

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 727**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2015 PCT/GB2015/050338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15118347**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2015 E 15705367 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3102953**

54 Título: **Pruebas cruzadas de muestras de sangre**

30 Prioridad:

07.02.2014 GB 201402174

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

21.12.2020

73 Titular/es:

**QBD (QS-IP) LIMITED (100.0%)
Elizabeth House PO Box 1075 9 Castle Street
St Helier JE4 2QP, GB**

72 Inventor/es:

**ROBB, JANINE SCOTT;
ROBSON, DAVID COOPER;
RENAULT, NEIL KEVIN y
CLAXTON, CHRISTOPHER ROBERT JAMES**

74 Agente/Representante:

FLORES DREOSTI, Lucas

ES 2 799 727 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

Pruebas cruzadas de muestras de sangre

ÁMBITO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente divulgación facilita métodos novedosos para la detección de anticuerpos, en concreto, anticuerpos de grupo sanguíneo. Los métodos de esta invención pueden aplicarse a pruebas de compatibilidad sanguínea previas a la transfusión para la detección de incompatibilidades entre los glóbulos rojos (eritrocitos) del donante y el plasma del receptor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 **[0002]** Las pruebas cruzadas son parte de los procedimientos de compatibilidad previos a la transfusión que se llevan a cabo en laboratorios de transfusión sanguínea: las pruebas incluyen determinación de grupo ABO y RhD, cribado de anticuerpos, identificación de anticuerpos, pruebas cruzadas directas o indirectas.

15 **[0003]** Los laboratorios con servicios de transfusión realizan de manera rutinaria pruebas de tipificación ABO y RhD, tipificación ABO inversa y cribado de anticuerpos irregulares en todos los pacientes. Esto se lleva a cabo para facilitar sangre con compatibilidad ABO y RhD y que carezca del antígeno del grupo sanguíneo para el que el paciente tiene un anticuerpo; esto evitará o reducirá el riesgo de que los eritrocitos transfundidos del donante sean destruidos por el paciente. En el caso de que el cribado de anticuerpos resulte positivo, se llevará a cabo una investigación de identificación de anticuerpos para identificar el anticuerpo presente, a menudo denominado anticuerpo de grupo sanguíneo irregular pues su presencia no se espera, a diferencia de los anticuerpos de grupo sanguíneo regulares como anti-A o anti-B, formados sin estimulación de antígeno conocida y debido a factores ambientales. Un cribado o identificación de anticuerpos implica el uso de plasma/suero del paciente sometido a ensayo frente a un panel de muestras de eritrocito especialmente seleccionadas, que portan los antígenos de grupos sanguíneos clínicamente significativos contra los que se dirigen los anticuerpos de grupos sanguíneos irregulares.

20 **[0004]** Si un cribado de anticuerpos arroja un resultado negativo, puede utilizarse un programa de compatibilidad informático para seleccionar las unidades adecuadas para la transfusión al paciente. Esto puede suceder solo cuando la validación y adherencia adecuada a las directrices da al laboratorio autorización para ello. Sin embargo, si el cribado de anticuerpos es positivo y hay un anticuerpo presente, deben llevarse a cabo pruebas de compatibilidad adicionales. Esto incluirá una prueba cruzada e investigación de identificación del anticuerpo completa. Las pruebas de compatibilidad, aquí denominadas pruebas cruzadas, incluyen someter a ensayo el plasma/suero del paciente frente a unidades de eritrocitos del posible donante.

25 **[0005]** Las unidades de eritrocitos del donante deben seleccionarse del mismo grupo ABO y Rh que el paciente, y negativas para el antígeno del grupo sanguíneo para el que el paciente tiene un anticuerpo. A menudo esto implica la tipificación sanguínea de las unidades de eritrocitos del donante para encontrar aquellas que son negativas para el antígeno en cuestión, aunque según el régimen de ensayos rutinarios del servicio de transfusión esta prueba puede haberse llevado a cabo en el momento de análisis de las unidades del donante.

30 **[0006]** Tradicionalmente, las pruebas de compatibilidad se han llevado a cabo como una prueba de aglutinación en un tubo de ensayo. Más recientemente, esta prueba también se ha llevado a cabo utilizando microplacas de fase sólida y técnicas de aglutinación en columna (también conocidas como Gel, CAT). Sin embargo, esta prueba resulta algo laboriosa por requerir múltiples etapas de lavado y centrifugación. La prueba sigue los principios de la prueba de antiglobulina indirecta (IAT, IAGT); se permite que una suspensión de eritrocitos se incuba con una muestra de plasma/suero/reactivo de tipificación sanguínea o control. Durante esta primera etapa, si hay un anticuerpo presente y el antígeno al que es específico también está presente en los eritrocitos, se producirá una unión del anticuerpo al antígeno. Esta etapa se denomina sensibilización. Tras la sensibilización, se requieren etapas de lavado para separar los anticuerpos no unidos en solución, de los eritrocitos sensibilizados. Tras esta etapa de lavado, se añade un reactivo antiglobulina humana; este contiene anticuerpos anti-IgG humana y a menudo anti-C3. Si un anticuerpo ha sensibilizado los eritrocitos, la anti-IgG humana se unirá al anticuerpo IgG en los eritrocitos provocando hemaglutinación. En las pruebas convencionales, la incompatibilidad de IgM se identifica a través de hemaglutinación directa, sin la etapa previa de sensibilización. La hemaglutinación es el punto final utilizado para la detección de una reacción de sensibilización. La ausencia de eliminación de la IgG no unida puede llevar a la neutralización de la anti-IgG humana presente en el reactivo antiglobulina humana y potencialmente llevar a un resultado de falso negativo. Normalmente, esto se controla mediante la adición de células sensibilizadas con IgG a todas las pruebas IAT negativas; aquí un resultado positivo indica que la anti-IgG humana está disponible y no ha sido neutralizada y, por tanto, ha tenido lugar una eliminación/lavado adecuados de anticuerpo no unido. Si la prueba es negativa, puede demostrar que las regiones de unión de la anti-IgG humana están bloqueadas, y

muy probablemente «neutralizadas», y puede concluirse que la prueba es inválida debido a una eliminación de anticuerpos no unidos o lavado insuficientes.

5 **[0007]** El estado de la técnica actual incluye sistemas disponibles en el mercado como Capture-R de Immucor y ID-System de BioRad y BioVue de Ortho Clinical Diagnostics y sistemas ID-MTS, y a pesar de que hay disponibles numerosas variaciones diferentes, son muy similares en principio a los sistemas mencionados anteriormente. Los sistemas de fase sólida, como Capture-R Select de Immucor implican la unión de los eritrocitos del donante a un pocillo de una microplaca, seguido de incubación con plasma/suero del paciente, etapas de lavado y finalmente la adición de células indicadoras (células recubiertas con anti-D y un nivel de anti-IgG) de manera que donde el anticuerpo haya sensibilizado los eritrocitos unidos del donante, la anti-IgG en las células indicadoras también se unirá al anticuerpo del donante unido a los eritrocitos del donante. En este ejemplo, son necesarias etapas de lavado para eliminar anticuerpo no unido. Las técnicas de aglutinación en columna utilizan un microtubo que contiene anti-IgG humana (y/o anti-C3) y utilizan un pocillo sobre el microtubo para permitir la incubación/sensibilización de células del donante con plasma/suero del paciente, antes de la centrifugación a través de la columna que contiene anti-IgG humana. En este caso, se utiliza la centrifugación para separar el anticuerpo no unido, pues los eritrocitos son llevados a través del microtubo por centrifugación dejando los anticuerpos no unidos en el pocillo sobre el microtubo ya que la fuerza centrífuga es apropiada para conducir a las células hacia abajo pero no es suficiente para permitir que el anticuerpo no unido entre en la columna anti-IgG.

20 **[0008]** EP0760103 (Den Bohr *et al*) describe un método para someter a ensayo en una muestra un antígeno de grupo sanguíneo presente en un eritrocito o un anticuerpo que se une al mismo. El método implica crear complejos antígeno/anticuerpo y separarlos por filtración a través de una fase sólida que es una membrana porosa permeable a los eritrocitos no complejos, en cuya membrana se inmoviliza un material de unión a inmunoglobulina. La filtración es realizada mediante centrifugación.

25 **[0009]** WO2012/010666 (Fauconnier *et al*) describe un método de inmunodiagnóstico magnético para la determinación de complejos anticuerpo/antígeno de grupo sanguíneo y fenotipo. El método implica la detección y/o identificación de anticuerpos o antígenos, preferiblemente anticuerpos antiantígeno o antígenos de un grupo sanguíneo. En concreto, el método implica una suspensión de partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-glicoforina A que puede reconocer y magnetizar de forma específica eritrocitos.

30 US2007/0172899 (Graham *et al*) describe un método para la prueba cruzada de muestras de sangre. El método descrito cuenta con una etapa en la que unas partículas magnéticas recubiertas con un reactivo de unión a hematóf universal (por ejemplo, un anticuerpo antiglobulinas rojas humanas de ratón o lectina) son incubadas con los glóbulos rojos y el suero/plasma del paciente.

35 **[0010]** Los sistemas actuales descritos anteriormente utilizan centrifugación y/o etapas de lavado para separar los eritrocitos sensibilizados del anticuerpo no unido. Dichos procedimientos requieren reactivos y mucho tiempo y, por tanto, hacen que los procesos de la técnica anterior sean menos adecuados para un cribado rápido de alto rendimiento.

40 **[0011]** La presencia de antígenos (incluyendo antígenos de grupo sanguíneo) en la superficie de eritrocitos forma la base de numerosas pruebas inmunológicas que incluyen, por ejemplo, ensayos de tipificación sanguínea que utilizan microarrays de proteínas sin aglutinación, en los que un anticuerpo inmovilizado se une a un antígeno en la superficie de los eritrocitos, y la presencia de eritrocitos así inmovilizados es detectada (J S Robb *et al* 2006). La tecnología de microarrays de anticuerpos puede utilizarse también para determinar el fenotipo de eritrocitos mediante la detección de mezclas complejas de antígenos en las superficies de las células (C J Campbell *et al* 2006). Los antígenos expresados por los eritrocitos son tanto antígenos azúcar, que tienden a estar bien representados y ser fácilmente accesibles, y antígenos péptido y proteína, que son epítomos de proteínas transmembrana y, por tanto, enterrados y mantenidos de manera más cercana a la superficie de la célula, y estos fueran diferenciados con éxito utilizando la elección correcta de anticuerpos.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0012] Según un aspecto principal de la presente invención, se facilita un método de prueba cruzada de muestras de sangre como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

50 **[0013]** La presente divulgación facilita métodos novedosos para la detección de anticuerpos, en concreto, anticuerpos de grupo sanguíneo. Los métodos de esta invención pueden aplicarse a pruebas de compatibilidad sanguínea previas a la transfusión para la detección de incompatibilidades entre las unidades del donante (que comprenden los glóbulos rojos (eritrocitos) del donante) y un receptor.

[0014] Los glóbulos rojos puede parecer «extraños» para el sistema inmunitario de un huésped si expresan antígenos que no se encuentran en los glóbulos rojos de ese huésped. Es por esta razón que la sangre debe someterse a pruebas cruzadas de manera cuidadosa antes de ser transfundida. Por ejemplo, algunos glóbulos rojos expresan antígenos de tipo A; la sangre en la que los glóbulos rojos expresan el antígeno del grupo sanguíneo A se denomina grupo sanguíneo «A». Otros grupos sanguíneos incluyen «B» (en el que los eritrocitos expresan el antígeno del grupo sanguíneo «B»), «AB» (en el que los eritrocitos expresan tanto los antígenos del grupo sanguíneo A como B) y O (en el que los eritrocitos no expresan ni los antígenos del grupo sanguíneo A ni B). Como se explicará en mayor detalle más adelante, una incompatibilidad entre los glóbulos rojos (eritrocitos) del donante y un receptor depende de la presencia de anticuerpo en el plasma del receptor que se une a los antígenos presentes en los glóbulos rojos. Las pruebas de incompatibilidad pueden denominarse «pruebas cruzadas».

[0015] Una prueba cruzada completa depende no solo de la presencia o ausencia de anticuerpos anti-A o anti-B en el plasma, sino también de otros anticuerpos con afinidad por otros antígenos expresados por los glóbulos rojos/eritrocitos (incluyendo, sin carácter limitativo, Rh, Kell y similares).

[0016] Si se transfunde sangre de un donante incompatible, el sistema inmunitario del receptor (específicamente aquellos anticuerpos circulantes con afinidad por los antígenos presentes en la sangre transfundida «extraña») «atacará» la sangre incompatible y la transfusión será un fracaso. Además, la destrucción masiva de la sangre del donante puede inducir respuestas inmunológicas exageradas y/o inapropiadas y la cascada del sistema de coagulación. Una transfusión de sangre incompatible puede derivar en shock, insuficiencia renal o incluso la muerte.

[0017] Cuando una muestra de plasma del receptor es incubada con una fuente incompatible de glóbulos rojos, los anticuerpos en el plasma con especificidad para los antígenos de los glóbulos rojos «extraños», se unen a aquellos antígenos y «recubren» los glóbulos rojos. Este proceso es conocido como sensibilización y los glóbulos rojos con anticuerpo unido al antígeno de superficie se denominan «eritrocitos sensibilizados» o «glóbulos rojos sensibilizados».

[0018] Los inventores han observado que los glóbulos rojos (eritrocitos) sensibilizados con anticuerpo (proteína) pueden soportar las etapas de procesamiento requeridas para llevar a cabo un ensayo inmunológico. De hecho, los glóbulos rojos (eritrocitos) sensibilizados sometidos a ensayos inmunológicos y otros procedimientos de procesamiento pueden permanecer «sensibilizados» (recubiertos) con anticuerpo a lo largo de las diversas etapas de incubación y lavado. En vista de lo anterior, el proceso de sensibilización puede explotarse como la base de una prueba cruzada inmunológica.

[0019] Se describe un método de prueba cruzada de muestras de sangre, comprendiendo dicho método:

proporcionar plasma y/o suero de una primera muestra de sangre;
 poner en contacto la muestra de plasma y/o suero con glóbulos rojos de una segunda muestra de sangre para proporcionar una mezcla de plasma y/o suero/glóbulos rojos;
 35 incubar la mezcla de plasma y/o suero/glóbulos rojos en condiciones que permitan la sensibilización de los glóbulos rojos;
 separar los glóbulos rojos incubados (algunos o todos de los cuales pueden o no estar sensibilizados) de una fase líquida; y
 poner en contacto los glóbulos rojos separados con un agente capaz de unir anticuerpos;
 40 en el que los agentes capaces de unir anticuerpos están unidos o inmovilizados a un sustrato en un formato de microarray; y
 en el que la separación de los glóbulos rojos de una fase líquida tiene lugar sin centrifugación y la detección de glóbulos rojos sensibilizados unidos al agente capaz de unir anticuerpos indica que la sangre del donante es incompatible con la sangre del receptor previsto.

[0020] Se entenderá que la sensibilización de los glóbulos rojos se produce por la unión entre anticuerpos (por ejemplo, anti-antígeno del grupo sanguíneo) presentes en el plasma y antígenos (por ejemplo, antígenos del grupo sanguíneo) de los glóbulos rojos.

[0021] El plasma o suero para su uso en la presente invención puede prepararse a partir de sangre entera utilizando cualquier protocolo de preparación estándar o adecuado. En un método para la prueba cruzada de sangre según la invención reivindicada, el plasma y/o suero puede ser proporcionado por un paciente que va a recibir una transfusión de sangre, o derivarse de este. Para preparar el plasma para su uso, la sangre entera puede recogerse en tubos con tratamiento anticoagulante. Los glóbulos rojos y plaquetas son eliminados o separados mediante centrifugación y el sobrenadante resultante se señala como plasma. Una muestra de plasma para su uso en la presente invención puede comprender, por ejemplo, un volumen de aproximadamente 10 µL a aproximadamente

1 mL. Por ejemplo, puede utilizarse aproximadamente 100 μ L, 150 μ L, 160 μ L, 200 μ L, 250 μ L o 300 μ L de plasma. Para preparar el suero para su uso, puede recogerse sangre entera y dejar que coagule durante un periodo de tiempo. De nuevo, los glóbulos rojos y plaquetas son eliminados mediante centrifugación y el sobrenadante resultante se señala como suero. El plasma y/o suero para su uso en los métodos de la presente invención puede diluirse con un tampón o diluyente adecuado antes de su uso. El plasma y/o suero pueden prepararse para su uso como una dilución 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 o 1:10. Los diluyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, tampón fosfato salino (PBS) y/o una solución de baja fuerza iónica (LISS).

[0022] Los glóbulos rojos para su uso en la presente invención pueden derivarse de cualquier fuente adecuada de sangre entera. En un método para la prueba cruzada de muestras de sangre según la invención reivindicada (p.ej., para transfusión), los hematíes pueden obtenerse a partir de una fuente de sangre de donante que va a utilizarse. La sangre de donante puede ser recogida y almacenada en bolsas de plástico flexibles. Las bolsas pueden contener compuestos y sustancias químicas (por ejemplo, citrato de sodio, fosfato, dextrosa y a veces adenina) que evitan que la sangre se coagule y facilitan su almacenamiento. El tubo a través del que pasa la sangre a las bolsas de almacenamiento puede ser segmentado tras la recogida para proporcionar secciones en espiral o «pigtail» que contienen pequeños volúmenes de sangre. Estos pequeños volúmenes «pigtail» de sangre de donante son adecuados para su uso en ensayos de prueba cruzada, incluyendo los ensayos de la presente invención. Pueden facilitarse pequeños volúmenes de sangre entera como fuente de glóbulos rojos para su uso en los ensayos de la presente invención. Por ejemplo, puede usarse aproximadamente de 1ul a aproximadamente 500ul de glóbulos rojos. Los ensayos de prueba cruzada de esta invención pueden utilizar aproximadamente 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, 90 μ L o 100 μ L de sangre entera. Antes de su uso, los glóbulos rojos pueden diluirse con cualquier tampón o diluyente adecuado.

[0023] El plasma y/o suero y los glóbulos rojos pueden mezclarse para proporcionar una mezcla de plasma/glóbulos rojos. Por comodidad, la mezcla de plasma/suero y glóbulos rojos se denominará «mezcla de células». La mezcla de células puede diluirse en mayor medida utilizando un medio o tampón adecuado. Por ejemplo, la mezcla de células puede diluirse utilizando una solución de baja fuerza iónica (LISS). Las diluciones adecuadas de la mezcla de células pueden incluir, por ejemplo, diluciones 1:1, 1:2, 1:3, 1:4; 1:5 o 1:6 con tampón (LISS, por ejemplo).

[0024] La mezcla de células (opcionalmente diluida) puede incubarse en condiciones que permitan a los anticuerpos presentes en el plasma o el suero (por ejemplo, anticuerpos antiantígeno del grupo sanguíneo) interactuar con y unirse a antígenos presentes en la superficie de los glóbulos rojos. Como se ha mencionado anteriormente, los glóbulos rojos a los que los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos antiantígeno del grupo sanguíneo se han unido, se denominan glóbulos rojos «sensibilizados». De este modo, la incubación de la mezcla de células puede llevarse a cabo en condiciones adecuadas para permitir la formación de glóbulos rojos sensibilizados. Además, las condiciones pueden incluir un tiempo predeterminado y/o una temperatura predeterminada. Por ejemplo, la mezcla de células puede incubarse a aproximadamente 30-40 °C, por ejemplo 37 °C y/o durante aproximadamente de 10 segundos a varias horas. La mezcla de células puede incubarse aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente 5 min, aproximadamente 10 min, aproximadamente 15 min, aproximadamente 20 min, aproximadamente 25 min o aproximadamente 30 min.

[0025] La mezcla de células puede prepararse y/o incubarse en cualquier sustrato, vaso, tubo, placa (incluyendo placas multipocillo) y/o portaobjeto adecuado. La mezcla de células puede prepararse y/o incubarse en sustratos, vasos, tubos, placas y/o portaobjetos de plástico y/o vidrio. Los sustratos, vasos, placas y/o portaobjetos (ya sean de vidrio, plástico o que comprendan algún otro material) pueden estar recubiertos o bloqueados para evitar o reducir la unión no específica entre plasma/suero y/o componentes de sangre entera y el material del sustrato, vaso, tubo, placa o portaobjeto.

[0026] Por las razones explicadas anteriormente, los ensayos de prueba cruzada deben ser tanto sensibles como específicos. En concreto, es importante que los casos de resultados de falsos positivos y/o negativos sean llevados dentro de determinados niveles de tolerancia o se produzcan a una frecuencia no superior a aquella que sea considerada como aceptable. Un experto en la materia apreciará que en el caso de un ensayo de prueba cruzada, los resultados de falsos negativos sugerirían que la sangre del donante es compatible cuando, de hecho, la sangre del donante puede ser incompatible. En un método de la presente invención, puede producirse un resultado de falso negativo si el proceso utilizado para detectar glóbulos rojos sensibilizados se bloquea, neutraliza o inhibe de otro modo. El proceso utilizado para detectar glóbulos rojos sensibilizados puede requerir un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que tiene afinidad por anticuerpos. Los agentes de unión de este tipo pueden ser bloqueados, neutralizados y/o se puede impedir que interactúen con glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpo presente en el plasma y/o suero.

[0027] De tal modo, la presencia de anticuerpos del plasma/suero no unidos con especificidad por antígenos de los glóbulos rojos (eritrocitos) presentes en la mezcla de células debe ser (sustancialmente) eliminada del resto de los métodos de esta invención.

[0028] Normalmente, la incidencia de resultados de falsos negativos en ensayos inmunológicos (incluyendo la prueba cruzada) se evita mediante etapas de centrifugación y/o lavado frecuentes. Esto asegura que tras cualquier periodo inicial de incubación entre una muestra de plasma/suero y una muestra de glóbulos rojos (para producir glóbulos rojos sensibilizados), cualquier anticuerpo no unido presente en el plasma/suero no es portado a las fases finales del ensayo donde pueden neutralizar a los agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) utilizados para detectar los glóbulos rojos sensibilizados. Las etapas de lavado facilitan la eliminación de anticuerpo no unido de un ensayo mientras que la centrifugación afecta a la separación de anticuerpos no unidos en fase líquida de aquellos que se han unido a su objetivo.

[0029] Aunque las etapas de lavado y/o centrifugación representan medios efectivos para reducir los casos de resultados de falsos negativos y/o positivos en ensayos inmunológicos, incluyendo ensayos del tipo aquí descrito, implican mucho tiempo y aumentan la cantidad de equipo periférico requerido para completar el ensayo.

[0030] La presente invención representa una mejora puesto que proporciona un ensayo rápido, preciso, específico y sensible para la prueba cruzada de sangre, que logra un índice o nivel de resultados de falsos positivos y/o falsos negativos comparable con los ensayos y test de prueba cruzada de la técnica anterior pero con un uso reducido de las etapas de lavado y/o centrifugación.

[0031] Esto se logra en parte llevando a cabo la etapa de incubación de la mezcla de células en condiciones que permitan la separación del componente de hematíes de la mezcla de células de la fase líquida de la mezcla de células. En particular, la incubación se lleva a cabo en condiciones que facilitan la sedimentación por gravedad de las células (algunas, todas o ninguna de las cuales pueden estar sensibilizadas) para formar, por ejemplo, un pellet. La sedimentación de las células y/o formación de un pellet puede dejar una fase líquida o sobrenadante que comprende anticuerpos que no se han unido a antígenos de glóbulos rojos y otros componentes del suero o plasma. La formación de un pellet de glóbulos rojos permite la fácil separación de los glóbulos rojos (o una muestra de los mismos) de la fase líquida (o sobrenadante) de manera que el resto del ensayo pueda llevarse a cabo sobre el componente de glóbulos rojos (quizá sensibilizados) y en ausencia de componentes de suero o plasma que, como se ha descrito anteriormente, puede dar lugar a resultados de falsos negativos y/o falsos positivos.

[0032] Los métodos de la presente invención y, en concreto, la etapa de incubación de la mezcla de células, evita el uso de centrifugación para formar el pellet de células o para separar los hematíes (algunos, todos o ninguno de los cuales pueden estar sensibilizados) de la fase líquida de la mezcla de células y cualquier anticuerpo no unido. En su lugar, se deja que los glóbulos rojos se separen de la fase líquida y sedimenten por gravedad. Esto puede dar lugar a la formación de una agregación o pellet de glóbulos rojos natural. Una vez que el pellet de glóbulos rojos se ha formado y sedimentado, el usuario puede llevar a cabo una de las siguientes acciones, o ambas. El sobrenadante puede eliminarse dejando solo los glóbulos rojos, algunos de los cuales pueden haberse sensibilizado mediante los anticuerpos antiantígeno del grupo sanguíneo durante la etapa de incubación de la mezcla de células. De forma adicional o alternativa, puede eliminarse una agregación de glóbulos rojos sedimentados o en pellet, o una muestra de esta. El resto del ensayo se lleva a cabo o bien en los glóbulos rojos que quedan tras eliminar el sobrenadante o en los glóbulos rojos eliminados de la mezcla de glóbulos rojos.

[0033] Los inventores han observado de forma sorprendente que, una vez que se han peletizado y/o sedimentado los glóbulos rojos, la eliminación de la fase líquida/sobrenadante por ejemplo con pipeta, o mediante decantación o eliminación de los glóbulos rojos sedimentados/en pellet (o una muestra de estos), por succión (aspiración) por ejemplo, es suficiente (y no se requiere un lavado adicional antes de que las células se vuelvan a suspender en tampón para la aplicación de los agentes de unión) para garantizar que los métodos de esta invención muestren una incidencia o nivel similar y comparable (o quizá incluso mejor) de resultados de falsos positivos y/o negativos como se observa en (o con) los ensayos de la técnica anterior. Por consiguiente, sin querer estar obligados por la teoría, se sugiere que la eliminación del sobrenadante o fase líquida o la eliminación de los glóbulos rojos sedimentados/en pellet (o una muestra de estos) es suficiente para eliminar anticuerpo del plasma/suero no unido del ensayo hasta el punto que los agentes de unión usados en la detección de glóbulos rojos sensibilizados no se neutralizan.

[0034] Los glóbulos rojos que se usan en el resto del método de la presente invención pueden volverse a suspender en un tampón adecuado antes de ponerse en contacto con agentes capaces de unir anticuerpos. Un tampón de resuspensión de glóbulos rojos adecuado puede comprender, por ejemplo, albúmina de suero bovino y/o LISS.

[0035] Los glóbulos rojos suspendidos de nuevo de forma opcional (algunos de los cuales pueden haberse sensibilizado) se ponen en contacto con agentes capaces de unir anticuerpos. Por ejemplo, si el método de la presente invención se lleva a cabo con muestras humanas (plasma humano y sangre de un donante humano), los agentes de unión capaces de unir anticuerpos deberían poder unir anticuerpos humanos. Los agentes de unión para su uso en la presente invención pueden ser anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos, con especificidad por uno o varios isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, un solo tipo de anticuerpo específico de un

solo isotipo de anticuerpo (inmunoglobulina G, M, A, E o D por ejemplo) o una pluralidad de diferentes anticuerpos, cada uno de ellos con especificidad por un isotipo de anticuerpo diferente.

- 5 **[0036]** El agente capaz de unir glóbulos rojos sensibilizados puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígenos de este, que muestra especificidad y/o afinidad por uno o varios otros anticuerpos que recubran (sensibilicen) un glóbulo rojo. De forma adicional, o alternativa, pueden usarse otros agentes de unión específicamente reactivos, como por ejemplo miméticos de anticuerpos de pequeñas moléculas, aptámeros, ligandos de ácido nucleico o receptores de otras células que son capaces de unir glóbulos rojos sensibilizados. También pueden emplearse lectinas. Por simplicidad, en lo sucesivo se hará referencia a agentes de unión y «anticuerpos», pero ello no debería interpretarse como limitador.
- 10 **[0037]** Cabe apreciar que la elección de agente de unión (por ejemplo anticuerpo) usado en los métodos de la presente invención dependerá de la naturaleza de los anticuerpos que recubren (sensibilizan) los glóbulos rojos. Por ejemplo, el agente de unión puede ser cualquier agente capaz de unir un anticuerpo del plasma/suero o cualquier otro componente presente en el plasma o suero que puede sensibilizar (unirse a) un glóbulo rojo. Por ejemplo, los agentes de unión para su uso en la presente invención pueden comprender agentes capaces de unir
15 inmunoglobulina y/o factores de complemento. En general, los agentes de unión usados corresponderían a los usados en pruebas convencionales DAT o IAGT, es decir, al menos anti-IgG₁, anti-IgG₃, y anti-Complemento (C3) o anti-IgG humano de amplio espectro, de fuente monoclonal o policlonal. De forma ventajosa, pueden usarse anticuerpos anti-IgG₂ y IgG₄. Si se desea, también podrían incluirse otros anticuerpos, como por ejemplo anticuerpos anti-cadena ligera λ, o anti-cadena ligera κ.
- 20 **[0038]** Los métodos de la presente invención pueden usar anticuerpos policlonales y/o monoclonales. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivados del suero de animales inmunizados con un antígeno, o un derivado funcional antigénico de este. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse animales huésped como por ejemplo conejos, ovejas, cerdos, etc., mediante la inyección con un antígeno específico, complementado opcionalmente con adyuvantes.
- 25 **[0039]** Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos de un antígeno concreto, pueden obtener por medio de cualquier técnica que posibilite la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, sin limitación, la técnica del hibridoma de Kohler y Milstein (1975), Nature 256:495-497; y la patente estadounidense n.º 4376110), la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4:72; Cole *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE UU 80:2026-2030), y la técnica del hibridoma EBV (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Anti-bodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).
- 30 **[0040]** Los anticuerpos monoclonales para uso en la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de estas. El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la presente invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altos títulos de anticuerpos monoclonales *in vivo* es el método de producción preferido en la actualidad.
- 35 **[0041]** Los anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados también pueden usarse como agente de unión en la presente invención. Pueden emplearse técnicas de producción de anticuerpos quiméricos (Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, Nature, 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, Nature, 314:452-454; patente estadounidense n.º 4816567) que comprenden empalmar los genes de una molécula de anticuerpos de ratón de una especificidad antigénica apropiada con genes de una molécula de anticuerpos humanos de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que distintas partes se derivan de distintas especies animales, como aquellos que presentan una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana.
- 40 **[0042]** Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla pueden encontrarse en la patente estadounidense n.º 4946778: Bird, 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, Nature 334:544-546. Las técnicas de producción de anticuerpos monoclonales humanizados se describen en la patente estadounidense n.º 5225539.
- 45 **[0043]** Los fragmentos de anticuerpos para su uso en métodos de la presente invención (cuyos fragmentos reconocen epítomos específicos) pueden generarse por medio de técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, de forma no limitativa: los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse mediante la digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse mediante la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. De forma alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión Fab (Huse *et al.*, 1989, Science, 246:1275-1281) para identificar de forma sencilla y rápida los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.
- 50

[0044] Los métodos de la presente invención pueden explotar un anti-IgG monoclonal, un anti-IgG₁ monoclonal, un anti-IgG₃ monoclonal y un anti-C3 monoclonal. Cuando se incluye anti-IgG, es conveniente que este sea un anti-IgG (policlonal o monoclonal). También puede usarse una mezcla de estas sondas para obtener el mismo resultado, sin diferenciar el tipo de anticuerpo unido.

5 **[0045]** Todas las formas de anticuerpo adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención, incluyendo las descritas anteriormente, se denominan de forma conjunta «anticuerpos».

[0046] Los agentes de unión, incluyendo cualquier anticuerpo, usados en los métodos de la presente invención están unidos o inmovilizados a un sustrato, o en este, en formato de microarray. Cualquier sustrato convencional puede usarse en los métodos de la presente invención. Entre los sustratos adecuados se incluyen aquellos que son de naturaleza rígida o semirrígida. Por ejemplo, entre los sustratos adecuados pueden incluirse membranas, filtro, chips, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, polímeros, micropartículas y/o capilares. El sustrato puede presentar una variedad de formas de superficie, como pocillos, zanjales, agujas, canales y poros, a los que los agentes de unión y/o anticuerpos se inmovilizan/unen. Los sustratos pueden ser de naturaleza plana y presentar una superficie superior plana sobre la cual los componentes de los métodos de la presente invención pueden inmovilizarse y/o unirse. Como se describe en mayor detalle más adelante, y en función de los métodos empleados para la detección de glóbulos rojos (eritrocitos) sensibilizados unidos, la arquitectura de la superficie del sustrato puede formarse y adaptarse para mejorar o facilitar los métodos de detección a base de fluorescentes. Los sustratos de este tipo se describen en WO02/059583 y WO03/023377. En consecuencia, los sustratos para el uso pueden ser ópticamente transparentes.

20 **[0047]** Los sustratos adecuados pueden incluir aquellos que comprenden vidrio, silicio, óxido de silicio, metales y óxidos de metal, bien desnudos o funcionalizados con polímeros funcionales, como por ejemplo glicidoxipropiltrietoxisilano, poli-L-lisina, aminopropilsilano, carboxisilano, hidrogeles y cepillos de polímero, monocapas autoensambladas de, p. ej., tioles de alquilo funcionalizados. Un sustrato adecuado para su uso en los métodos de la presente invención puede comprender un recubrimiento a base de silano, por ejemplo, un compuesto de silano con un ligamiento hidrófobo y grupo funcional con la capacidad de unirse a moléculas biológicas de interés.

[0048] Los agentes de unión y/o anticuerpos para su uso en los métodos de esta invención están unidos o inmovilizados a un sustrato en un array, en concreto en un formato de microarray. Como se usa en la presente memoria, el término «array» se refiere a una disposición por lo general ordenada de sondas unidas (por ejemplo, agentes de unión y/o anticuerpos) que se unen de forma específica a glóbulos rojos sensibilizados (o más bien a los anticuerpos que recubren/sensibilizan los glóbulos rojos) en un sustrato como por ejemplo vidrio.

[0049] Normalmente, el array puede adoptar la forma de una serie de zonas delimitadas separadas de forma regular a las que se unen los agentes de unión y/o anticuerpos. Dichos arrays de anticuerpos unidos a sustrato puede describirse comúnmente como «chips de anticuerpos».

35 **[0050]** Los anticuerpos pueden disponerse en, por ejemplo, un sustrato plano o esférico denominado «chip» en la presente memoria. Los métodos de la presente invención pueden explotar un solo tipo de agente de unión o anticuerpo o una pluralidad de distintos anticuerpos. Por consiguiente, al menos uno pero quizá al menos 2, 3 o 4 anticuerpos distintos pueden unirse a la superficie del sustrato. Asimismo, cada anticuerpo específico puede proporcionarse en un número de diluciones y/o repetirse un número de veces (p. ej., 3-10 veces) con el fin de minimizar en mayor medida cualquier reacción de falso positivo o negativo que pueda producirse, a la hora de llevar a cabo un método de detección.

[0051] Los sustratos empleados para preparar «chips de anticuerpos» para su uso en los métodos de la presente invención pueden comprender sustratos pequeños y planos. Los sustratos planos adecuados pueden ser de cualquier tamaño adecuado. Por ejemplo, un sustrato plano para su uso en la presente invención puede tener cualquier dimensión entre aproximadamente 5 mm y aproximadamente 100 mm de largo y aproximadamente 5 mm y aproximadamente 50 mm de ancho. Por ejemplo, el tamaño de un sustrato plano adecuado puede ser de aproximadamente 76 mm por aproximadamente 26 mm o aproximadamente 12,5 mm por aproximadamente 7,9 mm.

50 **[0052]** El agente de unión o anticuerpo puede aplicarse al sustrato mediante *spotting* o impresión. Entre las técnicas conocidas adecuadas se incluyen las descritas por Michael J. Heller, Annual Review of Biomedical Engineering, 2002 Vol. 4: 129-153. DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications and Angenendt, P.; Glökler, J.; Murpy, D.; Lehrach, H.; Cahill, D.J. Anal. Biochem., 2002, 309, 252-260 Angendt, P.; Glökler, J.; Sobek, J.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. Chromatogr. A, 2003 100, 997-104.

[0053] Los puntos impresos de agente de unión/anticuerpo pueden ser de menos de 1 mm de diámetro, como por ejemplo de menos de 500 μm o 100 μm de diámetro, o entre aproximadamente 50 μm y aproximadamente 1000 μm de diámetro. De este modo, se pueden proporcionar entre decenas y miles de puntos de agente de unión/anticuerpo individuales y discretos en la superficie de cualquier sustrato dado.

5 **[0054]** Para que no quede ninguna duda, cualquier ubicación o punto impreso en un sustrato empleado en un método de la presente invención puede comprender un solo tipo de agente de unión/anticuerpo o dos o más tipos de anticuerpos/agentes de unión.

10 **[0055]** En la técnica son bien conocidos diversos procedimientos para inmovilizar agentes de unión y/o anticuerpos del tipo aquí descrito a la superficie de un sustrato. Por ejemplo, la unión electrostática puede usarse para inmovilizar anticuerpos. Otros métodos que pueden usarse para inmovilizar o unir un agente de unión o anticuerpo a una superficie incluyen interacciones hidrófobas/hidrófilas, interacciones químicas y acoplamiento de aminas. Los agentes de unión y anticuerpos pueden adsorberse directamente en sustratos con contenido en oro a través de aminoácidos con contenido en sulfuro (cisteína, metionina) o mediante unión a través de alcanotioles que comprenden grupos funcionales para interactuar con los agentes de unión, unidos previamente al sustrato con contenido en oro.

15 **[0056]** Las zonas de la superficie del sustrato que no están provistas de agente de unión y que podrían proporcionar sitios de unión no específicos se tratan de forma deseable con bloqueantes para impedir cualquier unión no específica de anticuerpos, factores de complemento (y otros componentes derivados del plasma), glóbulos rojos o glóbulos rojos sensibilizados. Los bloqueantes adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden comprender albúmina o suero (sin anticuerpos no deseados como anticuerpos de grupo sanguíneo, anticuerpos anti-IgG o aquellos que puedan interferir con cualquier interacción de sonda de prueba en el mismo microarray), proteína de la leche sin grasa, caseína, albúmina de suero bovino (BSA) y similares. Los bloqueantes pueden formularse o prepararse para su uso con un tampón adecuado.

20 **[0057]** Por ejemplo, un bloqueante adecuado puede comprender 1 % p/v de albúmina de suero bovino (BSA) (ID Bio, Francia) en tampón fosfato salino (PBS) (cloruro sódico 0,15 M, solución madre tampón fosfato 2,632 M (Quotient, Escocia), pH 7,0).

[0058] Unos sustratos opcionalmente recubiertos para su uso en los métodos de la presente invención pueden almacenarse para su uso como sustratos secos. De forma adicional o alternativa, los sustratos pueden almacenarse a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración/congelado.

30 **[0059]** Los métodos de prueba cruzada de la presente invención se llevan a cabo en un formato de microarray. Los ensayos de prueba cruzada en microarray constituyen unas alternativas eficientes y efectivas a las pruebas cruzadas convencionales. Asimismo, los ensayos de prueba cruzada en microarray pueden integrarse con facilidad en otras pruebas (como por ejemplo otras pruebas en microarray) importantes en el procesamiento de la sangre, entre las que se incluye, por ejemplo, pruebas fenotípicas del grupo sanguíneo para múltiples antígenos en la superficie del glóbulo rojo (eritrocito).

[0060] Tras la incubación en condiciones que permiten la unión entre glóbulos rojos sensibilizados y los agentes de unión y/o anticuerpos inmovilizados, los glóbulos rojos no unidos pueden eliminarse por lavado, por ejemplo.

40 **[0061]** La presencia de los glóbulos rojos (eritrocitos) sensibilizados retenidos de forma cautiva (unidos) puede detectarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica, como por ejemplo detección secundaria por marcado, que puede explotar anticuerpos conjugados fluorescentes y quimioluminiscentes.

45 **[0062]** La fluorescencia se puede detectar mediante cualquier fotodetector adecuado conocido en la técnica, como un espectrofotómetro o un dispositivo de imágenes digitales como por ejemplo un sensor de imagen CCD (en forma de cámara CCD) o un sensor CMOS. De forma conveniente, se puede emplear un escáner plano sencillo en el que el escáner detecta la unión de glóbulos rojos (eritrocitos) y la intensidad de esta tiene una salida visual para interpretarse o un valor numérico con fines de interpretación y procesamiento de datos.

50 **[0063]** Los glóbulos rojos sensibilizados y convenientemente unidos pueden detectarse mediante la autofluorescencia de los glóbulos rojos tal y como se describe en C J Campbell *et al.*, 2006. La detección por autofluorescencia presenta la particular ventaja de que no requiere el uso de ningún marcado y proporciona una forma de procesamiento particularmente sencilla. Con mayor detalle, los glóbulos rojos pueden irradiarse o excitarse con luz de una longitud de onda de aproximadamente 420 nm, 488 nm, 543 nm o 580 nm y una emisión fluorescente detectada a una mayor longitud de onda como por ejemplo 530 nm si se excita a 488 nm o 570-585 nm si se excita a 543 nm.

[0064] Por consiguiente, en un método de la presente invención, los glóbulos rojos (eritrocitos) sensibilizados unidos pueden detectarse mediante una señal fluorescente o mediante generación de imágenes tras escaneado con un escáner plano, por ejemplo.

5 **[0065]** Cabe apreciar que, al conocer la posición de cada anticuerpo específico en el sustrato, es posible determinar si los glóbulos rojos eritrocitos de un donante se han sensibilizado o no por anticuerpos presentes en muestras de plasma de un paciente. Para que no quede ninguna duda, las unidades de donante compatibles producen resultados negativos (no hay sensibilización, por lo que no se unen las células), mientras que las unidades de donante incompatibles producen resultados positivos (sensibilización, con lo cual detección positiva de glóbulos rojos sensibilizados unidos). Un experto en la materia entenderá que, con la electrónica y software adecuados, cualquier aparato puede programarse para «conocer» o reconocer la identidad y ubicación de anticuerpos específicos en la superficie del sustrato y correlacionar esto con las señales generadas, de forma que el realizador de la prueba pueda determinar e identificar una unión concreta. De forma adicional, el *software* estadístico puede incluirse para combinar y formular los resultados de las diversas repeticiones y/o diluciones de los anticuerpos proporcionados en el sustrato. De esta forma, las señales obtenidas de una multiplicidad de puntos de anticuerpo específicos pueden analizarse juntas y mostrarse un resultado estadísticamente significativo al realizador de la prueba.

10 **[0066]** Los métodos de la presente invención pueden incluir uno o varios controles. Por ejemplo, puede usarse un control positivo para confirmar la adición de glóbulos rojos. Un control positivo puede comprender anticuerpos antieritrocitos. Los anticuerpos antieritrocitos pueden inmovilizarse y/o imprimirse en un sustrato como se ha descrito anteriormente en mayor detalle.

15 **[0067]** Cabe entender que, aunque la presente invención se refiere a ensayos de prueba cruzada, de acuerdo con la presente exposición los métodos aquí descritos, en concreto el procesamiento de una mezcla de células en un glóbulo rojo (sensibilizado) y las fases líquidas sin recurrir a las etapas de centrifugación y/o lavado, también pueden explotarse en un número de ensayos inmunológicos diferentes. Por ejemplo, cualquier ensayo que requiera la incubación de una fuente de anticuerpos y glóbulos rojos (eritrocitos) y la posterior detección de glóbulos rojos sensibilizados (eritrocitos: formados durante la incubación entre la fuente de anticuerpos y los glóbulos rojos) puede beneficiarse de los procedimientos que se describen en la presente memoria. Por consiguiente, también se describe un medio para proporcionar glóbulos rojos para su uso en un método de detección de glóbulos rojos sensibilizados, comprendiendo el método la incubación de glóbulos rojos y una composición capaz de sensibilizar glóbulos rojos (por ejemplo, una composición que comprenda anticuerpos y/o componentes complementarios, como por ejemplo plasma o suero) en condiciones que faciliten la sensibilización de los glóbulos rojos y la sedimentación por gravedad del componente de glóbulos rojos; y la eliminación de la fase líquida (o sobrenadante) y/o la eliminación de al menos una muestra de los glóbulos rojos.

20 **[0068]** Otras características preferidas y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos detallados a modo ilustrativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0069]

25 **Figura 1:** Representación en forma de diagrama de un array sencillo (rejilla de puntos de 12x12) que muestra los anticuerpos impresos. Se imprimieron 16 arrays en cada portaobjetos en un formato de 2 x 8. Los puntos negros indican anticuerpos impresos (por triplicado) y los puntos blancos indican 50 % de glicerol/PBS impreso como puntos negativos.

30 **Figura 2:** Representación en forma de diagrama de un array sencillo (rejilla de puntos de 12 x 12) que muestra los dos anticuerpos impresos. α -hIgM se imprimió a 518 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y α -hIgG a 301 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se imprimieron 16 arrays en cada portaobjetos en un formato de 2 x 8. Los puntos negros indican una respuesta de unión a células positiva y los puntos blancos indican 50 % de glicerol/PBS impreso como puntos negativos que no deberían unirse a ninguna célula.

35 **Figura 3:** Imagen de los portaobjetos CM50, CM51 y CM52 que muestra los resultados de las células Orr, OR_{1r}, OR_{1R1} y OR_{2R2} sensibilizadas con plasma anti D durante 30 minutos mediante la técnica del tubo, portaobjetos de vidrio o placa, respectivamente. También se muestran los resultados de las células de control positivas (Z441, células sensibilizadas con IgG).

40 **Figura 4:** Imagen de los portaobjetos CM60 y CM61 que muestra los resultados de las células OR_{1r}, OR_{1R1}, OR_{2R2} y Orr sensibilizadas con plasma anti D durante 30 minutos mediante la técnica del tubo o portaobjetos de vidrio, respectivamente. También se muestran los resultados de las células de control positivas (Z441,

células sensibilizadas con IgG) y los resultados del grado de aglutinación procedentes de la prueba de aglutinación indirecta mediante AHG (resultado de AHG = técnica de referencia).

5 Figura 5: Datos generados a partir de las imágenes mostradas en la Figura 4, que muestran la intensidad de señal media para las células sometidas a prueba en el α -hlgG impreso en el array. Los resultados de la técnica del tubo o el portaobjetos de vidrio se muestran con la desviación estándar de la intensidad de señal media marcada.

10 Figura 6 a & b: Imágenes de los portaobjetos CM62 y CM63 que muestran los resultados de los plasmas anti A y anti B sometidos a prueba con células A₁ o B mediante las técnicas del tubo o el portaobjetos de vidrio, respectivamente. También se muestran los resultados de la prueba indirecta con AHG en tubos, estando los resultados del grado de aglutinación abajo a la izquierda de la figura. Cabe señalar que esta prueba se llevó a cabo de forma manual y, por tanto, puede que sean evidentes algunas alteraciones que se reducirían/eliminarían al emplear métodos automatizados.

15 Figura 7: Representación en forma de diagrama de un array sencillo que muestra los anticuerpos impresos. Se imprimió anti IgM humano a 518 μ g/mL y α -hlgG a 301 μ g/mL. Se imprimieron 16 arrays en cada portaobjetos en un formato de 2 x 8. Los puntos negros indican una respuesta de unión a células positiva y los puntos blancos indican 50 % de glicerol/PBS impreso como puntos negativos que no deberían unirse a ninguna célula.

20 Figura 8: Imagen de los portaobjetos 1 y 2 que muestra los resultados de las células Fy(a+b+), Fy(a+b-) and Fy(a-b+) sensibilizadas con anti-Fy^a monoclonal durante 30 minutos mediante la técnica del tubo o el portaobjetos de vidrio. También se muestran los resultados de las células de control positivas (células sensibilizadas con IgG, Z441).

25 Figura 9: Datos generados a partir de las imágenes mostradas en la Figura 2, que muestran la respuesta de señal que se ha normalizado a la intensidad de señal media para las células de control positivas (Z441) sometidas a prueba en el portaobjetos. Puesto que los resultados para la técnica del tubo y portaobjetos se llevaron a cabo en portaobjetos separados, esto explica las diferencias de señal en los arrays de distintos portaobjetos. Se muestran los resultados de la técnica del tubo o portaobjetos de vidrio. Las células sensibilizadas con IgG (Z411) demuestran las señales de control. Cuando se usa el Anti-Fy^a monoclonal, se observa una buena unión en ambas técnicas. La célula Fy(a-b+) muestra una reactividad baja o negativa, como se esperaba. De este modo, podemos ver que la muestra que contiene Anti-Fy^a es incompatible con las células Fy(a+) y negativa con Fy(a-), lo que demuestra el principio de la prueba cruzada.

30 Ejemplo 1 - Preparación de microarrays de proteínas

[0070] Se emplearon portaobjetos recubiertos de Schott como sustrato. Las muestras de sonda de anticuerpos de agente de unión para imprimirse se prepararon en 50 % de glicerol/ 50 % PBS.

35 **[0071]** Los portaobjetos se imprimieron usando un Arrayjet Sprint Arrayer (Arrayjet) con un Jetspyder de 12 muestras. Se imprimieron replicados de cada muestra en cada portaobjetos, separados por puntos de control negativos de 50 % glicerol/PBS (véase la Figura 1). Todos los portaobjetos se imprimieron con una humedad relativa de entre 40-60 %, y a una temperatura ambiente (20-23 °C), las sondas impresas se dejaron para inmovilizar en la atmósfera humidificada durante 30 minutos antes de almacenarse en una caja a 2-8 °C en la oscuridad durante al menos 24 horas.

[0072] Se imprimieron arrays adicionales para probar plasmas anti A y anti B que se muestran en la Figura 2.

40 Ejemplo 2 - Lavado de células antes de su uso en experimentos

45 **[0073]** Todos los tipos de células se suspendieron en LISS o se lavaron en LISS (solución de baja fuerza iónica); pueden usarse otros diluyentes, incluyendo por ejemplo PBS, solución Alsever modificada y variaciones de estos. Asimismo, no es necesario lavar las células, sino que puede eliminarse un pequeño volumen de células de la muestra del donante (que puede que se haya centrifugado) directamente en el tampón de LISS. En los casos en que se usó el lavado, las células se centrifugaron tres veces a 3000 rpm durante 2 minutos usando una centrifuga Thermo Centra CL2 y el sobrenadante se eliminó cada vez y se sustituyó por ~ 4 mL PBS. Después de la última centrifugación, se llevó a cabo un lavado en LISS antes de volver a suspender las células en 2 % HCT en LISS.

50 **[0074]** Para experimentos en los que se detectaron distintos hematocritos de células, las células se prepararon a 8 % HCT (160 μ L del pellet de células resultante se añadieron a 1000 μ L de LISS). A continuación, el 8 % de las células del HCT se diluyó más en LISS para lograr el porcentaje de hematocritos requerido.

Ejemplo 3 - Prueba de aglutinación indirecta de células sensibilizadas (método convencional, técnica de referencia)

5 **[0075]** Se incubaron volúmenes (40 µL o 80 µL) de la suspensión de células con 80 µL de plasma limpio o diluido en un tubo. La mezcla resultante se incubó en un baño de agua a 37 °C. En este ejemplo, la mezcla se incubó durante 30 o 45 minutos, pero pueden usarse periodos de tiempo mayores o menores. En estas condiciones se sensibilizan los glóbulos rojos. En los casos en que se diluyó plasma, el diluyente puede ser el mismo que el usado para la suspensión de glóbulos rojos. Pueden usarse otros diluyentes adecuados.

10 **[0076]** Tras el periodo de incubación, las células se lavaron mediante el programa nW en una lavadora de células DiaCent 2000 (lavado 4 veces con PBS, y luego centrifugación a 1000 g). Se añadieron dos gotas de AHG y los tubos se centrifugaron por último (1000 g, 10 s) y se leyó la aglutinación de células en una caja de luz.

Ejemplo 4 - Técnica del tubo para sensibilizar células

15 **[0077]** Se incubaron volúmenes (240 µL o igualado con volumen de plasma) de suspensión de células con 480 µL de plasma limpio o diluido. El plasma se diluyó en PBS o LISS. Los tubos se incubaron a 37 °C (durante 30 o 45 minutos; se pueden usar periodos de tiempo mayores o menores). Tras el periodo de incubación, las células se lavaron mediante la lavadora de células DiaCent 2000 (lavado 4 veces con PBS, y centrifugación final). A continuación, las células se volvieron a suspender en 240 µL de 2 % BSA/LISS antes de añadirse a los arrays como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 5 - Técnica del portaobjetos de vidrio para sensibilizar células (eliminación de anticuerpos no unidos mediante eliminación de plasma/sobrenadante y resuspensión)

20 **[0078]** Se ajustó un portaobjetos en blanco (Schott, Glass B) en un colector Grace-Bio de 16 pocillos. Se calentó la solución de bloqueo (2 % BSA/PBS) hasta aproximadamente 37 °C y se bloquearon los portaobjetos mediante la adición de 160 µL de solución de bloqueo a cada pocillo y se incubaron a 37 °C con agitación (350 rpm) en un termoagitador Grant Bio durante 15 minutos (con cubierta de plástico). Tras el bloqueo, se eliminó la solución y se incubaron 80 µL de las células (opcionalmente lavadas) con 160 µL de plasma. El portaobjetos se incubó inmóvil durante 30 o 45 minutos a 37 °C. El tiempo de incubación dependía del experimento llevado a cabo.

25 **[0079]** Tras la incubación, se eliminó (sustancialmente) todo el volumen de líquido (o fase líquida) rápidamente de la esquina superior derecha de cada pocillo.

[0080] A continuación, se volvieron a suspender las células restantes en 240 µL de 2 % BSA/LISS antes de añadirse a los arrays como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 6 - Técnica de la placa para sensibilizar células (eliminación de eritrocitos sensibilizados del plasma/sobrenadante y resuspensión)

30 **[0081]** Se incubaron volúmenes (40 µL) de células lavadas con 80 µL de plasma fijas en una placa de 96 pocillos en forma de U durante 30 o 45 minutos a 37 °C mediante un termoagitador Grant Bio. Para investigar el cambio en volumen total, se incubaron 80 µL de las células con 160 µL de plasma. El tiempo de incubación dependía del experimento llevado a cabo. Tras el tiempo de incubación, se eliminaron 4 µL del pellet de células de la parte inferior del pocillo y se depositaron en un pocillo separado que contenía 100 µL de 2 % BSA/LISS. Las células se volvieron a suspender antes de añadirse a los arrays como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 7 - Procesamiento de arrays

40 **[0082]** Los arrays impresos en portaobjetos se eliminaron del almacenamiento a 2-8 °C y se ajustaron en colectores Grace-Bio de 16 pocillos, asegurando la alineación tanto central como recta de los arrays en cada pocillo, fijados con los clips metálicos y ajustados en una bandeja Proplate (de 3 portaobjetos). Los portaobjetos se volvieron a almacenar a 2-8 °C hasta inmediatamente antes de su uso. Se calentó la solución de bloqueo (2 % BSA/PBS) hasta aproximadamente 37 °C. Se bloquearon los portaobjetos mediante la adición de 160 µL de solución de bloqueo a cada pocillo y se incubaron a 37 °C con agitación a 350 rpm en un termoagitador PHMP Grant Bio durante 15 minutos (con cubierta de plástico).

45 **[0083]** Tras el bloqueo, la solución se eliminó y se pipetearon lentamente 120 µL de células sensibilizadas (de los Ejemplos 4-6) al lado izquierdo de cada pocillo apropiado.

[0084] Los portaobjetos se incubaron de forma fija a 37 °C durante 15 minutos (con cubierta de plástico). Tras la incubación, toda la bandeja Prolate que contenía los portaobjetos se sumergió en una bañera de PBS. Se puede usar succión para eliminar el PBS y cualquier otro fluido en los pocillos.

5 [0085] Los portaobjetos se retiraron con cuidado del colector Grace-Bio y se transfirieron a un soporte de portaobjetos y se sumergieron en PBS fresco. Opcionalmente, los portaobjetos pueden fijarse por inmersión en 0,1 % de glutaraldehído/PBS durante 10 minutos a 2-8 °C o más convenientemente el PBS se elimina por succión y se lleva a cabo el análisis directamente con el escáner plano. Esto vino seguido por un lavado final en agua antes de centrifugarse hasta secarse. Los portaobjetos se almacenaron en un lugar oscuro, sin polvo, hasta el escaneado.

10 **Ejemplo 8 Extracción y análisis de datos**

[0086] Los portaobjetos se escanearon con un escáner plano para capturar una imagen en alta resolución y se guardó como archivo TIFF de 16 bits.

[0087] En los casos en que los glóbulos rojos están unidos a anticuerpos, un punto negro es evidente.

15 [0088] Los datos numéricos se extrajeron de los microarrays por medio de un algoritmo generado internamente que puede cuantificar la intensidad de señal.

[0089] Se generó automáticamente un archivo de entrada de texto usando las posiciones de filas y columnas de los microarrays para determinar la identidad y ubicación de cada sonda. Esto se empleó para generar una lista de arrays que se cargó tras haber configurado los ajustes de las rejillas de los microarrays. Una vez generada la lista de rejillas y de arrays, los datos se exportaron a un archivo de texto. Con este proceso se obtuvo el valor medio de intensidad de fluorescencia del centro de cada punto y un valor medio de fondo de toda la zona de fondo del portaobjetos. Esta información se recopiló en una hoja de cálculo de Excel.

20

[0090] Para cada punto, se restó el valor de fondo del valor de intensidad del punto. Para cada portaobjetos, los valores de intensidad de señal de cada ajuste de escaneo diferente se recopilaron en una hoja de cálculo.

25 [0091] Una vez seleccionados los mejores escaneos de datos, se procesaron del siguiente modo. Los datos no deseados se eliminaron de la hoja de cálculo para dejar solo un valor por punto del microarray (el valor de intensidad del punto menos el valor de fondo de cada punto). Los valores de control negativos se emplearon para calcular un valor de «ruido», la media más dos desviaciones estándar de los negativos (media + 2 DE). Este valor representa unión no específica (UNE). El valor de cada punto se dividió por la media + 2 DE de los controles negativos para proporcionar una ratio señal a ruido (S/R). Los valores por encima de uno pueden considerarse significativos. La media de la S/R se calculó para los puntos replicados de cada muestra.

30

[0092] Los datos procesados se analizaron según procedía con Microsoft Excel. Se emplearon diagramas de barras para analizar los datos. El eje Y en los diagramas de barras representa la media S/R para la muestra.

35 [0093] En los casos en que se incluyeron barras de error, el error estándar de cada muestra se calculó de la siguiente forma. Se calculó la desviación estándar de los replicados de cada muestra (ello se llevó a cabo en ratios S/R o valores reales). La desviación estándar se dividió por la raíz cuadrada del número de replicados de la muestra para obtener el error estándar.

Datos complementarios

40 [0094] Los microarrays de proteínas se prepararon de acuerdo con el ejemplo 1 anterior. Las células se lavaron antes de los experimentos de acuerdo con el ejemplo 2 anterior. La prueba indirecta de aglutinación de células sensibilizadas (método convencional: técnica de referencia) se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 3 anterior. La «técnica del tubo» para preparar células sensibilizadas se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 4 anterior. La «técnica del portaobjetos de vidrio» para sensibilizar células (eliminación de anticuerpo no unido (sin centrifugado/lavado) mediante eliminación de plasma/sobrenadante y resuspensión) se llevó a cabo de acuerdo con el ejemplo 5 anterior. Los ensayos se procesaron de acuerdo con el ejemplo 7 anterior.

45 **Extracción y análisis de datos**

[0095] De acuerdo con el ejemplo 8 de la patente original, con la salvedad de que el eje Y en los diagramas de barras representa la media de S/R para la muestra normalizada al resultado del control positivo (Z441) y se calcula en forma de porcentaje.

[0096] En los casos en que se incluyeron barras de error, el % de coeficiente de variación asociado con el valor de cada muestra se calculó de la siguiente forma. Se calculó el % de CV de los replicados de cada muestra (ello se llevó a cabo en ratios S/R o valores reales). El valor medio era la desviación estándar y después se multiplicó por 100 para obtener el % de CV.

5 **Referencias**

[0097]

Robb, J.S., Roy, D.J., Ghazal, P., Allan, J. y Petrik, J. (2006). "Development of non-agglutination microarray blood grouping" *Transfusion Medicine*. 16, 119-129.

10 Campbell, C.J., O'Looney, N., Chong Kwan, M., Robb, J.S., Ross, A.J., Beattie, J.S., Petrik, J. y Ghazal, P. (2006). "Cell Interaction Microarray for Blood Phenotyping" *Analytical Chemistry*. 78, 1930-1938.

British Committee for Standards in Haematology [Comité británico de estándares en hematología]; Milkins, C., *et al.* (2013). Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfusion Medicine* 23, 3-35.

15 Issit, P.D. y Anstee, D.J. (1998) *Applied Blood Group Serology*. Cuarta edición. Montgomery Scientific Publications.

REIVINDICACIONES

1. Método de prueba cruzada de muestras de sangre, comprendiendo dicho método:
 - 5 proporcionar plasma y/o suero de una primera muestra de sangre;
 - poner en contacto el plasma y/o suero con glóbulos rojos de una segunda muestra de sangre para proporcionar una mezcla de plasma y/o suero/glóbulos rojos;
 - incubar la mezcla de plasma y/o suero/glóbulos rojos en condiciones que permitan la sensibilización de los glóbulos rojos;
 - separar los glóbulos rojos incubados de una fase líquida; y
 - 10 poner en contacto los glóbulos rojos separados con un agente capaz de unir anticuerpos;
 - en el que los agentes capaces de unir anticuerpos están unidos o inmovilizados a un sustrato en un formato de microarray; y
 - en el que la separación de los glóbulos rojos de una fase líquida tiene lugar sin centrifugación y por gravedad y la detección de glóbulos rojos sensibilizados unidos al agente capaz de unir anticuerpos indica que la segunda muestra de sangre es incompatible con la primera muestra de sangre.
 - 15
2. Método según la reivindicación 1, en el que el plasma y/o suero se obtiene, lo proporciona o procede de un paciente que va a recibir una transfusión de sangre.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los glóbulos rojos se obtienen, los proporcionan o proceden de la sangre de un donante.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de plasma y/o suero/glóbulos rojos se incuba:
 - 25 (i) a 30-40 °C de 10 segundos a varias horas; y/o
 - (ii) a 37 °C durante 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min o 30 min; y/o
 - (iii) en condiciones que permitan la separación del componente de glóbulos rojos de la mezcla de células de la fase líquida de la mezcla de células; y/o
 - (iv) en condiciones que faciliten la sedimentación de los glóbulos rojos para formar un pellet.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que separar los glóbulos rojos de una fase líquida comprende además eliminar el sobrenadante para dejar únicamente los glóbulos rojos y/o eliminar una muestra de los glóbulos rojos en pellet.
- 35 6. Método según la reivindicación 5, en el que el sobrenadante se elimina por pipeteado, decantación y/o aspiración.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los agentes capaces de unir anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en:
 - 40 (i) anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de estos, con especificidad para uno o varios isotipos de anticuerpos;
 - (ii) miméticos de anticuerpos de pequeñas moléculas;
 - (iii) aptámeros;
 - (iv) ligandos de ácido nucleico;
 - (v) receptores de otras células; y
 - 45 (vi) lectinas.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato es un sustrato funcionalizado y/o recubierto.
- 50 9. Método según la reivindicación 8, donde el sustrato se funcionaliza y/o recubre con uno o varios compuestos seleccionados de entre el grupo que consiste en:
 - (i) un polímero funcional;
 - (ii) glicidoxipropiltrióxidosilano;
 - (iii) poli-L-lisina;
 - (iv) aminopropilsilano;

- (v) carboxisilano;
 - (vi) hidrogeles;
 - (vii) cepillos de polímero, monocapas autoensambladas de tioles de alquilo funcionalizados;
 - (viii) recubrimiento a base de silano; y
 - (ix) un compuesto de silano con un ligamiento hidrófobo y grupo funcional con la capacidad de unirse a moléculas biológicas de interés.
- 5
- 10.
- 10
- 11.
- 15
- 12.
- 20
- 13.
- 25
- 14.
- 30
- 15.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los agentes capaces de unir anticuerpos se aplican al sustrato por medio de *spotting* o impresión.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método se combina con una o varias otras pruebas y/o pruebas de microarray.
12. Método según la reivindicación 11, en el que las una o varias otras pruebas y/o pruebas de microarray se seleccionan del grupo que consiste en pruebas fenotípicas del grupo sanguíneo y/o pruebas de enfermedades de transmisión hemática.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la incubación en condiciones que permiten la unión entre glóbulos rojos sensibilizados y agentes que unen anticuerpos, los glóbulos rojos no unidos se eliminan por lavado.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de glóbulos rojos sensibilizados unidos a los agentes capaces de unir anticuerpos comprende el uso de técnicas de detección secundarias por marcado y/o anticuerpos conjugados fluorescentes y quimioluminiscentes, de autofluorescencia de glóbulos rojos y/o señal fluorescente y/o generación de imágenes.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método comprende además el uso de uno o varios controles; opcionalmente en el que el control o los controles comprenden un control positivo para confirmar la adición de glóbulos rojos.

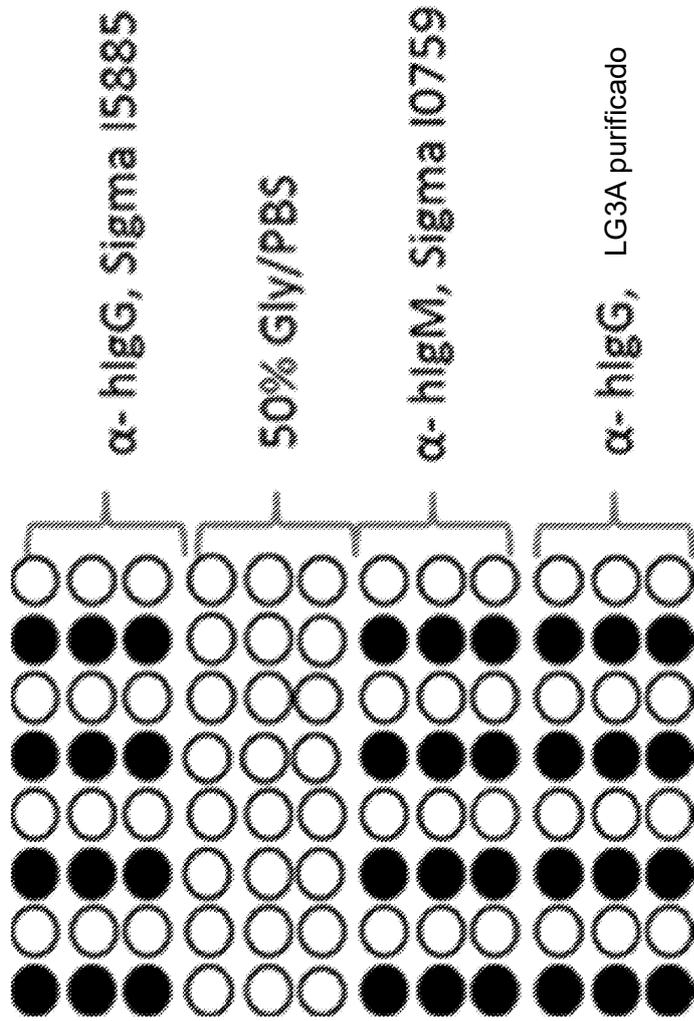


Figura 1

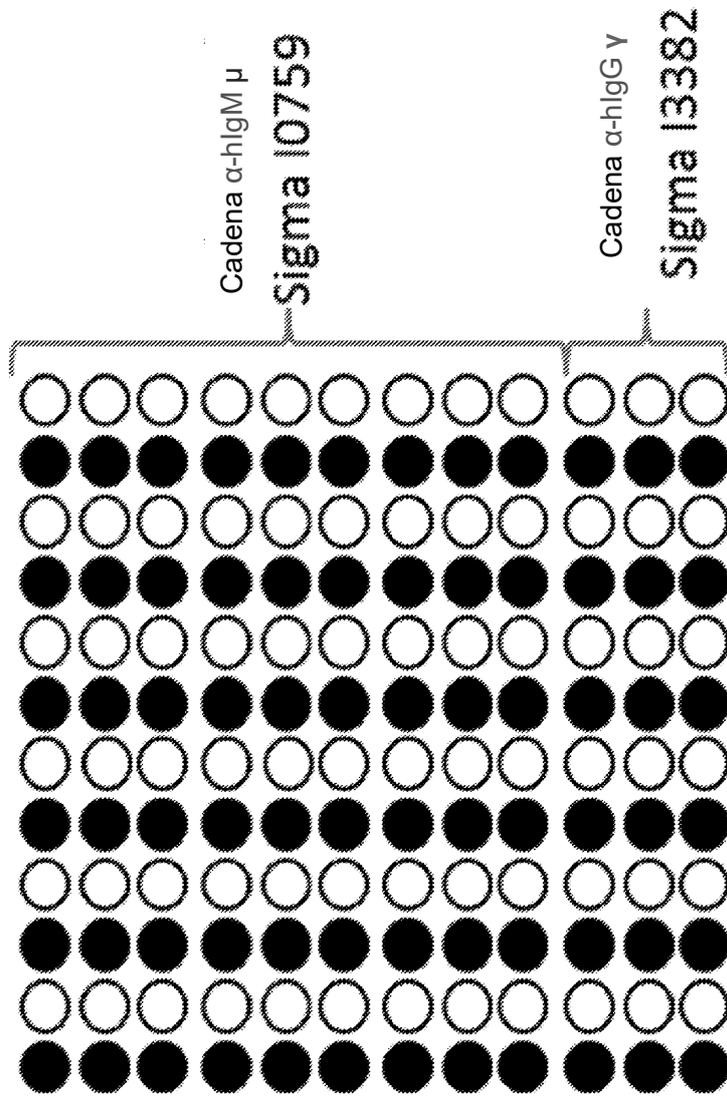


Figura 2

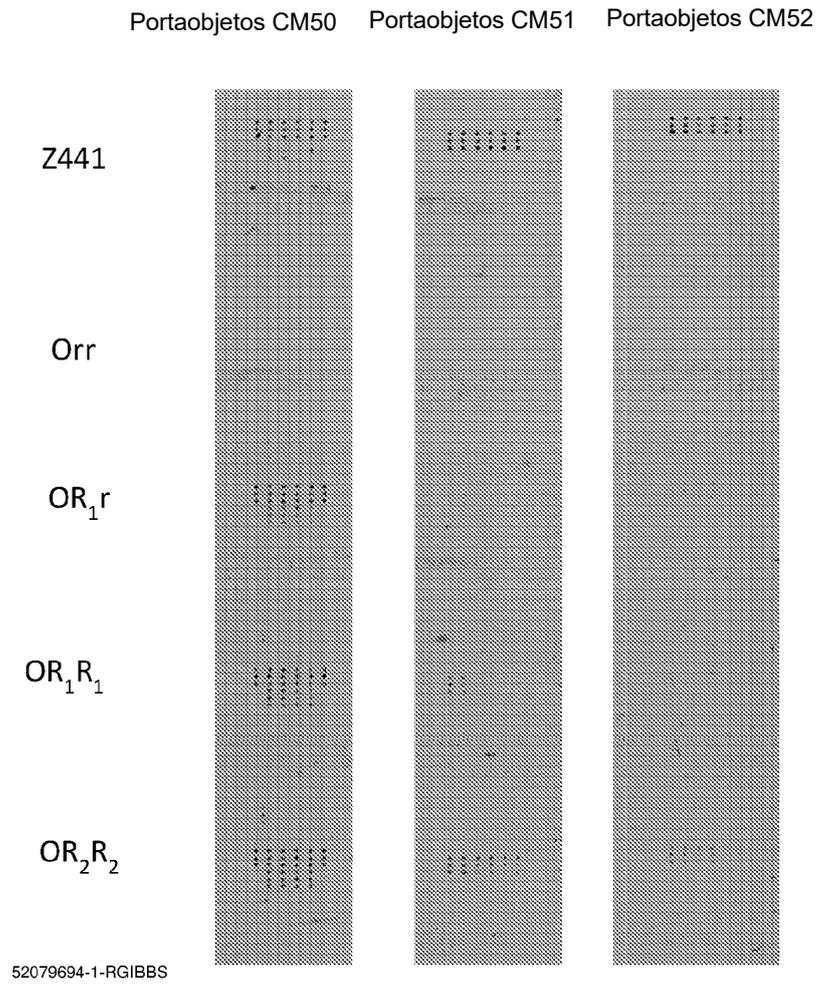


Figura 3

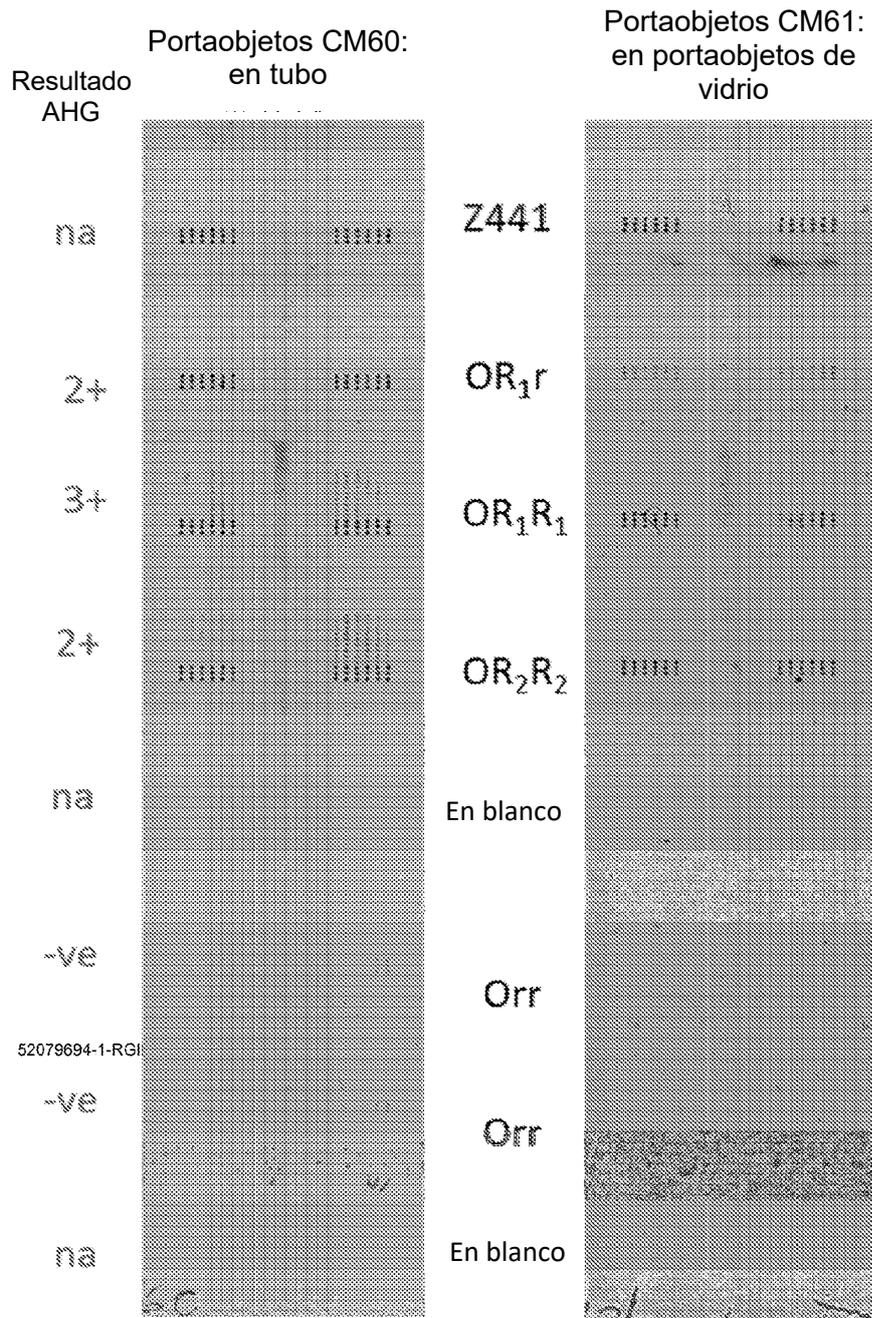


Figura 4

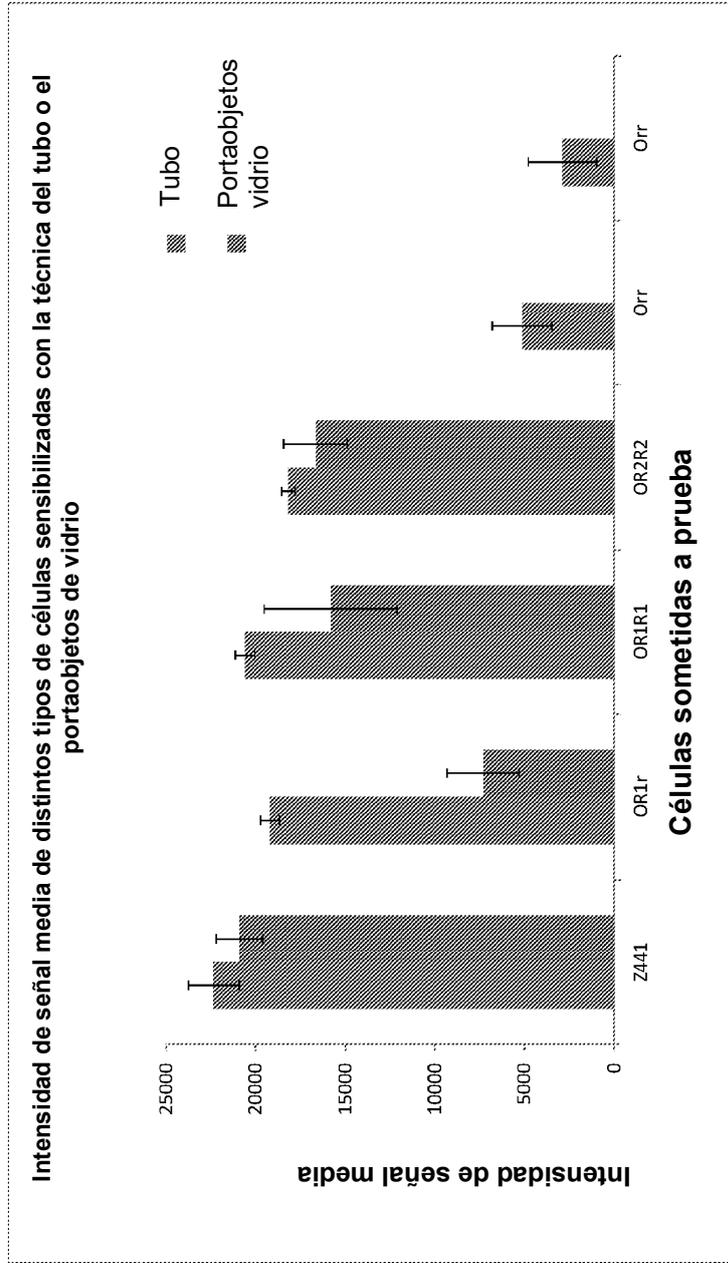
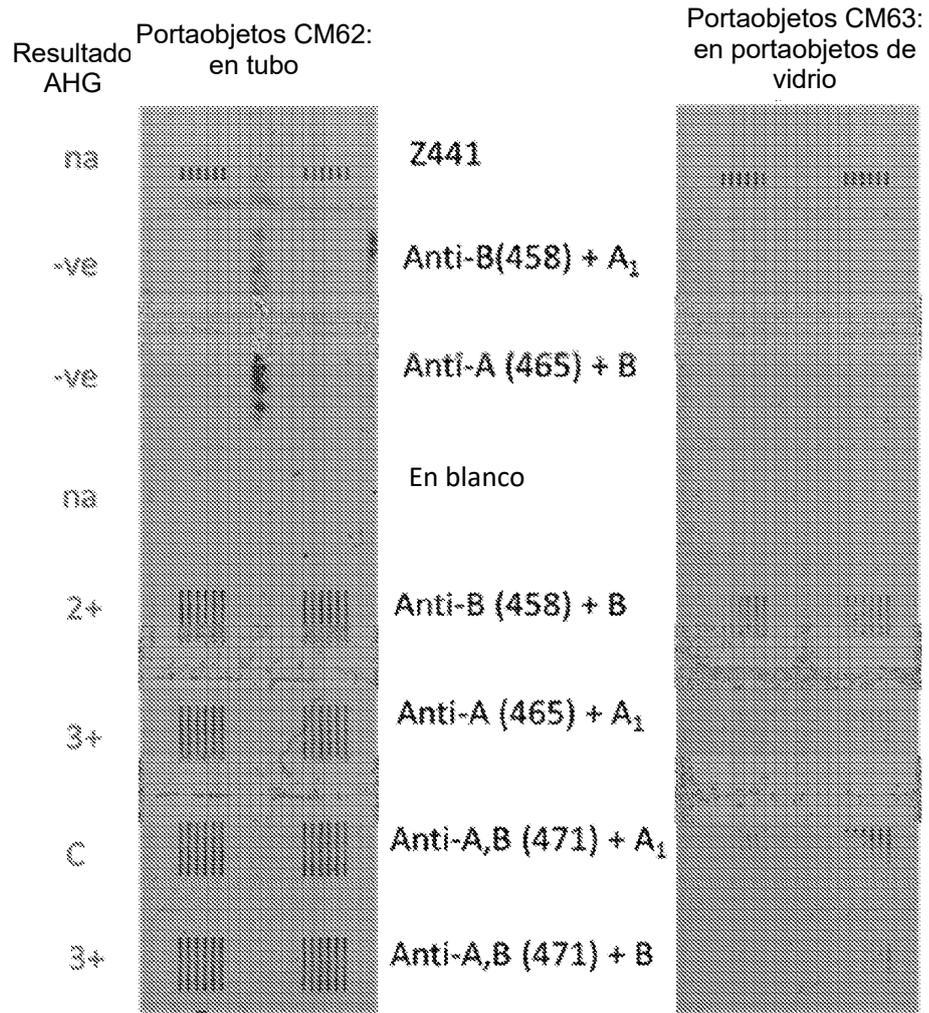


Figura 5



52079694-1-RGIBBS

Figura 6a

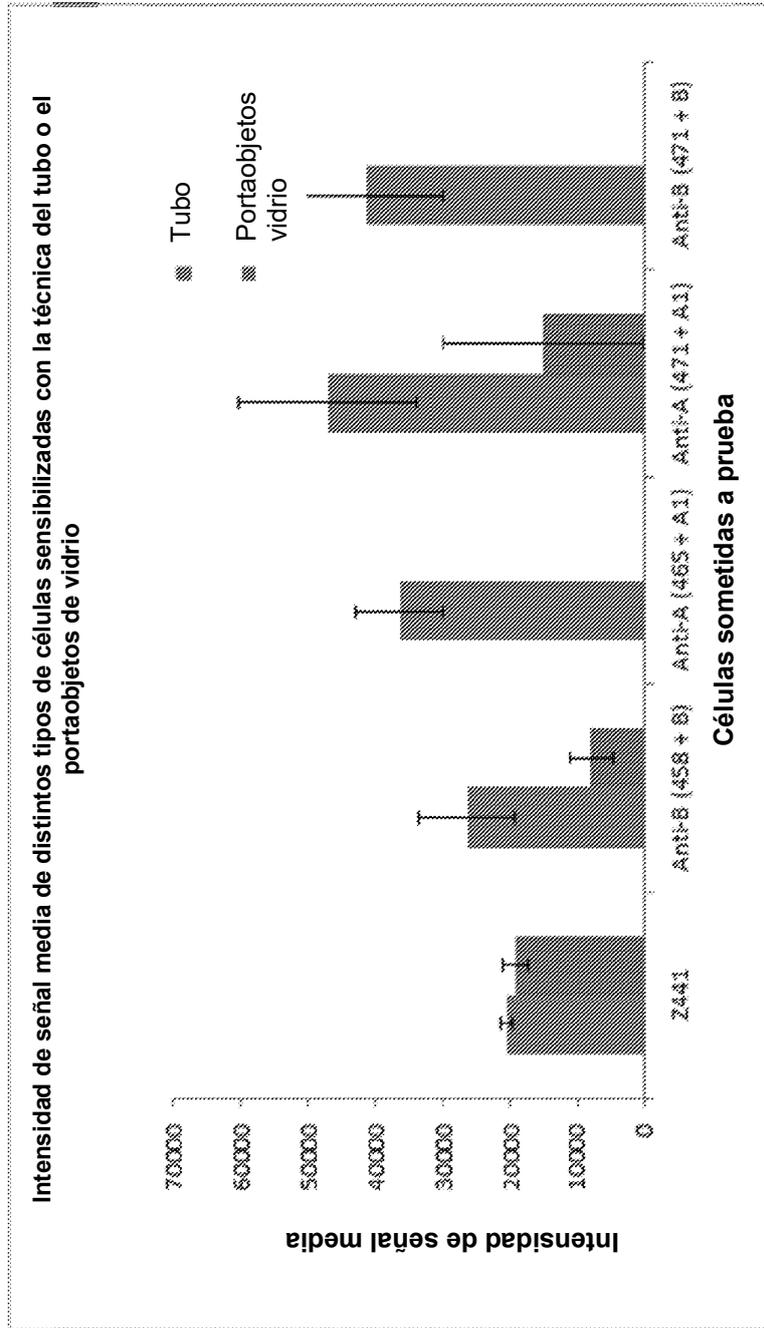


Figura 6b

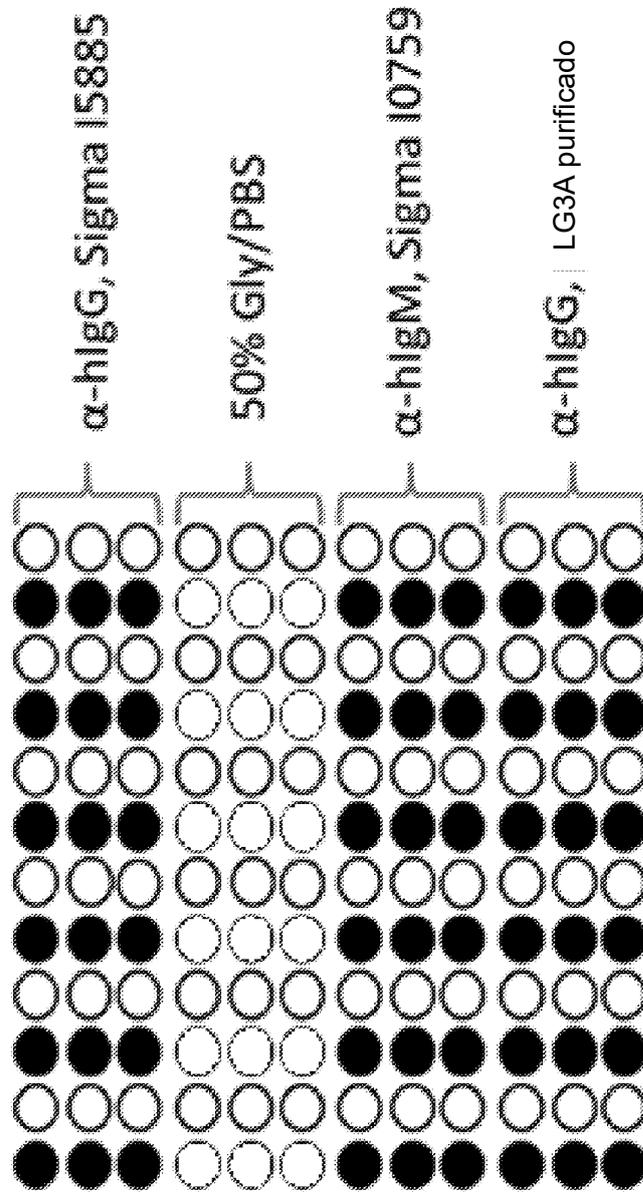


Figura 7

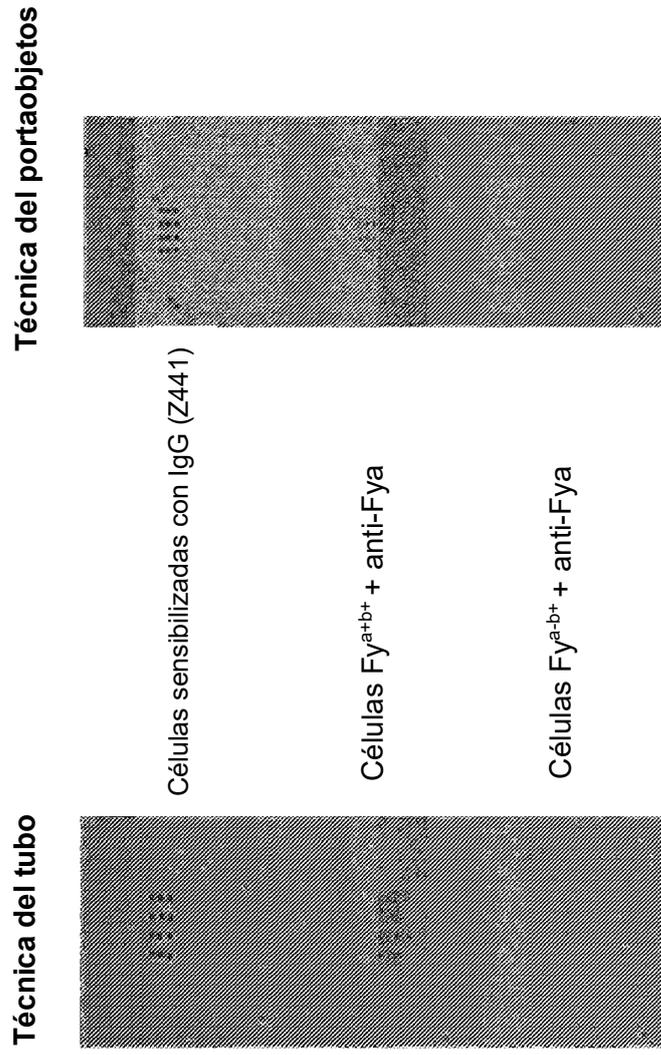


Figura 8

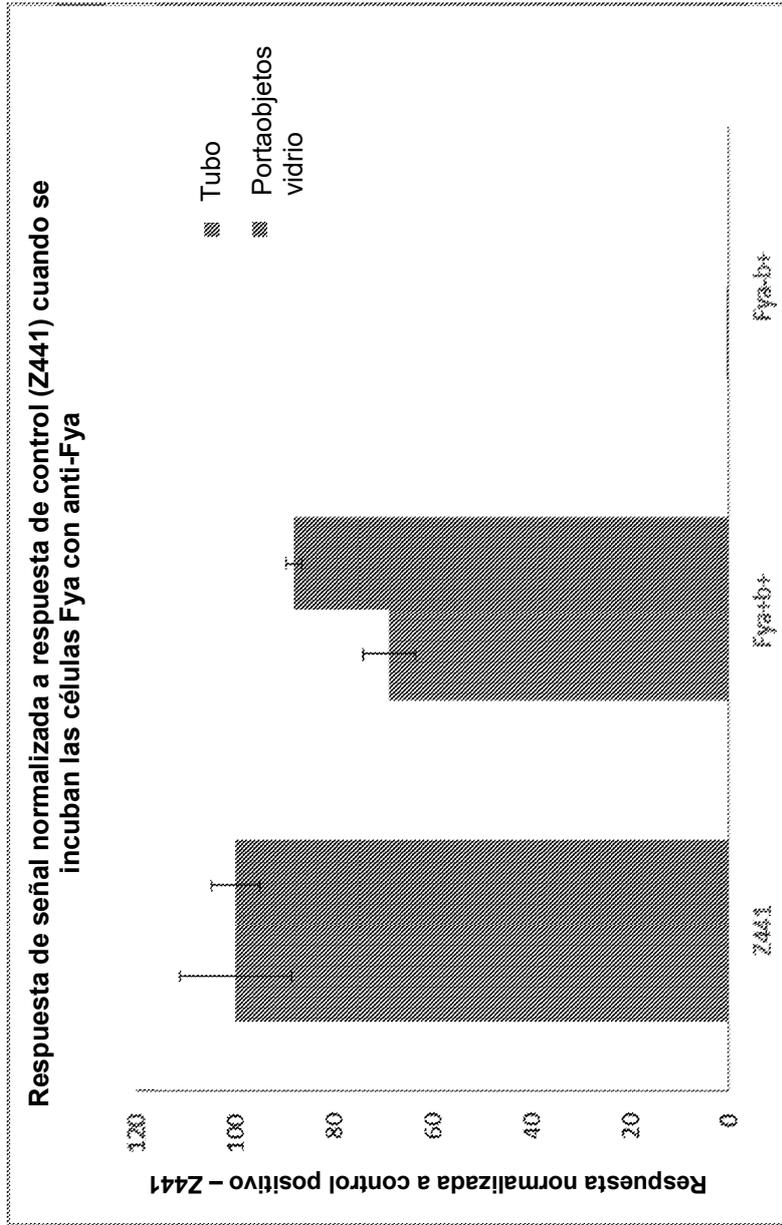


Figura 9