

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 057**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01J 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2012 PCT/US2012/065039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2012 E 12849449 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2780112**

54 Título: **Sistemas y métodos para mejorar la consistencia del rendimiento de un ensayo**

30 Prioridad:

**14.11.2011 US 201161559470 P**

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

**07.08.2020**

73 Titular/es:

**AUSHON BIOSYSTEMS INC. (100.0%)  
43 Manning Road  
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**HONKANEN, PETER;  
DOUGLAS, SCOTT;  
SULLIVAN, TRAVIS y  
ORENCOLE, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 778 057 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

Sistemas y métodos para mejorar la consistencia del rendimiento de un ensayo

### ANTECEDENTES

#### Campo de la invención

- 5 Las presentes invenciones se refieren a sistemas y métodos para mejorar la consistencia del rendimiento de un ensayo, incluyendo la preparación de sustratos de ensayo.

#### Descripción de la Técnica Relacionada

- 10 Un sustrato de ensayo es una superficie sobre la cual se pueden realizar diversos análisis químicos y/o biológicos. Ejemplos de un sustrato de ensayo incluyen placas de micromatrices, portaobjetos de vidrio y placas de microtitulación. Una placa de microtitulación es una placa plana que tiene múltiples "pocillos" formados en su superficie. Cada uno de los pocillos se puede utilizar como un pequeño tubo de ensayo en el que se pueden colocar diversos materiales para realizar análisis bioquímicos. El documento WO 03/012390 A2 se refiere a un método para detectar la presencia de hidrocarburos, tales como el petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos, en muestras ambientales utilizando un sustrato de prueba.

- 15 Un uso ilustrativo de placas de microtitulación incluye un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que es una técnica de ensayo diagnóstico médico moderno. Generalmente, en un ELISA se imprime un anticuerpo de captura en el fondo de un pocillo en una placa de microtitulación. El anticuerpo de captura tiene especificidad para un antígeno particular para el que se realiza el ensayo. Se añade una muestra a analizar al pocillo que contiene el anticuerpo de captura, y el anticuerpo de captura "captura" o inmoviliza el antígeno contenido en la muestra.
- 20 Luego se añade un anticuerpo de detección al pocillo, que también se une y/o forma un complejo con el antígeno. Luego se añaden otros materiales al pocillo, lo que hace que el anticuerpo de detección produzca una señal detectable. Por ejemplo, cuando la luz de una longitud de onda específica se ilumina sobre el pocillo, los complejos de antígeno/anticuerpo fluorescerán. La cantidad de antígeno en la muestra se puede inferir en función de la magnitud de la fluorescencia. En otro ejemplo, se puede añadir un compuesto al pocillo que hace que el anticuerpo de detección emita luz dentro de una longitud de onda predeterminada (por ejemplo, 400-500 nm). Esta luz puede ser leída por una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) para medir el brillo óptico de la luz emitida. El documento WO 2012/068372 A1 se refiere a métodos de y a sistemas para imprimir características de calibración en el pocillo, métodos y sistemas que pueden utilizarse para análisis químicos y/o biológicos, tales como para ELISA.

- 30 Durante un ELISA, la absorbancia, fluorescencia o señal electroquímica del pocillo puede ser medida y comparada con un patrón para determinar con mayor precisión la presencia y cantidad del antígeno de la muestra. Por ejemplo, una característica de calibración con una concentración conocida de antígeno se puede colocar en pocillos separados de los pocillos que reciben muestras de pacientes que contienen antígeno. Sin embargo, la variabilidad de la señal, tal como la variabilidad de fluorescencia, y la variabilidad de pocillo a pocillo en los pocillos separados puede disminuir la precisión y fiabilidad de los resultados del ensayo. Existe la necesidad de métodos y sistemas para proporcionar y mejorar la precisión, fiabilidad y sensibilidad de las técnicas de pruebas de diagnóstico médico y otros análisis bioquímicos. El documento US2011/027914A1 describe sistemas y métodos de placas de muestra. Sauvaigo et al; Analytical biochemistry; vol 333, nº 1, 1 de octubre de 2004; describe una micromatriz de oligatida para el control de la actividad de la enzima de reparación hacia diferentes daños en la base del ADN.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 La Figura 1 muestra un pocillo de ensayo con características de análisis dispuestas en un patrón de matriz de rejilla convencional.

Las Figuras 2A-C muestran una serie de vistas laterales en sección transversal de un pocillo en una placa de microtitulación durante un método conocido para realizar un ELISA.

- 45 La Figura 3 muestra un pocillo de ensayo con características de análisis dispuestas en un patrón de matriz circular de acuerdo con algunas realizaciones.

La Figura 4 muestra un método para preparar sustratos de ensayo con características de análisis dispuestas en un patrón de acuerdo con algunas realizaciones.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 50 Esta divulgación se refiere a sistemas y métodos para mejorar la consistencia del rendimiento de ensayos, tales como ensayos multiplexados. Los sistemas y métodos de acuerdo con la divulgación se definen en las reivindicaciones adjuntas. En otras realizaciones, el sustrato incluye, además, al menos una característica de calibración impresa en las características de análisis, en donde la característica de calibración tiene una o más

concentraciones conocidas de un compuesto que se une a las características de análisis; y al menos una característica de análisis adicional en el mismo pocillo del sustrato de prueba.

Los sistemas y métodos descritos aumentan las capacidades de detección de un ensayo bioquímico. Los sistemas y métodos descritos también aumentan el rendimiento del ensayo y reducen el tiempo de procesamiento para ejecutar experimentos y análisis, ya que se deben realizar menos ensayos debido a la mayor consistencia del rendimiento de los ensayos. Los sistemas y métodos reducen la inexactitud que puede resultar de la variabilidad de la señal y la variabilidad del día a día. Realizaciones de las invenciones aumentan el rendimiento y la eficiencia de todos los análisis bioquímicos (por ejemplo, ELISA), en donde la señal de salida está relacionada con la intensidad de la luz. Muestras adecuadas para uso en ensayos y otros análisis bioquímicos incluyen, pero no se limitan a muestras de, por ejemplo, lisados celulares, sobrenadantes celulares, plasma, suero y otros fluidos biológicos.

Convencionalmente, los patrones de características se imprimen en el fondo de los pocillos en un formato de rejilla, tal como un patrón rectangular o cuadrado. Sin embargo, un problema con un enfoque de este tipo es que cada una de las características del pocillo no interactúa de la misma manera con el fluido presentado en el pocillo debido a varias circunstancias. Primero, el efecto menisco provoca esta falta de interacción equivalente. El menisco es la curva en la superficie superior de un líquido cerca de la superficie de un recipiente, tal como un pocillo de ensayo, y es provocada por la tensión superficial. Debido a la geometría del pocillo de ensayo, se forma un menisco. En segundo lugar, cuando una placa de ensayo es estática, el volumen de fluido permanece relativamente uniforme. Sin embargo, las placas de ensayo son a menudo dinámicas. Las placas se mueven cuando se transfieren de un lugar a otro durante la experimentación. Además, las placas se pueden colocar en diversos equipos de laboratorio, incluidas las placas de agitación. Cuando se agita o mueve una placa, se hace girar el fluido, lo cual acentúa el efecto de menisco. Por lo tanto, las características en un pocillo no están expuestas a la misma cantidad de líquido.

Los sistemas y métodos descritos mejoran la consistencia de los ensayos mediante la impresión de características en un patrón que tiene en cuenta los factores comentados en esta memoria que conducen a características que no están expuestas a la misma cantidad de fluido. Las características se imprimen en un patrón tal que el borde exterior del patrón tiene una forma que es sustancialmente similar a la forma del pocillo de prueba.

Los sistemas y métodos descritos resultan en ensayos con sensibilidad, exactitud y precisión incrementadas. La "sensibilidad" es la capacidad de detectar niveles clínicamente importantes pero muy bajos de, por ejemplo, un anticuerpo. La "sensibilidad" de un ensayo se puede evaluar diluyendo secuencialmente muestras positivas conocidas y determinando la dilución a la que se pierde la reacción. Las muestras de prueba a menudo tienen cantidades bajas de analito, y los sistemas y métodos descritos permiten la detección de un analito incluso con muestras de prueba bajas. La "exactitud" de un ensayo se refiere a la capacidad de medir la cantidad de la sustancia en una muestra de ensayo al valor real (verdadero) de esa cantidad. "Precisión" se refiere a la capacidad del ensayo para reproducir consistentemente un resultado; es el grado en el que las mediciones repetidas en condiciones sin cambios muestran los mismos resultados. La precisión intra-ensayo y entre ensayos son dos medidas distintas de esta precisión.

En un patrón de rejilla de dos dimensiones convencional, un coeficiente de variación (CV) varía de aproximadamente 12% a aproximadamente 15%. La variabilidad de los ensayos bioquímicos se resume a menudo por el CV, que se define como la desviación estándar (SD) dividida por la media, y el resultado se representa a menudo como un porcentaje. Una razón para usar el CV es que las SD de ensayos de este tipo generalmente aumentan o disminuyen proporcionalmente a medida que la media aumenta o disminuye, de modo que la división por la media lo elimina como un factor en la variabilidad. El CV es una estandarización de la SD que permite la comparación de estimaciones de variabilidad independientemente de la magnitud de la concentración de analito, al menos en la mayor parte del intervalo de trabajo del ensayo. Los métodos y sistemas descritos producen resultados con intervalos de CV de aproximadamente 5% o menos, aproximadamente 4% o menos, aproximadamente 3% o menos, aproximadamente 2% o menos o aproximadamente 1% o menos.

La **Figura 1** muestra una vista en planta de un pocillo de ensayo con características dispuestas en un patrón de matriz de rejilla convencional. La **Figura 1** es una vista en planta de un pocillo de 100 pulgadas (254 cm), por ejemplo, en una plataforma basada en microtitulación. En una implementación ilustrativa, el sustrato del pocillo está formado por una base de poliestireno. Otros posibles materiales de sustrato incluyen, pero no se limitan a nitrocelulosa, vidrio y otros materiales plásticos. Durante la preparación de una placa de microtitulación para su uso en análisis bioquímicos, se imprimen en el pocillo muchas "características" 110 de análisis diferentes, que incluyen características de captura de anticuerpos o características de analito, y se adhieren a la base de poliestireno del pocillo. Tal como se utiliza en esta memoria, las "características" pueden tener diferentes formas, tales como, por ejemplo, una forma redondeada. El sustrato de ensayo puede ser, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos o 384 pocillos. El diámetro de cada una de las características puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  de diámetro, de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 700  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ . En un ejemplo, el CV para una matriz IL-6 de 3x3 9 Plex con un patrón de rejilla convencional es 14,0%. La distancia 120 desde un centro de una característica de análisis a un centro de una característica de análisis adyacente varía de aproximadamente 909  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1100  $\mu\text{m}$ , a

aproximadamente 1050  $\mu\text{m}$ . El diámetro del pocillo 100 varía de aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 7000  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 6580  $\mu\text{m}$ .

Los métodos y sistemas descritos producen resultados con intervalos de CV de aproximadamente 5% o menos. La **Figura 3** muestra una vista en planta de un pocillo de ensayo con características 310 dispuestas en un patrón de matriz circular de acuerdo con algunas realizaciones. En algunas realizaciones, un pocillo de ensayo tiene un intervalo de 8 a 16 características de análisis, 10 a 14 características, hasta 12 características. Utilizando una matriz IL-6 de 8 plex con un patrón circular, tal como se muestra en la **Figura 3**, se probó que el CV era solo del 2,4%, una mejora de más de 5 veces sobre los patrones de rejilla convencionales. En una realización, las características se imprimen en un patrón circular, de modo que la distancia radial desde el centro de la característica hasta el centro del pocillo es sustancialmente la misma para cada una de las características. En algunas realizaciones, el diámetro del pocillo 300 varía de aproximadamente 1,5 mm a aproximadamente 6,86 mm, de aproximadamente 2,4 mm a aproximadamente 6,4 mm, y es de aproximadamente 6,58 mm. En algunas realizaciones, el ángulo 330 formado, por ejemplo, por las líneas 320, es de aproximadamente 30°.

En algunas realizaciones, el diámetro de cada una de las características puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  de diámetro, de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 700  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, el radio del círculo 340 es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 mm, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mm, es de aproximadamente 1,93 mm.

Durante la preparación de una placa de microtitulación para su uso en análisis bioquímicos, muchas "características" 110 de análisis diferentes, que incluyen características de captura de anticuerpos o características de analito, se imprimen en el pocillo y se adhieren a la base de poliestireno del pocillo. Tal como se utiliza en esta memoria, las "características" pueden tener diferentes formas, tales como, por ejemplo, una forma redondeada. El sustrato de ensayo puede ser, por ejemplo, una placa de microtitulación de 96 pocillos o de 384 pocillos. El diámetro de cada una de las características puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 800  $\mu\text{m}$  de diámetro, de aproximadamente 350  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 700  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ . En un ejemplo, el CV para una matriz de IL-6 de 3x3 9 Plex con un patrón de rejilla convencional es 14,0%. La distancia 120 desde un centro de una característica de análisis a un centro de una característica de análisis adyacente varía de aproximadamente 909  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1100  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 1050  $\mu\text{m}$ . El diámetro del pocillo 100 varía de aproximadamente 5000  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 7000  $\mu\text{m}$ , hasta aproximadamente 6580  $\mu\text{m}$ .

En algunas realizaciones, las características están suficientemente distantes del borde exterior del pocillo de modo que las características se exponen a aproximadamente la misma cantidad de fluido, teniendo en cuenta el efecto de menisco y los efectos del movimiento del pocillo. En algunas realizaciones, la distancia desde el borde del pocillo hasta el centro de la característica es de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% del radio del pocillo. En otras realizaciones, la distancia desde el borde del pocillo hasta el centro de la característica es de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% y aproximadamente 50% del radio del pocillo. En algunas realizaciones, un ángulo, mostrado como 310, está formado por una primera línea que se extiende desde el centro de una característica hasta el centro del pocillo, y una segunda línea que se extiende desde el centro de una característica adyacente hasta el centro del pocillo, y el ángulo es sustancialmente el mismo para cada una de las características adyacentes.

La **Figura 2** muestra una serie de vistas laterales en sección transversal 200 de un pocillo 205 durante un método conocido para realizar un ELISA. La descripción de los métodos para realizar análisis bioquímicos, tal como un ELISA utilizando características de calibración en el pocillo, se describe en la Solicitud Internacional N° PCT/US2011/061184, titulada *Método de y Sistema para Imprimir Características de Calibración en Pocillo*, presentada el 17 de noviembre de 2011. Solo se muestra una característica en la Figura 2A para mayor claridad, pero se entiende que realizaciones de las invenciones incluyen características impresas alrededor del fondo del pocillo, tal como en un patrón circular u ovalado. En algunas realizaciones, después de que la característica de captura de anticuerpo 210 se haya impreso en el fondo del pocillo 205, se añade un material de bloqueo al pocillo para bloquear los sitios de unión a la placa 215 que permanecen en la placa 200. Esto evita la unión no selectiva de antígenos de muestra a la base del pocillo durante el ELISA, lo que daría lecturas falsas. En segundo lugar, se añade al pocillo una muestra que contiene antígeno. La Figura 2B muestra el antígeno 220 que se une a la característica de captura de anticuerpo 210. En tercer lugar, el pocillo se lava para separar el antígeno no unido. Cuarto, se añaden anticuerpos detectados ligados a enzimas. La Figura 2C muestra el anticuerpo 230 de detección ligado a enzima que se une al antígeno 220. Luego se lava el pocillo, de modo que se separan los conjugados de anticuerpo-enzima no unidos. A continuación, se aplica una sustancia que convierte la enzima en una señal detectable, tal como una señal de color, fluorescente o electroquímica. Finalmente, se mide la absorbancia, fluorescencia o señal electroquímica del pocillo y se compara con un patrón para determinar la presencia y cantidad del antígeno de muestra. Se puede generar un estándar imprimiendo características de calibración con una

concentración conocida de antígeno en pocillos que están separados o son iguales a los pocillos que reciben muestras de pacientes.

Inmunoensayos multiplexados incluyen técnicas de avance de fase, en donde la proteína diana se detecta utilizando marcaje directo, o técnicas de ensayo de sándwich, tal como se describe anteriormente con la técnica ELISA, en donde se detecta la proteína diana utilizando un anticuerpo secundario marcado. Sin embargo, la divulgación en esta memoria no se limita a las técnicas de fase directa o sándwich e incluye la aplicación de técnicas de fase inversa. En las matrices de fase inversa, primero se añade al pocillo una muestra que contiene antígeno (que incluye, pero no se limita a líneas celulares, muestras de tejido, muestras de sangre o cualquier otra fuente de material proteómico), seguido de las etapas de lavado y la adición de anticuerpos que se detectan.

La **Figura 4** muestra un método 400 de preparar sustratos de ensayo de acuerdo con algunas realizaciones. Tal como se comenta en esta memoria, aunque la **Figura 4** describe técnicas de ensayo en sándwich, la divulgación instantánea abarca otras técnicas de ensayo conocidas en la técnica, que incluyen técnicas de fase directa y de fase inversa. En la presente divulgación, al imprimir características con patrones específicos, tales como patrones circulares u ovalados, el método 400 reduce o elimina la inexactitud e imprecisión que puede resultar de la variabilidad de la señal y la variabilidad de pocillo a pocillo. El método 400 no solo reduce la varianza de los resultados del ensayo, sino que también aumenta el rendimiento, ya que la consistencia de los resultados del ensayo reduce el número de veces que se deben realizar análisis para obtener resultados exactos y precisos.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "placa diana" es una placa que se ha de preparar (por ejemplo, impresa, bloqueada y procesada para uso posterior) para un conjunto particular de análisis. Una "placa fuente" es una placa que tiene un suministro del material a imprimir en una placa diana. Por ejemplo, los pocillos de una placa fuente pueden llenarse con diversos tipos de anticuerpos que deben imprimirse en placas diana. De acuerdo con el método 400, la placa fuente se prepara para el proceso de impresión (etapa 410). Esto puede incluir llenar los pocillos de la placa fuente con el material deseado para imprimir en la placa diana. A continuación, la placa diana está preparada para la impresión (etapa 420). Esto puede incluir lavar y/o realizar otros tratamientos de superficie para permitir que el material a imprimir se adhiera correctamente a la superficie inferior de la placa.

Las placas fuente y diana se colocan entonces en un aparato de impresión (por ejemplo, un Arrayer 2470 disponible de Aushon Biosystems, Inc. de Billerica, MA) (etapa 430). En algunas realizaciones, las características de anticuerpos de captura se imprimen en los pocillos de la placa diana de acuerdo con cualquiera de los patrones descritos en esta memoria (etapa 440). El borde exterior del patrón tiene una forma que es sustancialmente similar a la forma del pocillo de prueba.

Las características se imprimen en un patrón circular, de tal manera que la distancia radial del centro de la característica al centro del pocillo es la misma para cada una de las características. Las características se imprimen lo suficientemente lejos del borde del pocillo de modo que las características están expuestas a aproximadamente la misma cantidad de fluido. Aunque no están ligadas teoría alguna, las características están espaciadas desde el borde del pocillo para evitar una comunicación cruzada de señales con la unión no específica que se produce en la unión de la pared del pocillo y el fondo del pocillo. La precisión de los algoritmos automáticos de identificación de características y extracción de datos disminuye cuando las características están demasiado cerca de la pared del pocillo - la unión no específica en la unión pared/fondo del pocillo confunde los algoritmos, provocando que la unión no específica se identifique como la "característica" en lugar de la característica real. En algunas realizaciones, la distancia desde el borde exterior del pocillo al centro de la característica es de aproximadamente 10% a aproximadamente 90% del radio del pocillo. En otras realizaciones, la distancia desde el borde exterior del pocillo hasta el centro de la característica es de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 60% y de aproximadamente el 50% del radio del pocillo.

Opcionalmente, las características de calibración con una concentración conocida de un antígeno se imprimen con precisión sobre las características del anticuerpo de captura (etapa 450). La conocida concentración de un antígeno varía del orden de femtogramos ( $10^{-15}$  g) por mililitro a miligramo ( $10^{-3}$  g) por mililitro. Esta etapa de impresión utilizando el aparato de impresión de carga (p. ej., el 2470 Arrayer), independientemente del tamaño de los pines del aparato, puede imprimir las características de calibración con precisión en las características de anticuerpos de captura en los patrones divulgados. En algunos casos, el alineamiento posicional erróneo entre las características de calibración y las características del anticuerpo de captura es de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  o menos. También pueden tolerarse alineamientos posicionales erróneos entre las características de calibración y las características de captura de anticuerpos de más de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ , dependiendo del tamaño de las características. Por ejemplo, cuando las características de impresión están en el intervalo de aproximadamente 120  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 240  $\mu\text{m}$  de diámetro, se puede tolerar un alineamiento posicional erróneo entre las características de calibración y las características de anticuerpos de captura de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . 240  $\mu\text{m}$  de diámetro, se puede tolerar un alineamiento posicional erróneo entre las características de calibración y las características de anticuerpos de captura de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .

- En algunas realizaciones, se incuba la placa diana impresa durante un período de tiempo (etapa 460), y un material de bloqueo, que no reacciona con el anticuerpo de captura, se aplica a la placa diana utilizando métodos conocidos (etapa 470). El material de bloqueo se adsorbe a las superficies de unión restantes de la placa y se une a antígenos de interacción no específica, reduciendo así la señal de fondo. La placa diana impresa se seca luego (etapa 480).
- 5 En una implementación ilustrativa, se aplica una solución de material de bloqueo a las superficies de los fondos de una pluralidad de pocillos en una placa de microtitulación a través de un proceso de pulverización, tal como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 13.206.775, titulada *Método de y Sistema para Aplicar Material de Bloqueo a Sustratos de Ensayo*, presentada el 10 de agosto de 2011.
- 10 En algunas realizaciones, la placa diana se procesa entonces para el uso o almacenamiento utilizando métodos conocidos (etapa 490). Por ejemplo, la placa diana puede incubarse a aproximadamente 4°C durante la noche. Alternativamente, el exceso de material de bloqueo (p. ej., el material de bloqueo que no se ha unido al fondo del pocillo) puede retirarse de la placa diana, luego la placa puede secarse y luego la placa puede colocarse en un paquete resistente a la humedad para el almacenamiento. Las placas se pueden utilizar para realizar análisis químicos y/o biológicos, tales como con un ELISA.
- 15 Los parámetros operacionales específicos arriba proporcionadas son meramente ilustrativos, y otros valores están dentro del alcance de las invenciones.
- Se pueden hacer kits que incorporen los sistemas descritos en esta memoria junto con cualquier combinación de equipos relacionados o reactivos, tales como reactivos informadoras o software para la lectura de los resultados del ensayo.
- 20 Las realizaciones arriba descritas se pueden utilizar para detectar la presencia de antígenos y proteínas en un paciente, tal como un paciente que tiene una enfermedad autoinmune, anticuerpos contra enfermedades virales, anticuerpos contra enfermedades bacterianas, anticuerpos contra reacciones alérgicas o anticuerpos contra cánceres.

## REIVINDICACIONES

1. Un sustrato de ensayo que comprende:  
un material de sustrato que define al menos un pocillo (300), teniendo el al menos un pocillo (300) una superficie inferior, un centro y al menos una pared lateral,
- 5 teniendo la al menos una pared lateral una forma de sección transversal cuando se encuentra en un plano paralelo a la superficie inferior, en donde el al menos un pocillo (300) es circular; y  
un conjunto de características de análisis (310) impresas en la superficie inferior en un patrón circular, teniendo el patrón circular una forma que es similar a la forma de la sección transversal de al menos una pared lateral; caracterizado por que:
- 10 todas las características de análisis en el al menos un pocillo (300) están dispuestas a una distancia desde un borde exterior del al menos un pocillo (300), en donde una distancia desde un centro de cada una de las características hasta el centro del pocillo es la misma para cada una de las características.
2. El sustrato de la reivindicación 1, que comprende, además:  
al menos una característica de calibración impresa en al menos una, pero no en todas del conjunto de características de análisis (310), en donde la al menos una característica de calibración tiene una o más concentraciones conocidas de un compuesto que se une al conjunto de características de análisis (310).
- 15 3. El sustrato de la reivindicación 1, en donde el conjunto de características de análisis (310) está dispuesto de tal manera que un ángulo está formado por una primera línea que se extiende desde el centro de una característica hasta el centro de al menos un pocillo (300) y una segunda línea que se extiende desde el centro de una característica adyacente al centro de al menos un pocillo (300), en donde el ángulo es el mismo para cada una de las características adyacentes.
- 20 4. El sustrato de la reivindicación 1 o 2, la distancia desde el borde exterior de al menos un pocillo al centro de cada una de las características de análisis (310) es de 10% a 90% de un radio del al menos un pocillo, opcionalmente en donde la distancia es de 20% a 80% del radio de al menos un pocillo (300).
- 25 5. El sustrato de cualquier reivindicación precedente, en donde en uso el sustrato de ensayo produce resultados con un coeficiente de variación de 5% o menos en un análisis bioquímico.
6. Un método para preparar un sustrato de ensayo, que comprende:  
determinar una forma de sección transversal de un pocillo (300) de un sustrato de ensayo, teniendo el pocillo (300) una superficie inferior, un centro y al menos una pared lateral, teniendo la al menos una pared lateral la forma de sección transversal cuando se encuentra en un plano paralelo a la superficie inferior, en donde el pocillo (300) es circular; e
- 30 imprimir un conjunto de características de análisis (310) en la superficie inferior en un patrón circular, teniendo el patrón circular una forma que es similar a la forma de la sección transversal del pocillo (300), caracterizado por que:  
todas las características de análisis en los pocillos (300) están dispuestos en el patrón circular de modo que cada una de las características de análisis esté dispuesta a una distancia desde un borde externo del pocillo (300), de modo que una distancia desde un centro de cada una de las características de análisis al centro del pocillo (300) es la misma para cada una de las características de análisis.
- 35 7. El método de la reivindicación 6, que comprende además:  
imprimir al menos una característica de calibración con una o más concentraciones conocidas de un compuesto que se une al conjunto de características de análisis (310) en el pocillo (300),  
en donde el pocillo (300) contiene al menos una característica de análisis en el conjunto de características de análisis con la al menos una característica de calibración impresa en la parte superior de la al menos una característica de análisis, y al menos una característica de análisis libre de una característica de calibración impresa en la parte superior de la función de análisis.
- 40 8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde el conjunto de características de análisis (310) se dispone a una distancia desde el borde exterior del pocillo (300), en donde la distancia desde el borde exterior del pocillo hasta el centro de cada uno de las características (310) son del 10% al 90% de un radio del pocillo, opcionalmente en donde la distancia es de 20% a 80% del radio del pocillo.
- 45 9. El método de la reivindicación 6, que comprende, además:  
incubar el sustrato de ensayo impreso;  
aplicar material de bloqueo al sustrato de ensayo impreso;  
secar el sustrato de ensayo impreso; y  
procesar el sustrato de ensayo impreso para su uso o almacenamiento.
- 50

10. El método de la reivindicación 9, en el que el sustrato de ensayo impreso se utiliza para realizar uno o más análisis bioquímicos.
11. El método de la reivindicación 10, en el que el coeficiente de variación del uno o más análisis bioquímicos es del 5%.
- 5 12. El método de la reivindicación 11, en el que el uno o más análisis bioquímicos es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

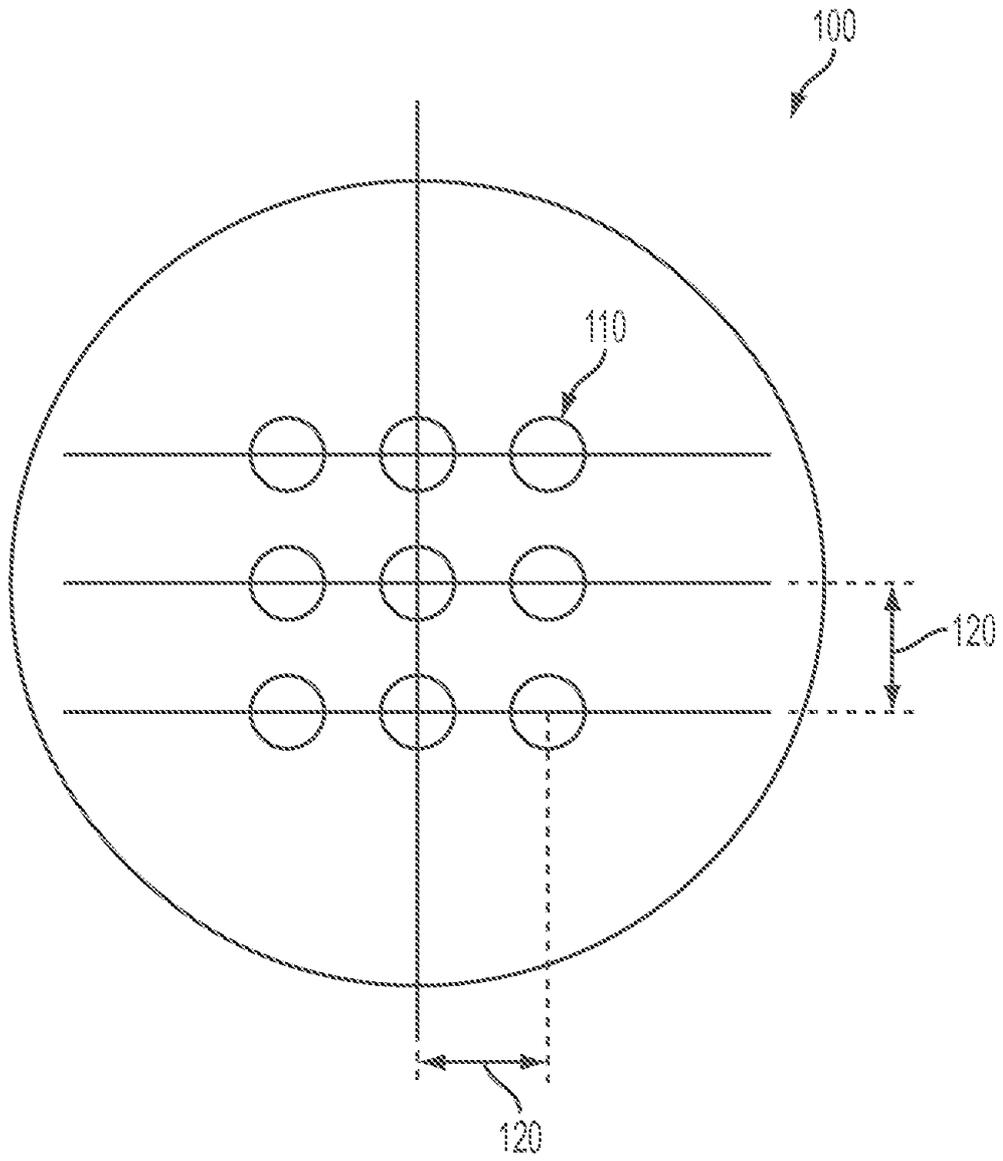


FIG. 1

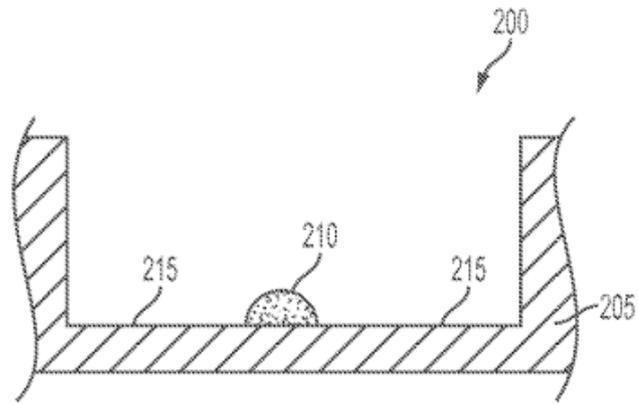


FIG. 2A

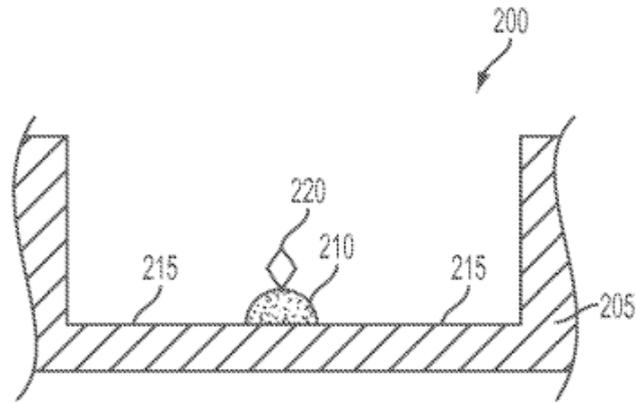


FIG. 2B

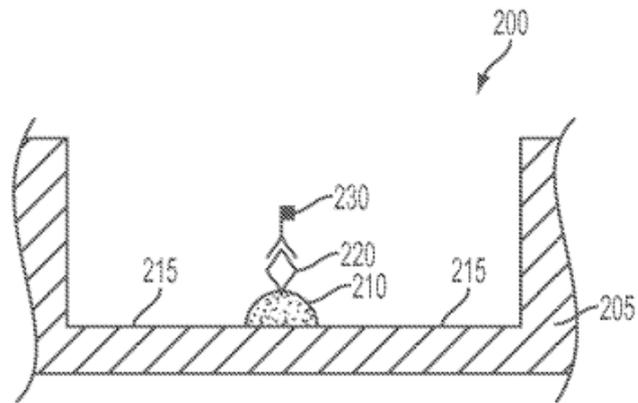


FIG. 2C

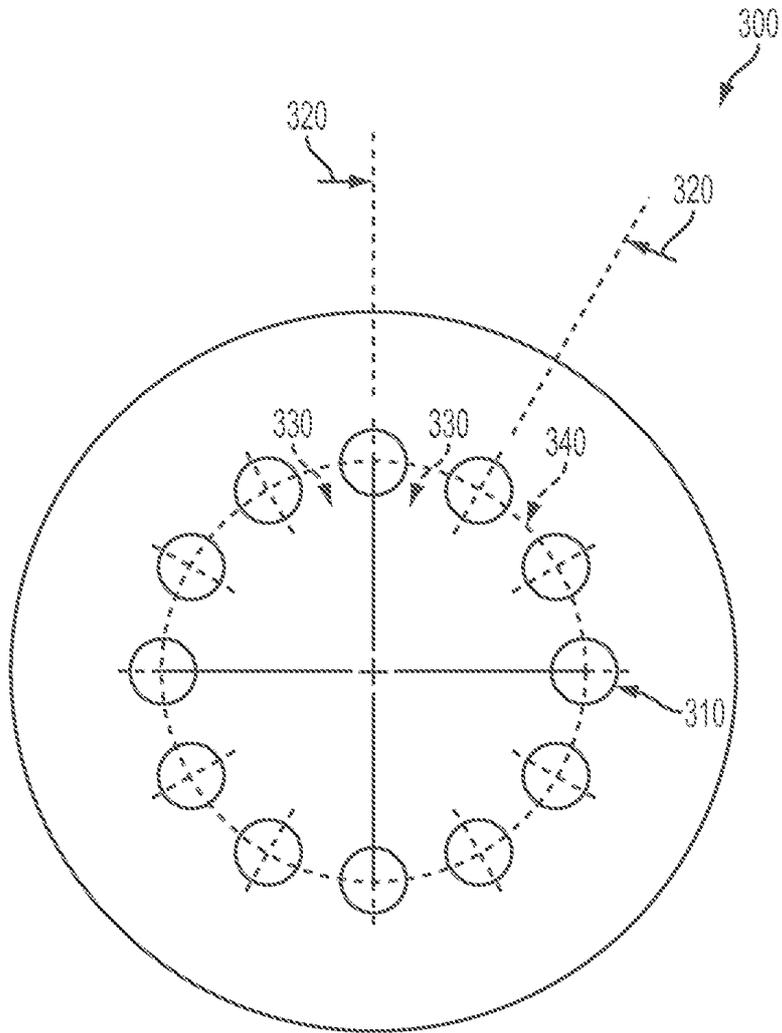


FIG. 3

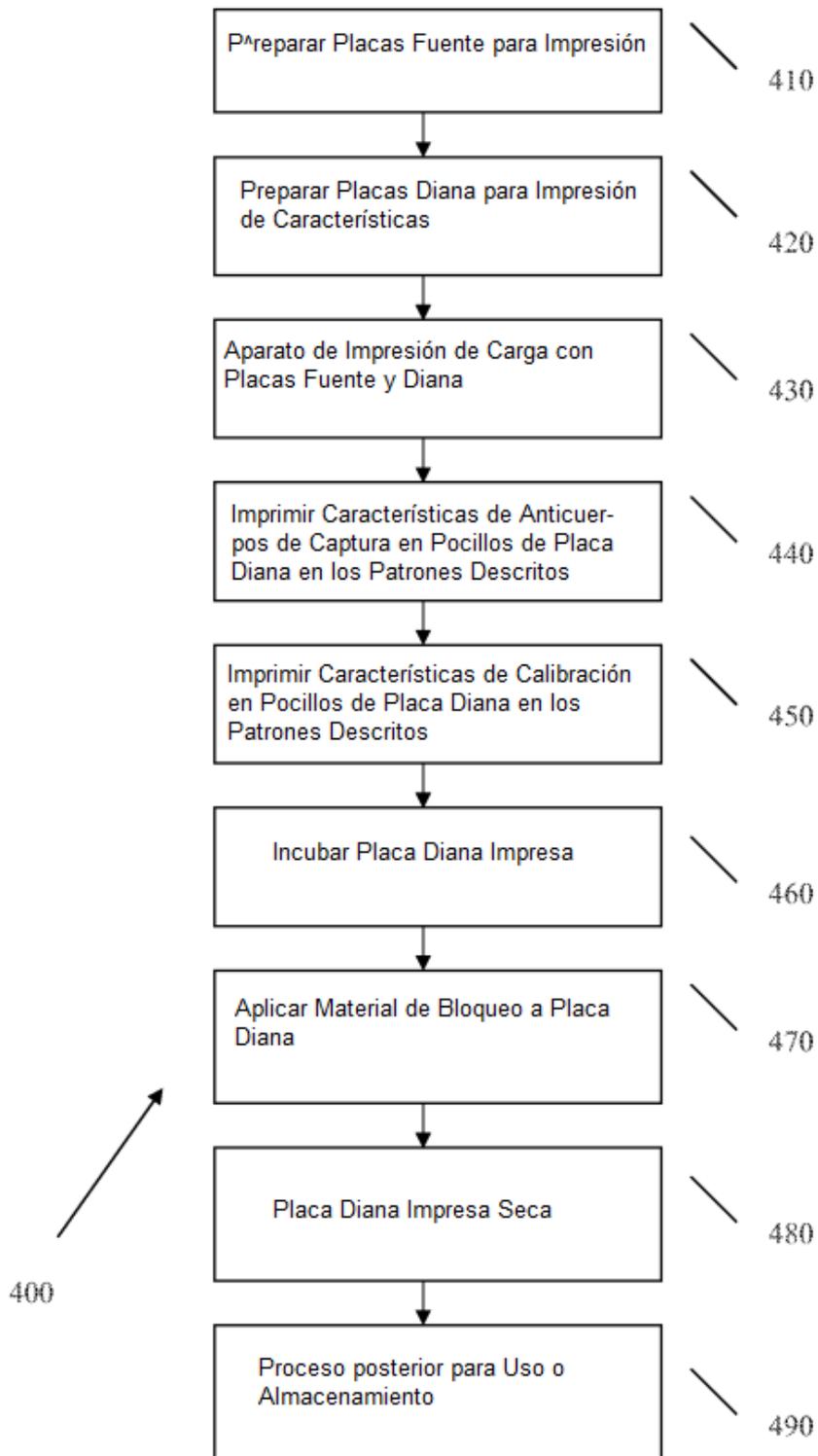


FIG. 4