la solubilidad, la función y la capacidad de detección de las moléculas de interés. Preferentemente, para la aplicación mediante bombeo, la tampón se selecciona entre el grupo que consiste en fosfato, glicina, acetato, citrato, acidulado, carbonato/bicarbonato, imidazol, trietanolamina, amida de glicina, borato, MES, Bis-Tris, ADA, aces, PIPES, MOPSO, Bis-Tris propano, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO, Trizma, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, Tricina, Gly-Gly, 10 Bicina, HEPBS, TAPS, AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS y CABS. El tampón también se puede seleccionar entre el grupo que consiste en Gly-Gly, bicina, tricina, ácido 2-morfolina etanosulfónico (MES), ácido 4-morfolina propanosulfónico (MOPS) y 2-amino-2-metil-1-propanol clorhidrato (AMP). Un tampón útil es Tris/borato 2 mM a pH 8,1, pero también son aceptables Tris/glicina y Tris/HCl. Otros tampones son como se describen en el presente documento.

15 Se desvelan tampones útiles para la electroforesis en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 11/048.660, publicada como documento US2006/0078998 A1.

20 E. Recuperación de la muestra

Una característica muy útil de los casos de los analizadores y sistemas de análisis que se describen en el presente documento es que la muestra se puede analizar sin consumirla. Esto puede ser especialmente importante cuando los materiales de muestra son limitados. La recuperación de la muestra también permite hacer otros análisis o volver a analizarla. Las ventajas de esta característica para aplicaciones donde el tamaño de la muestra es limitado y/o 25 donde es deseable la capacidad para volver a analizar la muestra, por ejemplo, aplicaciones de diagnóstico clínico, forenses, detección de fármacos y aplicaciones de diagnóstico clínico, serán evidentes para los expertos en la materia.

Por tanto, en algunos casos, el sistema de análisis descrito en el presente documento proporciona un sistema de 30 recuperación de la muestra para la recuperación de la muestra después del análisis. En estos casos, el sistema incluye mecanismos y métodos por los cuales la muestra se introduce en el analizador, se analiza y después regresa, por ejemplo, por el mismo camino, hasta el transportador de la muestra, por ejemplo, el tubo de muestra. Debido a que ninguna de las muestras se destruye y puesto que no entra en ninguna de las válvulas u otros tubos, sigue sin contaminar. Además, debido a que todos los materiales en el trayecto de la muestra son altamente inertes, 35 por ejemplo, PEEK, sílice fundida, o zafiro, hay poca contaminación de la trayectoria de la muestra. El uso de las bombas controladas con motor de pasos (en particular la bomba de análisis) permite un control preciso de los volúmenes extraídos e impulsados de regreso. Esto permite la recuperación completa o casi completa de la muestra con poca o ninguna dilución mediante el tampón de lavado. Por tanto, en algunos casos, más de aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o el 40 99,9 % de la muestra se recuperó después del análisis. En algunos casos, la muestra recuperada es sin diluir. En algunos casos, la muestra recuperada se diluye menos de aproximadamente 1,5 veces, 1,4 veces, 1,3 veces, 1,2 veces, 1,1 veces, 1,05 veces, 1,01 veces, 1,005 veces o 1,001 veces.

Para el muestreo y/o recuperación de la muestra, se puede utilizar cualquier mecanismo para el transporte de una 45 muestra de líquido de un recipiente de muestra al analizador. En algunos casos el extremo de entrada del capilar de análisis se ha conectado a una longitud corta de tubo, por ejemplo, tubo de PEEK que puede sumergirse en un recipiente de muestra, por ejemplo, un tubo de ensayo o pocillo de muestra, o puede mantenerse por encima de un recipiente de residuos. Cuando se lava, para limpiar la muestra anterior del aparato, este tubo se coloca por encima del recipiente de residuos para atrapar los residuos de lavado. Cuando se extrae una muestra, el tubo se introduce 50 en el pocillo de muestra o tubo de ensayo. Normalmente la muestra se extrae de forma rápida y después se expulsa lentamente mientras se observan las partículas dentro de la muestra. Como alternativa, en algunos casos, la muestra se extrae lentamente durante al menos parte del ciclo de extracción; la muestra puede ser analizada mientras se extrae lentamente. Esto se puede seguir por un rápido retorno de la muestra y un lavado rápido. En algunos casos, la muestra puede ser analizada tanto en el ciclo de entrada (introducción) como de salida 55 (extracción), lo que mejora la estadística de recuento, por ejemplo, de muestras pequeñas y diluidas, así como confirman los resultados y similares. Si se desea guardar la muestra, puede ser impulsada hacia atrás hacia el mismo pocillo de la muestra de donde viene, o a otro. Si no se desea guardar la muestra, el tubo se coloca sobre el recipiente de residuos.

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

Los métodos de la presente invención hacen posible la medición de los niveles de troponina cardiaca en concentraciones muy inferiores que las medidas previamente. Aunque la troponina cardiaca es un marcador 65 aceptado para el daño del músculo cardiaco, su utilidad ha sido limitada por el hecho de que, con los métodos actuales de análisis, solo es detectable después de haberse producido un daño considerable en el músculo cardiaco, debido a la falta de sensibilidad de los métodos actuales. El Joint European Society of

Cardiology/American College of Cardiology committee for the Redefinition of Myocardial Infarction ha recomendado que un aumento de la concentración de troponina cardiaca se define como una medida superior del percentil 99 de la distribución de las concentraciones de troponina cardiaca en el grupo de referencia, un umbral muy bajo. Se recomienda una imprecisión total de (CV) en el límite de decisión del <10 %. Sin embargo, la imprecisión analítica obtenida con inmunoensayos actualmente disponibles para las troponinas cardiacas no es uniforme, sobre todo en el intervalo de baja concentración. Además, los ensayos que están disponibles actualmente carecen de sensibilidad suficiente para detectar los niveles de troponina en sujetos no clínicos (normales) y no se ha definido un verdadero valor de referencia o un nivel de troponina definido en una población normal. Los sistemas de análisis que se describen en el presente documento han demostrado ser capaces de detectar sistemáticamente los niveles de cTnI a concentraciones de menos de 10 pg/ml con una imprecisión total de menos del 10 % (ver ejemplos). Por tanto, la invención proporciona, según se especifica en las reivindicaciones, los métodos para el diagnóstico o pronóstico basados en la detección de alta sensibilidad de troponina cardiaca en las personas.

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

En algunos casos, la concentración umbral de la troponina se determina por análisis de muestras, por ejemplo, muestras de sangre, suero, o plasma, a partir de una población aparentemente sana para la troponina cardiaca, por ejemplo, troponina I cardiaca y determinar el nivel en el cual el 80, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98, el 99, el 99,5 o el 99,9 % de la caída de la población por debajo de ese nivel (concentración). Este valor es el valor umbral. En algunos casos, el valor umbral se fija en el percentil 99. En el método reivindicado, el análisis se realiza usando un método con un nivel de detección para la troponina cardiaca de menos de aproximadamente 5 pg/ml.

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

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

A. Muestras

Como se especifica en las reivindicaciones, la muestra es suero humano.

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

fármaco).

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

En algunos casos, se toma al menos una muestra en o cerca del momento en el cual, los individuos están presentes con un profesional de la salud con uno o más síntomas indicativos de una afección que puede implicar daño cardiaco. Los contextos en los cuales un individuo puede estar presente con un profesional de la salud incluyen, pero no se limitan a, la atención ambulatoria, cuidados de urgencia, cuidados críticos, cuidados intensivos, unidad de vigilancia, paciente ingresado en el hospital, paciente no hospitalizado, consultorio médico, clínica médica, contexto de respuesta de emergencia, incluyendo una ambulancia y situaciones de detección de salud. En algunos casos, una o más muestras se toman del individuo y se someten a ensayo para la troponina cardiaca localmente, es decir, en o cerca del entorno en donde se toman las muestras. Por ejemplo, un individuo que se presenta a un hospital puede tener una o más muestras tomadas que se someten a ensayo para la troponina cardiaca en el hospital. En algunos casos, una o más muestras se toman a partir del individuo y se someten al análisis de troponina cardiaca en un laboratorio CLIA. En algunos casos, el individuo muestra uno o más síntomas compatibles con el síndrome coronario agudo. En algunos casos, el individuo muestra uno o más síntomas compatibles con el IAM. Estos síntomas incluyen, pero no se limitan a, dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, niveles de enzimas anormales y falta de aliento.

B. Determinación de diagnóstico, pronóstico o método de tratamiento

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

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

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

En el desarrollo del ensayo de diagnóstico o pronóstico, los datos para uno o más marcadores potenciales se pueden obtener a partir de un grupo de sujetos. El grupo de sujetos se divide en al menos dos grupos y preferentemente el primer grupo y el segundo grupo tienen cada uno un número aproximadamente igual de sujetos. El primer grupo incluye sujetos que se ha confirmado que tienen una enfermedad o, más en general, que están en un primer estado de afección. Por ejemplo, este primer grupo de pacientes pueden ser aquellos que han tenido recientemente una incidencia de la enfermedad, o pueden ser los que tienen un tipo específico de enfermedad, tal como el IAM. La confirmación del estado de afección se puede hacer a través de un ensayo más riguroso y/o caro, tal como la RM o la TC. A partir de ahora, los sujetos en este primer grupo se conocen como "enfermos". El segundo grupo de sujetos no es más que aquellos que no entran en el primer grupo. Los sujetos en este segundo grupo pueden ser "no enfermos"; es decir, sujetos normales. Como alternativa, los sujetos en este segundo grupo se pueden seleccionar por mostrar un síntoma o una agrupación de síntomas que imitan los síntomas presentados por los sujetos "enfermos". En incluso otra alternativa, este segundo grupo puede representar los que están en un momento diferente de incidencia de la enfermedad. Preferentemente, los datos para el mismo grupo de marcadores están disponibles para cada paciente. Este grupo de marcadores puede incluir todos los marcadores candidatos que pueden ser sospechosos de ser relevante para la detección de una enfermedad o afección particular. No se requiere

relevancia actual conocida. Ejemplos de las composiciones, los métodos y sistemas que se describen en el presente documento pueden ser utilizados para determinar cuál de los marcadores candidatos son más relevantes para el diagnóstico de la enfermedad o afección. Los niveles de cada marcador en los dos grupos de sujetos pueden ser distribuidos a través de un amplio intervalo, por ejemplo, en forma de una distribución gaussiana. Sin embargo, no se requiere un ajuste de distribución.

1. Infarto agudo de miocardio

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

Por tanto, la memoria descriptiva describe un método para diagnosticar, predecir y/o prevenir o tratar el IAM en un individuo mediante el análisis de una muestra del individuo, por ejemplo, una muestra de sangre, muestra de plasma y/o muestra de suero, para troponina cardiaca, por ejemplo, cTnI y la detección de una concentración de troponina cardiaca en la muestra a un límite de detección de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 pg/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/ml, en donde la concentración de troponina cardiaca en la muestra indica o predice el IAM. La troponina cardiaca puede ser cTnI o cTnT y puede ser troponina, total o una medida de una forma particular, por ejemplo, libre, en forma de complejo, o fragmento; en algunos casos, se utiliza una relación de una o más formas de la troponina, como se describe en el presente documento. La cTnI total puede medirse en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, la cTnT total se mide en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, la cTnI total + cTnT se mide en la muestra o una serie de muestras. En algunos casos, el nivel de troponina cardiaca se determina en o cerca del momento en que el individuo está presente con a un profesional de la salud con síntomas indicativos de IAM. Estos síntomas incluyen, pero no se limitan a, dolor torácico, presión en el pecho, dolor en el brazo, EKG anormal, los niveles de enzimas anormales y falta de aliento.

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

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

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

Los marcadores útiles en combinación con la troponina cardiaca en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a la creatina cinasa (CK) y su banda miocárdica (MB) del resto miocárdica CK, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa (LDH), α -hidroxibutirato deshidrogenasa, mioglobina, transaminasa glutamato oxaloacetato, glucógeno fosforilasa BB, ácidos grasos libres no unidos, proteína de unión de ácidos grasos del corazón (H-FABP),

la albúmina modificada por isquemia, la miosina de cadena ligera 1, la miosina de cadena ligera 2. Los marcadores de la inflamación y la inestabilidad de la placa útil en combinación con la troponina cardiaca en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, la proteína C-reactiva, recuento de glóbulos blancos, ligando CD40 soluble, mieloperoxidasa, proteína-1 quimioatrayente de monocitos, colina de sangre total y proteína plasmática A asociada al embarazo. Otros marcadores de la inflamación se pueden detectar, e incluyen combinaciones de IL-8, IL-1 β , IL6, IL10, TNF, e IL-12p70, así como otras citoquinas o marcadores que serán evidentes para los expertos en la materia.

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

En algunos casos, la troponina cardiaca, sola o en combinación con otros marcadores o signos clínicos, medidos como se describe en el presente documento, se utiliza para determinar el reinfarto. En algunos casos, la troponina cardiaca, sola o en combinación con otros marcadores o signos clínicos, medidos como se describe en el presente documento, se utiliza para determinar las características de un infarto, por ejemplo, el tamaño, o la duración desde el infarto. En este último caso, los fragmentos de la troponina producidos por proteólisis en la sangre pueden ser comparados con la troponina total, cuanto mayor es la relación de fragmentos, mayor es el tiempo transcurrido desde el infarto.

2. Afecciones distintas del IAM

En el presente documento también se describen métodos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento con base en la concentración de troponina cardiaca en una muestra que son útiles en afecciones distintas del IAM.

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

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

a. Toxicidad cardiaca. Algunos casos de las composiciones y métodos descritos son especialmente útiles en la determinación y el seguimiento de la toxicidad cardiaca que es resultado de un tratamiento, por ejemplo, toxicidad cardiaca del tratamiento farmacológico. De este modo, por ejemplo, la memoria descriptiva proporciona un método de evaluación de la toxicidad cardiaca de un tratamiento mediante la medición de troponina cardiaca en un individuo mediante i) la determinación de una concentración de troponina cardiaca en una muestra o determinar las concentraciones de troponina cardiaca en una serie de muestras procedentes del individuo, donde al menos una de

las muestras se toma de la persona durante o después de un tiempo cuando el individuo está recibiendo el tratamiento, donde la concentración o concentraciones se determina mediante un ensayo de troponina cardiaca con un límite de detección para la troponina cardiaca en dicha muestra de menos de aproximadamente 50, 40, 30, 10, 5, 4,3,2 o 1 pg/ml, por ejemplo, menos de aproximadamente 20 pg/ml; y ii) la evaluación del grado de toxicidad cardiaca del tratamiento en base a dicha concentración o concentraciones. En algunos casos, el tratamiento es un tratamiento farmacológico. En algunos casos, el tratamiento es un tratamiento no farmacológico. El método para determinar la concentración de troponina cardiaca incluye cualquier método adecuado con la sensibilidad requerida, por ejemplo, los métodos que se describen en el presente documento. En algunos casos, los métodos utilizan un método para determinar una concentración de troponina cardiaca en la muestra, donde el método comprende detectar moléculas individuales de troponina o complejos, o fragmentos de los mismos.

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

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

C. Métodos comerciales

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

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

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

Los métodos comerciales en el presente documento también contemplan la prestación de servicios de diagnóstico, por ejemplo, para profesionales sanitarios, aseguradores, pacientes, etc. El negocio en el presente documento puede proporcionar servicios de diagnóstico a través de un contrato con un laboratorio de servicios o el establecimiento de un laboratorio de servicio (a tenor de la Enmienda de Mejora del Laboratorio Clínico (CLIA, por sus siglas en inglés) u otra aprobación reglamentaria). Dicho laboratorio de servicio después puede realizar los procedimientos desvelados en el presente documento para identificar si un marcador de troponina cardiaca se encuentra dentro de una muestra.

VII. Composiciones

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

Los casos de ejemplo incluyen una composición para la detección de la troponina cardiaca que incluye un compañero de unión con la troponina cardiaca unida a un resto fluorescente, donde el resto fluorescente es capaz de emitir una media de al menos aproximadamente 200 fotones cuando se estimula por un emisor de luz láser a la longitud de onda de excitación del resto, cuando el láser se enfoca en un punto de no menos de aproximadamente 5 micrómetros de diámetro que contiene el resto y en donde la energía total dirigida en el punto por el láser es de no más de aproximadamente 3 microjulios. En algunos casos, el compañero de unión incluye un anticuerpo para la troponina cardiaca. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo de reacción cruzada, por ejemplo, un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con troponina cardiaca de por lo menos dos especies, por ejemplo, al menos dos especies seleccionadas entre el grupo que consiste en ser humano, mono, perro y ratón. En algunos casos el anticuerpo reacciona de forma cruzada con troponinas cardiacas de todos entre seres humanos, mono, perro y ratón. En algunos casos, la troponina cardiaca se selecciona entre el grupo que consiste en cTnI y cTnT. En algunos casos, la troponina cardiaca es cTnI. En algunos casos, la troponina cardiaca es cTnT. El anticuerpo puede ser específico para una región específica de la molécula de troponina, por ejemplo, específico para una región que comprende los aminoácidos 27-41 de la troponina I cardiaca. El resto fluorescente puede contener una o más moléculas que comprende al menos un sistema de anillo de indolio sustituido en donde el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o un grupo de sustancia conjugada. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 647, 700, o 750. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante seleccionadas entre el grupo que consiste en Alexa Fluor 488, 532, 700, o 750. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 488. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 555. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 610. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 647. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 680. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 700. La composición de marcador puede incluir un resto fluorescente que incluye una o más moléculas de colorante que son Alexa Fluor 750.e

En algunos casos, la memoria descriptiva describe una composición que incluye un conjunto de patrones para la determinación de una concentración de una troponina cardiaca, en donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardiaca menos de aproximadamente 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 pg/ml. En algunos casos, la memoria descriptiva describe una composición que incluye un conjunto de patrones para determinar una concentración de una troponina cardiaca, en donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardiaca de menos de aproximadamente 20 pg/ml. En algunos casos, la memoria descriptiva describe una composición que incluye un conjunto de patrones para la determinación de una concentración de una troponina cardiaca, en donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardiaca menos de aproximadamente 10 pg/ml. En algunos casos, la memoria descriptiva describe una composición que incluye un conjunto de patrones para la determinación de una concentración de una troponina cardiaca, en donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardiaca de menos de aproximadamente 5 pg/ml. En algunos casos, la memoria descriptiva describe una composición que incluye un conjunto de patrones para determinar una concentración de una troponina cardiaca, en donde al menos uno de los patrones está a una concentración de troponina cardiaca de menos de aproximadamente 1 pg/ml.

Otras composiciones son como se describen en el presente documento.

VIII. Kits

La memoria descriptiva describe adicionalmente kits. Los kits que se describen en el presente documento incluyen una o más composiciones útiles para la detección sensible de la troponina cardiaca, como se describe en el presente documento, en un embalaje adecuado. En algunos casos los kits que se describen en el presente documento proporcionan marcadores, por ejemplo, compañero de unión tal como un anticuerpo que es específico para troponina cardiaca, donde el compañero de unión está unido a un resto fluorescente. En algunos casos los kits que se describen en el presente documento proporcionan pares de compañeros de unión, por ejemplo, pares de anticuerpos, que son específicos para la troponina cardiaca, donde al menos uno de los compañeros de unión es un marcador para una troponina cardiaca, como se describe en el presente documento. En algunos casos, los compañeros de unión, por ejemplo, anticuerpos, se proporcionan en recipientes separados. En algunos casos, los compañeros de unión, por ejemplo, anticuerpos, se proporcionan en el mismo recipiente. En algunos casos, uno de los compañeros de unión, por ejemplo, anticuerpo, se inmoviliza sobre un soporte sólido, por ejemplo, una placa de microtitulación o una perla paramagnética. En algunos de estos casos, el otro compañero de unión, por ejemplo, anticuerpo, se marca con un resto fluorescente tal como se describe en el presente documento.

Los compañeros de unión, por ejemplo, anticuerpos, soportes sólidos y marcadores fluorescentes para los componentes de los kits puede ser cualquier tipo de componentes adecuados tal como se describe en el presente documento.

Los kits pueden incluir adicionalmente reactivos útiles en los métodos que se describen en el presente documento, por ejemplo, tampones y otros reactivos utilizados en las reacciones, lavados, tampones u otros reactivos de unión para el preacondicionamiento del instrumento en el cual se realizarán los ensayos y los tampones de elución u otros reactivos para realizar las muestras a través del instrumento.

Los kits pueden incluir uno o más patrones, por ejemplo, los patrones para el uso en los ensayos que se describen en el presente documento, tales como los patrones altamente purificados de, por ejemplo, cTnI humana o cTnT humana recombinante, o diversos fragmentos, complejos y similares, de las mismas. Los kits pueden incluir además instrucciones.

Ejemplos

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

A menos que se especifique lo contrario, se analizaron muestras de procesamiento en los Ejemplos en un detector de molécula única (SMD, por sus siglas en inglés) como se describe en el presente documento, con los siguientes parámetros: Láser: láser diodo de arsenito de galio de onda continua de longitud de onda de 639 nm (Blue Sky Research, Milpitas, CA), enfocado a un tamaño de punto de aproximadamente 2 micrómetros (espacio de interrogación de 0,004 pl como se define en el presente documento); caudal = 5 microlitros/min a través de un capilar de sílice fundida de DI de 100 micrómetros cuadradas y DO de 300 micrómetros cuadradas; configuración no confocal de lentes (véase, por ejemplo, la Fig. 1A); centrando la lente de abertura numérica 0,8 (Olympus); detector de fotodiodos en avalancha de silicio (Perkin Elmer, Waltham, MA).

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

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

Materiales: se usaron los siguientes materiales en el procedimiento que se describe a continuación: Placa de ensayo: Nunc Maxisorp, producto 464718, 384 pocillos, claro, recubiertos de forma pasiva con anticuerpo monoclonal, BiosPacific A34440228P Lote n.º A0316 (5 µg/ml en carbonato de sodio 0,05 M pH 9,6, durante la noche a temperatura ambiente); se bloqueó con 5 % de sacarosa, BSA al 1 % en PBS y se almacenó a 4 °C. Para la curva patrón, se utilizó Troponina I cardiaca humana (BiosPacific Cat n.º J34000352). El diluyente para las concentraciones patrón fue suero humano que fue sometido a inmunoagotamiento de la cTnI endógena, se dividió en alícuotas y se almacenó a - 20 °C. La dilución de los patrones se hizo en una placa de 96 pocillos, cónicos, de polipropileno, (Nunc producto n.º 249 944). Se usaron los siguientes tampones y soluciones: (a) tampón de ensayo: BBS con 1 % de BSA y 0,1 % de Triton X-100; (b) solución de bloqueo pasivo en tampón de ensayo que contiene 2 mg/ml de IgG de ratón, (Equitech Bio); 2 mg/ml de IgG de cabra, (Equitech Bio); y 2 mg/ml de MAK33 poli, Roche n.º 11939661; (c) anticuerpo de detección (Ab): afinidad del anticuerpo policlonal de cabra purificado contra el Péptido 3, (BiosPacific G129C), que se marcó con un colorante fluorescente Alexa Fluor 647 y se almacenó a 4 °C; diluyente de anticuerpo de detección: 50 % de tampón de ensayo, 50 % de solución de bloqueo pasivo; tampón de lavado: solución salina reguladora de borato Tampón de Triton (BBST) (borato 1,0 M, cloruro de sodio 15,0 M, Triton X-100al 10 %, pH 8,3); tampón de elución: BBS con urea 4 M, Triton X-100 al 0,02 %e y BSA al 0,001 %.

Preparación de anticuerpos marcados con Alexa Fluor 647: el anticuerpo de detección G-129-C se conjugó con Alexa Fluor 647, disolviendo en primer lugar 100 ug de G-129-C en 400 ul del tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1 M). La solución de anticuerpo se concentró después a 50 ul mediante la transferencia de la solución en filtro YM-30 y sometiendo la solución y el filtro de la centrifugación. A continuación, el filtro YM-30 y el anticuerpo se lavaron tres veces mediante la adición de 400 ul del tampón de acoplamiento. El anticuerpo se recuperó mediante la adición de 50 µl al filtro, invirtiendo el filtro y centrifugando durante 1 minuto a 5.000 x g. La solución del anticuerpo resultante fue 1-2 ug/ul. Se reconstituyó Alexa Fluor 647 NHS éster, mediante la adición de 20 ul de DMSO a un vial de Alexa Fluor 647, esta solución se almacenó a -20 °C hasta durante un mes. Se añadieron 3 ul de solución madre de Alexa Fluor 647 a la solución de anticuerpo, que después se mezclan y se incuban en la oscuridad durante una hora. Después de una hora, se añadieron 7,5 ul de tris 1 M a la solución de anticuerpo Alexa Fluor 647 y se mezclaron. La solución se ultrafiltra con YM-30 para retirar los componentes de bajo peso molecular. El volumen del material retenido, que contenía el anticuerpo conjugado con Alexa Fluor 647, se ajustó a 200-400 µl mediante la adición de PBS. 3uL de NaN₃ al 10 % se añadieron a la solución, la solución resultante se transfirió a una unidad de centrifuga Ultrafree 0,22 y se centrifugó durante 2 minutos a 12.000 x g. El filtrado que contiene el anticuerpo conjugado se recogió y se utilizó en los ensayos.

Procedimiento: preparación de muestras y patrón de cTnl y análisis:

La curva patrón se preparó de la siguiente manera: se prepararon patrones de trabajo (0-900 pg/ml) por medio de diluciones en serie de las soluciones stock de cTnl en diluyente patrón o para lograr un intervalo de concentraciones de cTnl de entre 1,2 pg/ml-4,3 µg/ml.

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

Para el análisis, se adquirieron 20 µl por pocillo a 40 µl/minuto y se analizaron 5 µl a 5 µl/minuto. Se analizaron los datos en función de un umbral de 4 sigma. Se registró la señal en bruto frente a la concentración de los patrones. Un ajuste lineal se realizó para el intervalo de concentración bajo y se realizó un ajuste no lineal para la curva patrón completa. El límite de detección (LdD) se calculó como LDD = (3 x desviación típica de ceros)/pendiente del ajuste lineal. Las concentraciones de las muestras se determinaron a partir de la ecuación (no lineal o lineal) adecuada para la señal de la muestra.

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

Resultados: Se muestran datos para una curva patrón cTnl típica medida por cuadruplicado utilizando el protocolo de ensayo en la Tabla 2.

50

Tabla 2

Curva patrón para cTnl			
cTnl (pg/ml)	Señal	Desviación típica	% de CV
0	233	25	10,8
1,5625	346	31	8,9
3,125	463	35	7,5
6,25	695	39	5,6
12,5	1137	61	5,3
25	1988	139	7,0
50	3654	174	4,8
100	5493	350	6,4
200	8264	267	3,2
400	9702	149	1,5
800	9976	50	0,5

La sensibilidad del sistema de análisis se sometió a ensayo en 15 análisis y se encontró de forma rutinaria que

detectaba niveles de subfemtomo/l (fM) de calibrador, como se muestra por los datos en la Tabla 3. La precisión fue del 10 % a 4 y 12 pg/ml de cTnI.

Tabla 3

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

5

La curva patrón linealizada para los intervalos de concentraciones de cTnI se muestra en la **figura 5**.

El límite analítico de detección (LdD) se determinó a través de 15 ensayos secuenciales. El LdD fue la media de las determinaciones intra-ensayo 0 patrón + 3 DT (n = 4). La media de LdD fue de 1,7 pg/ml (intervalo 0,4 a 2,8 pg/ml).

10

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

15

Tabla 4

Recuperación de la muestra			
Pico (pg/ml)	Recuperación (media)	Desviación típica	% de CV
5	5,7	0,9	16
15	13,7	0,2	2
45	43	0,6	2
135	151	6,2	4

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

20

Tabla 5

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

Estos datos muestran que el sistema de análisis de la invención permite realizar el inmunoensayo altamente sensible inducido por láser para concentraciones subfemtomolares de cTnI.

25 Ejemplo 2: Ensayos basados en Sándwich-Perla para TnI

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

30

Materiales: se obtienen micropartículas MyOne Estreptovidina C1 (MP) de Dynal (solución madre 650,01-03,10 mg/ml). Los tampones utilizados en el ensayo incluyen: 10X solución salina reguladora de borato Tampón Triton (BBST) (borato 1,0 M, cloruro de sodio 15,0 M, Triton X-100 al 10 %, pH 8,3); tampón de ensayo (2 mg/ml de IgG de cabra normal, 2 mg/ml de IgG de ratón normal y 0,2 mg/ml de MAB-33-IgG-polímero en 0,1 M de Tris (pH 8,1), EDTA 0,025 M, NaCl 0,15 M, BSA al 0,1 %, Triton X-100 al 0,1 %, NaN₃ al 0,1 % y, almacenada a 4°C); y tampón de elución (BBS con urea 4 M, 0,02 % de Triton X-100 y 0,001 % de BSA, se almacena a 2-8°C). Los anticuerpos utilizados en el ensayo basado en perlas sándwich incluyen: Bio-Ab (A34650228P (BiosPacific) con 1-2 biotinas por IgG) y Det-AB (G-129-C (BiosPacific) conjugado con A647, 2-4 compuestos fluorescentes por IgG). El patrón es la troponina I cardíaca humana recombinante (BiosPacific, n.º de cat J34120352). El diluyente calibrador es BSA 30 mg/ml en TBS wEDTA.

35

40

45

Recubrimiento de las micropartículas: se colocan 100 ul de la solución madre de MP en un tubo Eppendorf. Las MP se lavan tres veces con 100 ul de tampón de lavado BBST, mediante la aplicación de un imán, retirando el sobrenadante, retirando el imán y se resuspenden en tampón de lavado. Después de los lavados las MP se resuspenden en 100 ul de tampón de ensayo y se añaden 15 ug de Bio-Ab. Después, la mezcla se incuba durante una hora a temperatura ambiente con mezcla constante. Las MP se lavan cinco veces con tampón de lavado 1 ml, como se ha descrito anteriormente. Después de los lavados de las MP se resuspenden en 15 ml de tampón de

ensayo (o 100 ul para almacenar a 4 °C).

Preparación de patrón y muestras: El patrón se diluye con diluyente calibrador para preparar la curva patrón adecuada (por lo general 200 pg/ml a 0,1 pg/ml). Las muestras de suero y plasma congelado necesitan ser centrifugadas 10 minutos a temperatura ambiente a 13.000 rpm. El suero/plasma aclarado se retira con cuidado para evitar la adopción de cualquier posible sedimento o sedimento y se pone en tubos nuevos. Se pipetea 50 ul de cada patrón o muestra en los pocillos adecuados.

Diana de captura: 150 ul de MP (después de la resuspensión a 15 ml en tampón de ensayo + NaCl 400 mM) se añaden a cada pocillo. La mezcla se incuba en JitterBug, 5 a temperatura ambiente durante 1 h.

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

Lavado y elución: La placa se coloca en un imán y se lava tres veces con tampón de lavado. El sobrenadante se retira después de asegurarse que todas las MP sean capturadas por el imán y se añaden 250 ul de tampón de lavado. Después de los lavados las muestras se transfieren a una nueva placa de 96 pocillos. Después, la nueva placa se coloca en el imán y el sobrenadante se retira después de asegurarse de que todas las MP sean capturadas por el imán. Después, se añaden 250 ul de tampón de lavado después de quitar la placa del imán. Después, la placa se coloca sobre el imán y el sobrenadante se retira después de asegurarse de que todas las MP sean capturadas por el imán. Después, se añaden 20 ul de tampón de elución y la mezcla se incuba en JitterBug, 5 a temperatura ambiente durante 30 min.

Las MP se filtran y transfieren a la placa de 384 pocillos: El patrón y las muestras se transfieren a una placa de filtro de 384 pocillos colocada en la parte superior de una placa de ensayo de 384 pocillos. Después, la placa se centrifugó a temperatura ambiente a 3000 rpm con un rotor de placa. La placa del filtro se retira y se añaden los calibradores adecuados. La placa se cubre y está lista para ser analizada en SMD.

SMD: Una alícuota se bombea en el analizador. Los anticuerpos marcados individualmente se miden durante el flujo capilar definiendo el volumen de interrogación de manera que se detecta la emisión de solamente 1 molécula fluorescente en un espacio definido siguiendo la excitación con láser. Donde cada señal representa un evento digital, esta configuración permite sensibilidades analíticas extremadamente altas. La señal fluorescente total se determina como una suma de los eventos digitales individuales. Cada molécula de contado es un punto de datos positivo con cientos de miles de eventos de DMC/muestra. El límite de detección del ensayo de cTnl de la invención se determina por el método de la media +3 DT.

40 **Ejemplo 3. Rango de concentración de cTnl en una población de sujetos no enfermos normales.**

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

De acuerdo con las recomendaciones del actual European and American Cardiology Societies (ESC/ACC), los ensayos de troponina deben cuantificar con precisión el percentil 99 de los valores normales con una imprecisión de ensayo (CV) de menos del 10 %, con el fin de distinguir de forma fiable entre pacientes con SCA y los pacientes sin cardiopatía isquémica y la estratificación del riesgo de eventos cardíacos adversos. El ensayo mostró que el umbral biológico (concentración de corte) para la Tnl está a una concentración de Tnl de 7 pg/ml, que se establece en el percentil 99 con un CV correspondiente del 10 % (Figura 5). Un nivel de CV del 10 % de los puntos del perfil de precisión a una concentración de Tnl de 4 y 12 pg/ml.

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

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

Ejemplo 4. Detección de la liberación temprana de Tnl en la circulación de los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM)

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

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

25 Además, los métodos de la presente invención permiten el diagnóstico y posible intervención mucho antes, basándose en los niveles de troponina cardíaca, como se evidencia por los resultados para la primera muestra tomada de los pacientes. En los 3 casos que tenían valores iniciales, del ensayo comercial de cTnl entre 100 y 350 ng/ml, todos fueron positivos para cTnl por los métodos analíticos de la invención (es decir, cTnl superior a 7 pg/ml). En los 12 casos que tenían valores de cTnl comerciales iniciales de menos de 100 pg/ml, se determinó que 30 5 eran positivos para un evento cardiovascular de acuerdo con el ensayo de la invención (es decir, cTnl superior a 7 pg/ml). El uso prospectivo del ensayo de la invención habría detectado un 53 % más de casos de IAM, que el ensayo comercial actual cuando la muestra de admisión se evaluó.

35 Estudio 2: se sometieron a ensayo 50 muestras de suero adicionales, que dieron negativas de acuerdo con el ensayo comercial, usando el analizador y el ensayo de la invención. Los resultados se muestran en la figura 8. De las 50 muestras, 36 estaban dentro del 99 % y se determinó que estaban dentro del intervalo normal establecido mediante el ensayo de la invención. Sin embargo, se determinó que las 14 muestras restantes que estaban dentro del intervalo comercial "normal" o no enfermo, sometido a ensayo por encima del umbral biológico establecido por la invención.

40 Por tanto, el ensayo de cTnl de alta sensibilidad de la invención permite la detección de daño miocárdico en pacientes cuando los niveles séricos de cTnl están por debajo de los valores de umbral por la tecnología disponible en el mercado. El uso del ensayo de cTnl altamente sensible y preciso de la invención permite la detección del IAM antes que con los ensayos de cTnl existentes y de ese modo proporciona la oportunidad de diagnóstico adecuado e 45 intervención médica temprana para mejorar el resultado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un diagnóstico o pronóstico en un individuo que comprende:

- 5 (i) medir la concentración de troponina cardíaca I (cTnI) a partir de una muestra de suero del individuo, en el que dicha concentración se determina mediante un ensayo de cTnI con un límite de detección para dicha cTnI en dicha muestra de menos de 5 pg/ml;
- (ii) comparar la concentración medida a una concentración umbral de 7 pg/ml; y
- 10 (iii) determinar un diagnóstico o pronóstico de infarto de miocardio en el individuo, si la concentración de la muestra es mayor que la concentración umbral;

en el que el individuo es un ser humano.

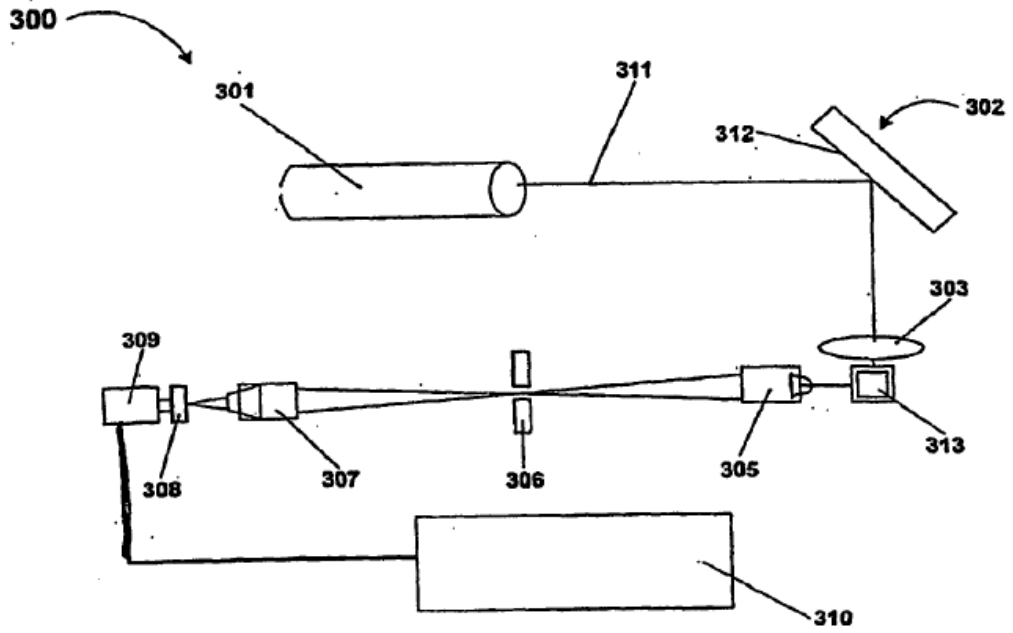


Figura 1A

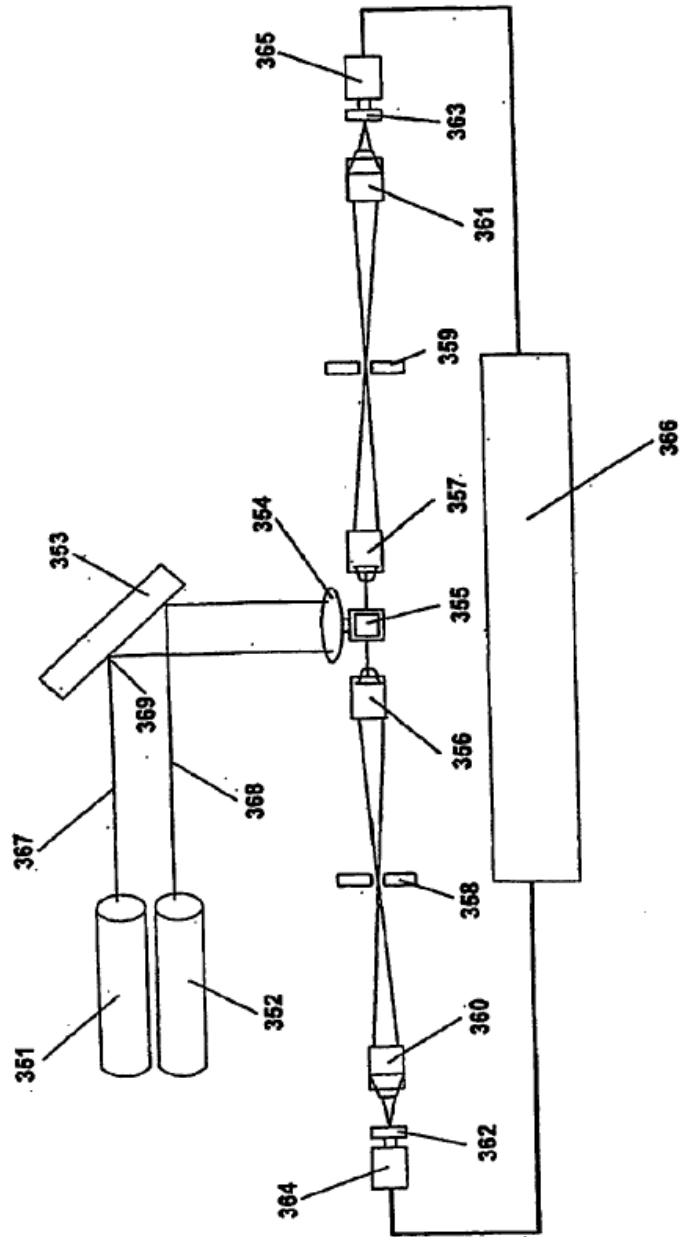


Figura 1B

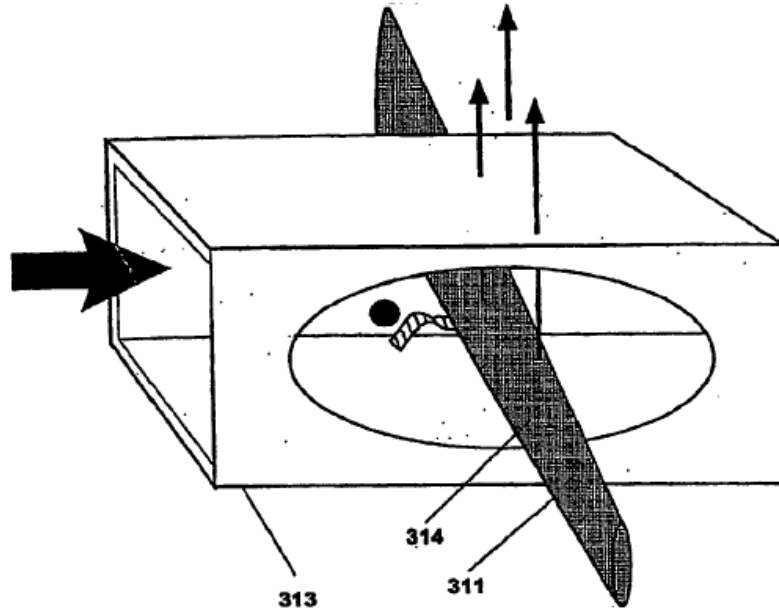


Figura 2A

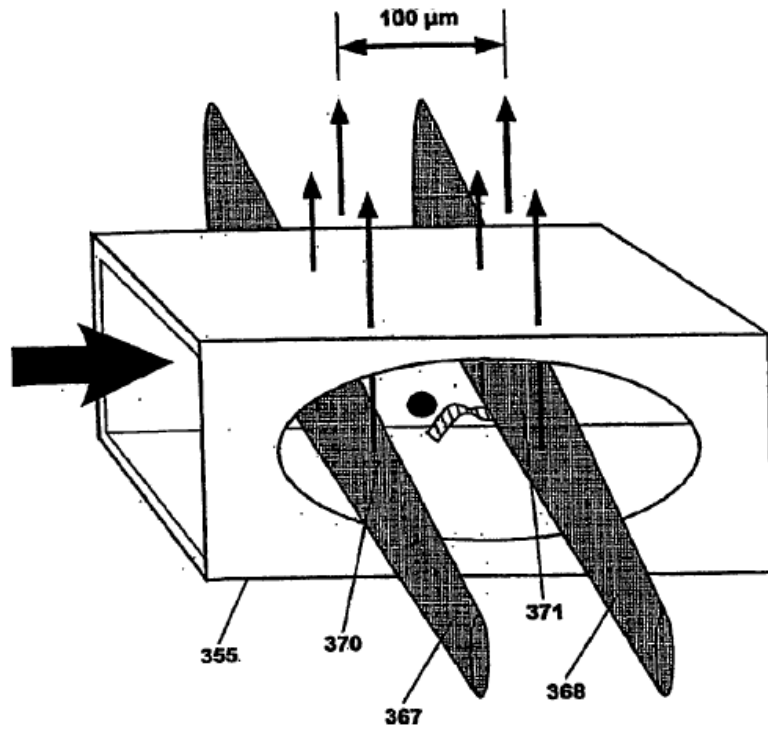


Figura 2B

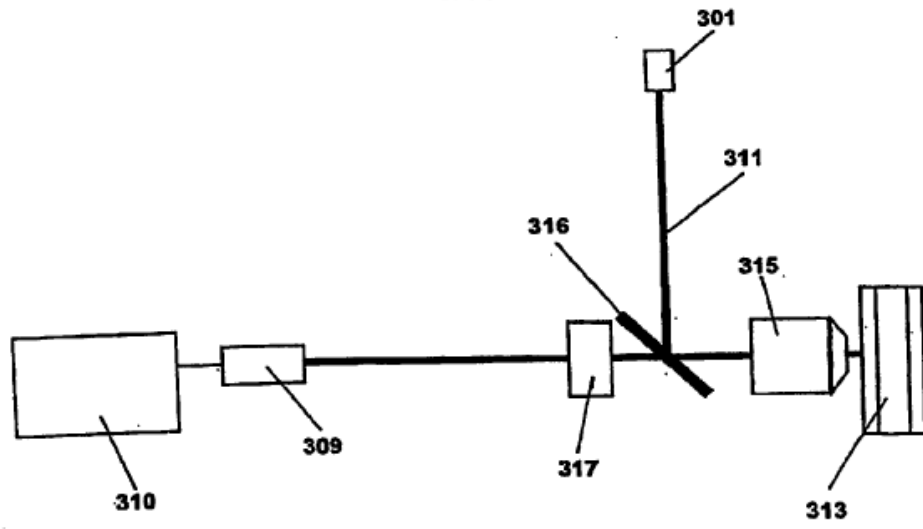


Figura 3A

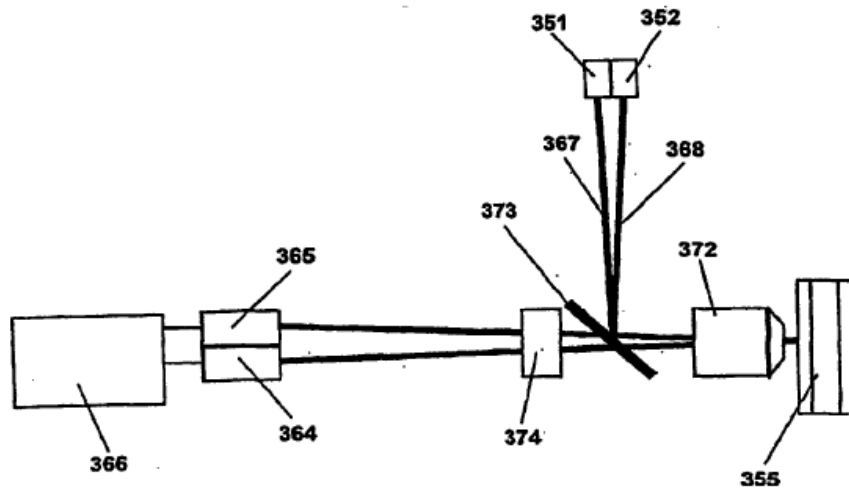


Figura 3B

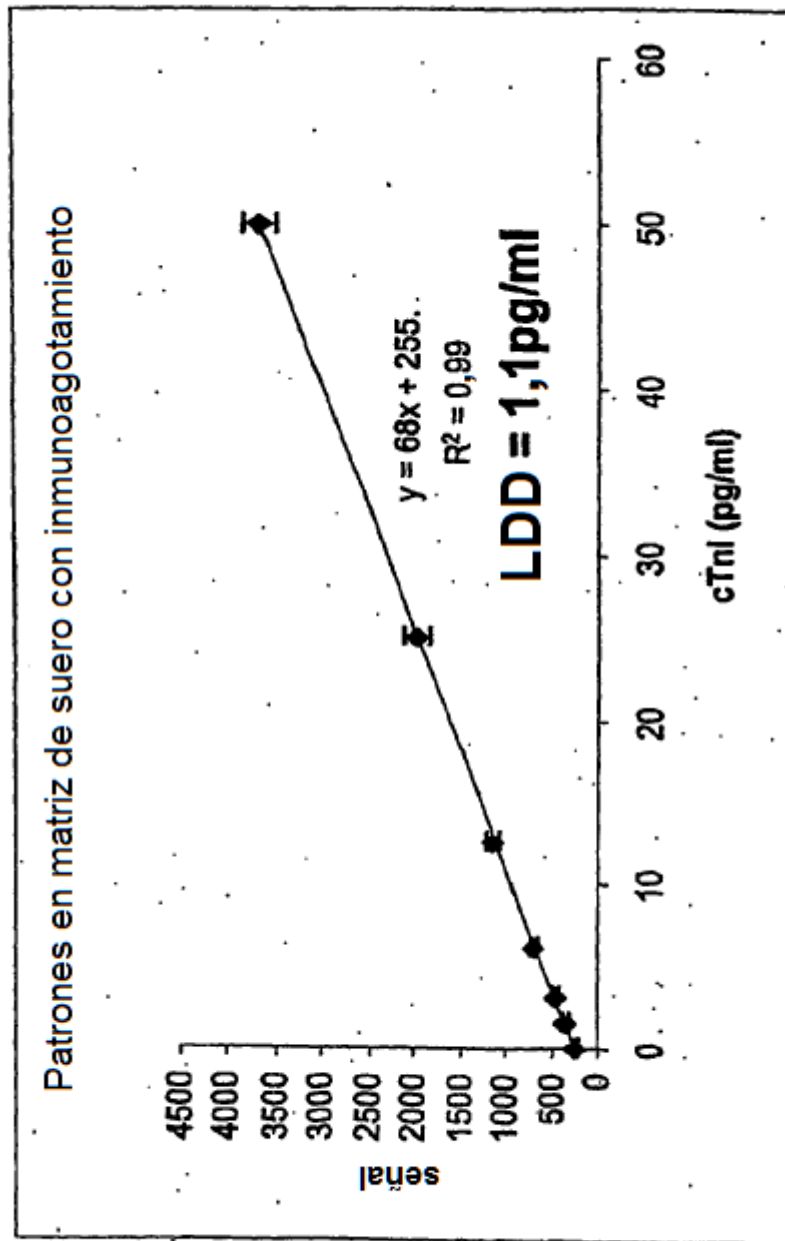


Figura 4

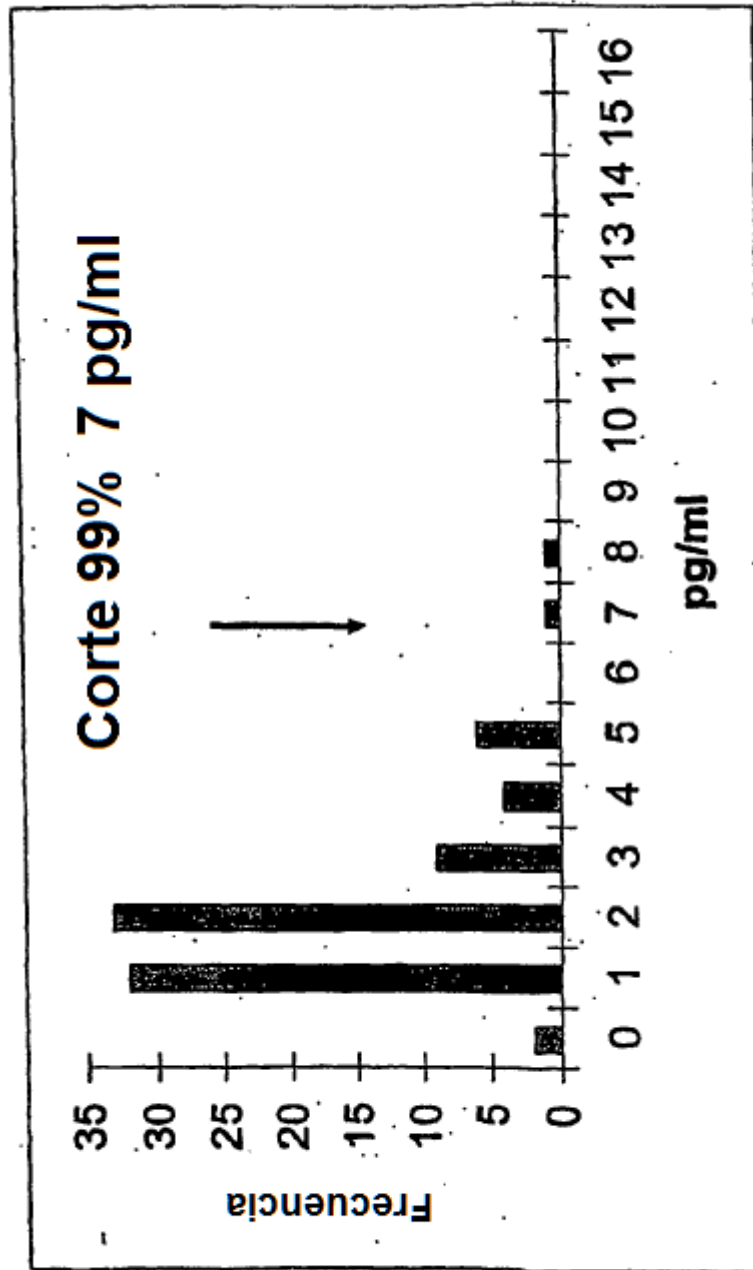


Figura 5

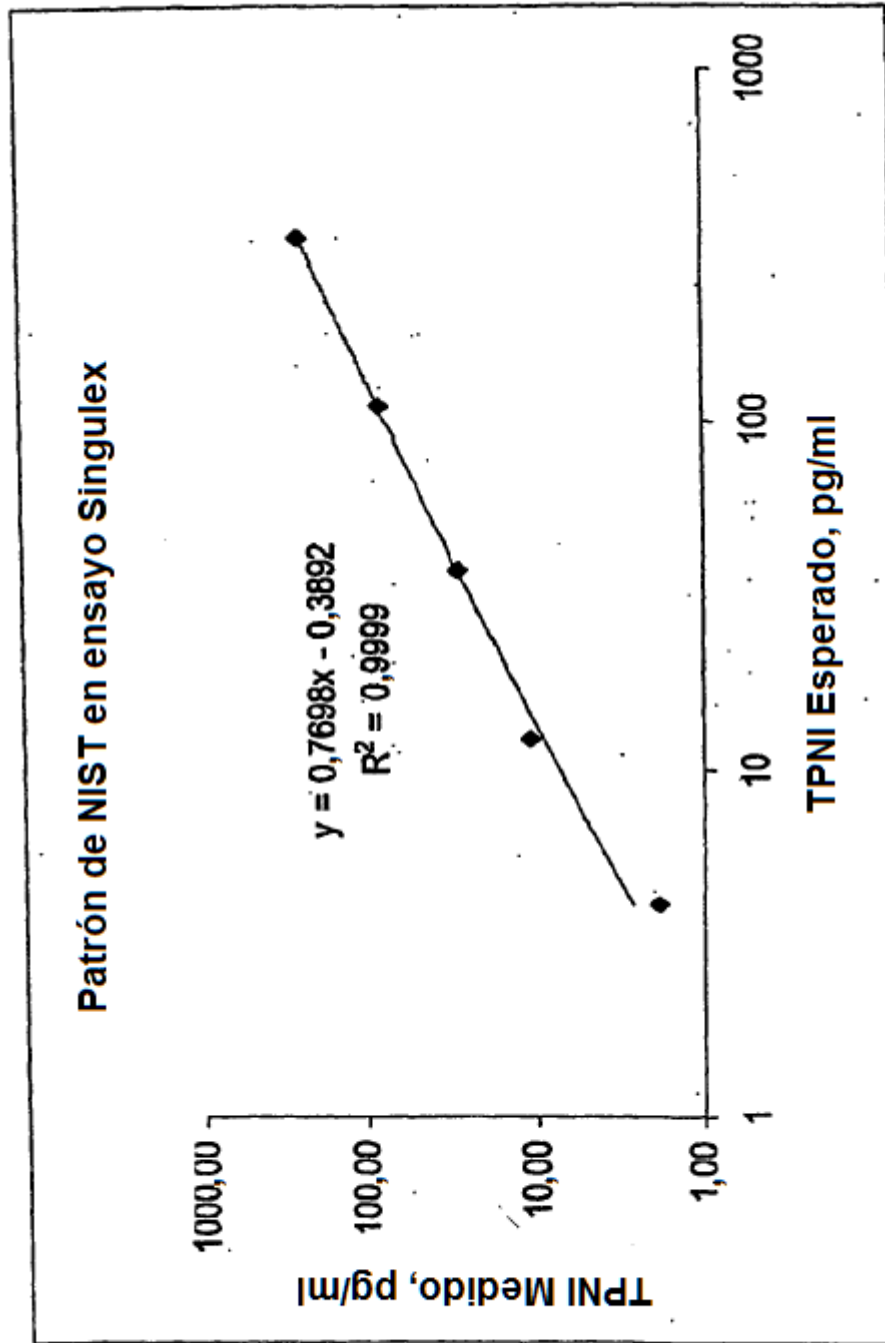


Figura 6

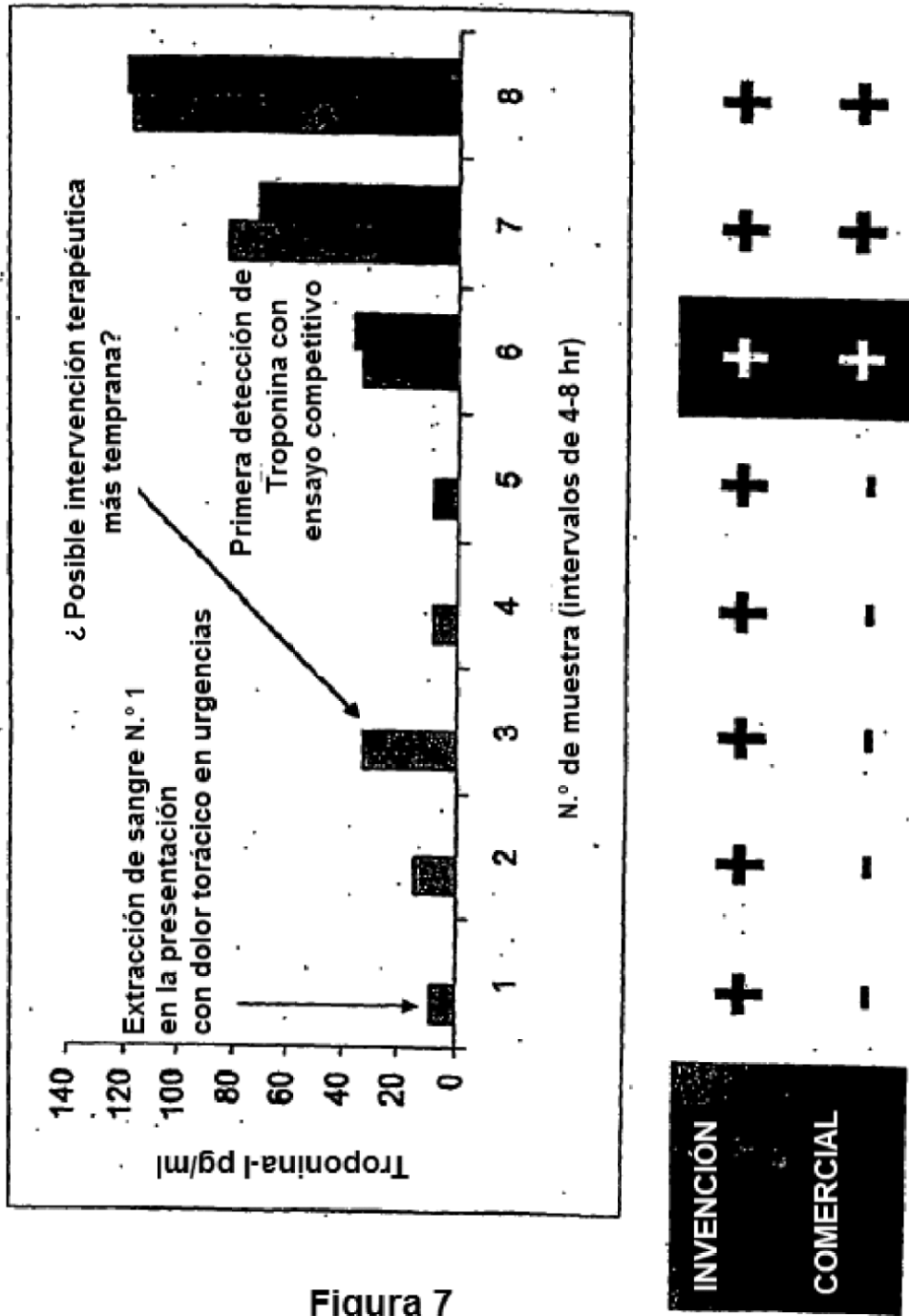


Figura 7

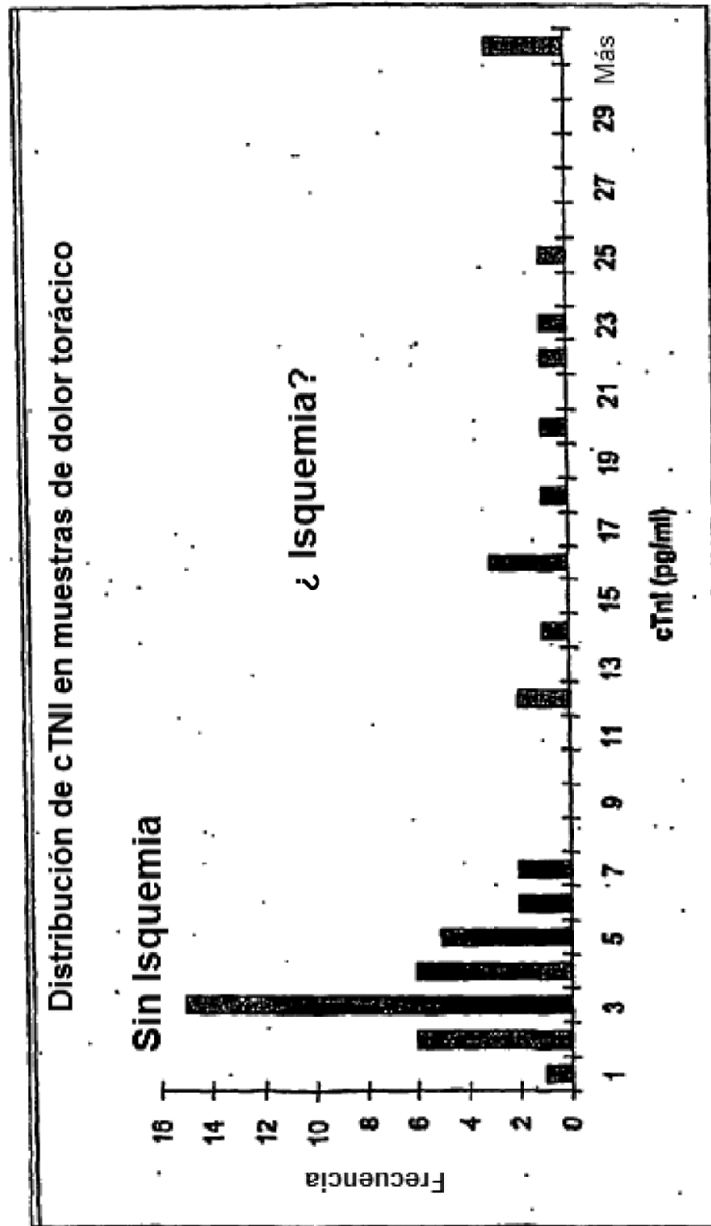


Figura 8