



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 341**

51 Int. Cl.:
G01N 33/538 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05742260 .2**
96 Fecha de presentación : **10.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1759209**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Procedimiento para aumentar el margen dinámico de medición de elementos de ensayo en particular elementos de ensayo inmunológico basados en reacciones específicas de unión.**

30 Prioridad: **12.05.2004 DE 10 2004 023 402**

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

72 Inventor/es: **Spinke, Juergen;**
Schaeffler, Juergen y
Bodenbach, Ludger

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 313 341 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).

ES 2 313 341 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para aumentar el margen dinámico de medición de elementos de ensayo en particular elementos de ensayo inmunológico basados en reacciones específicas de unión.

5 La invención se refiere a un procedimiento para aumentar el margen dinámico de medición de elementos de ensayo en particular elementos de ensayo inmunológico basados en reacciones específicas de unión, en particular, tiras cromatográficas inmunológicas ópticamente evaluables.

10 Las tiras de ensayo inmunológicas constituyen un medio auxiliar ampliamente extendido para la rápida determinación de drogas, hormonas del embarazo, enfermedades infecciosas, o los llamadas “marcadores cardíacos”, como la troponina T. A este respecto, han encontrado una amplia aplicación tanto los ensayos cualitativos, que pueden leerse simplemente visualmente y a menudo proporcionan solamente una respuesta “SI-NO”, como también ensayos cuantitativos que se evalúan mediante un aparato de lectura.

15 Los ensayos rápidos para sustancias inmunológicamente detectables son ya conocidos desde hace tiempo para un gran número de distintos parámetros, por ejemplo, a partir de las patentes WO 97/06439, EP 0 291 194, US 5.591.645, US 4.861. 711, US 5.141.850, US 6.506.612, US 5.458.852, US 5.073.484. En este caso se preparan la mayor parte de los reactivos de detección inmunológicos (esencialmente anticuerpos o respectivamente antígenos, marcados y sin marcar), en forma seca, sobre un soporte el cual permite el transporte de un líquido de muestra (en particular líquidos corporales como sangre, suero, plasma, orina, saliva, etc.), sobre o en el soporte. De preferencia, el soporte para ello es capilarmente activo, por ejemplo una membrana o un soporte de plástico provisto de canales capilares (como por ejemplo en la patente US 5.458.852). En el campo de la especialidad se habla a menudo de tiras de ensayo o dispositivos de ensayo inmunológicos o inmunocromatográficos. Estos conceptos, así como la expresión
25 “ensayos inmunológicos unidos a un soporte” o “elementos de ensayo inmunológicos unidos a un soporte”, se emplean a menudo como sinónimos, y de ahora en adelante pueden intercambiarse.

La evaluación de dichos dispositivos de ensayo inmunológicos se efectúa mediante sistemas sencillos, y en particular, en análisis puramente cualitativos (en donde solamente interesa la declaración de “el analito está presente o respectivamente no está presente”), y a menudo puramente visualmente. En particular, en el campo del ensayo rápido del embarazo, este principio se ha extendido ampliamente en el mercado.

30 Los ensayos rápidos inmunológicos semi-cuantitativos se evalúan en la mayoría de los casos, con ayuda de un correspondiente aparato de medición coordinado con la correspondiente tira de ensayo. Según el tipo de marcado de los reactivos del dispositivo de ensayo empleado para la detección del analito, se emplean diferentes principios de medición. Ampliamente extendidos y sencillos de manipular son los métodos ópticos de detección, en particular, la medición de la remisión y de la fluorescencia.

40 Muchos sistemas del estado actual de la técnica, cuidan de que la zona de detección del analito (de ahora en adelante abreviadamente “zona de detección”) y la zona de control, estén dispuestas en el dispositivo de ensayo, espacialmente con estrechos límites, y claramente separadas entre sí. Ante todo, se ha confirmado como conveniente que los correspondientes reactivos de unión se coloquen en forma de líneas o rayas sobre el dispositivo de ensayo. En el aparato de medición para la evaluación de los dispositivos de ensayo, se encuentran con el fin de evaluar las zonas de detección del analito y de control, por esta razón a menudo sistemas ópticos desmontables en el lugar, como p. ej., chips de cámara, o fotodiodos de 2 ó 3 dimensiones. Las señales de los sistemas ópticos se transforman entonces, mediante un correspondiente programa de evaluación, en valores de la concentración y se visualizan.

50 En los dispositivos de ensayos inmunológicos del estado actual de la técnica no es posible registrar cuantitativamente cualesquiera concentraciones del analito en la muestra. Hacia abajo, es decir con respecto al límite inferior de detección del margen de medición, está limitado por ejemplo por la afinidad y selectividad de los socios de unión empleados (en su mayoría anticuerpos) y la sensibilidad de la óptica de detección con respecto a los marcados empleados (señalizaciones). Hacia arriba, es decir con respecto al margen dinámico de medición, los efectos de la saturación limitan el margen de medición. En los analitos que pueden encontrarse en muy altas concentraciones en la muestra, no es posible a menudo disponer de una cantidad adecuada del socio de unión en el dispositivo de ensayo. En particular, en las zonas de detección del analito y de control, en donde los socios de unión espacialmente muy limitados, están colocados en el dispositivo de ensayo, no pueden colocarse a voluntad muchos socios de unión. Esto puede causar problemas en particular en los casos en los cuales es necesario tanto un límite de detección pequeño para los analitos (y por esta razón se procura que el socio de unión en la zona de detección esté lo más concentrado posible, es decir aplicar en un espacio estrecho y de esta forma, en base a la limitada disponibilidad de lugares de unión en el dispositivo de ensayo, solamente puede prepararse una relativamente pequeña cantidad del socio de unión), el analito sin embargo puede estar presente en la muestra en cantidades fuertemente oscilables, es decir pueden haber tanto muy pequeñas como también muy altas concentraciones de analito. En el caso de altas concentraciones de analito se logra una saturación de la zona de detección con los correspondientes reactivos de detección, de manera que tiene lugar un comportamiento de saturación de la relación concentración de analito-sígnal de detección: por encima de una determinada concentración de analito no tiene lugar ningún aumento de la señal de detección; la curva de evaluación se aplan
65 a y lógicamente ya no se puede evaluar.

ES 2 313 341 T3

Para agravar el problema, sucede que principalmente en los inmunoensayos sandwich, a concentraciones muy altas de analito no solamente se observa un aplanamiento de la curva que reproduce la relación entre la concentración de analito y la señal de detección, sino que incluso se constata una disminución de la señal con concentraciones crecientes del analito. Se habla aquí del llamado “High-Dose-Hook-Effect” (“efecto gancho de las dosis altas”): A concentraciones muy altas del analito se observa que la intensidad de la señal en los inmunoensayos sandwich, que al principio aumenta con una concentración creciente de analito, desciende de nuevo. Esto se explica porque las cantidades de anticuerpos utilizadas en el ensayo ya no son suficientes para formar en cualquier caso con las moléculas del analito (antígenos) un complejo sandwich (es decir, un complejo con dos anticuerpos por cada antígeno). Se forman complejos múltiples de analito y un anticuerpo cada vez, los cuales tomados por sí mismos ya no se detectan. De esta forma, según las circunstancias, se obtienen demasiados resultados de medición falsos negativos o bien resultados muy pequeños, lo cual, naturalmente, hay que evitar.

Especialmente las tiras de ensayo inmunológico cuantitativo, en las cuales se determina una señal mediante mediciones de la remisión, muestran todavía frente a los convencionales sistemas de análisis empleados en la mayoría de grandes laboratorios, claras deficiencias. Son particularmente insatisfactorios, la precisión y el margen dinámico de medición en las tiras de ensayo. Esto limita especialmente el campo de aplicación de los ensayos sandwich altamente sensibles, por ejemplo para la monitorización de terapias, en donde se desea un margen de medición lo más grande posible.

A esto se añade, que en varios parámetros, como por ejemplo la mioglobina o el dímero D, es necesario por una parte un pequeño margen de detección, y por otro lado pueden presentarse muy altas concentraciones de estos analitos en el material de muestra, en parte muy por encima del límite de decisión “normal - patológico”. En estos casos sería deseable disponer de dispositivos de ensayo que tengan un margen de medición lo más grande posible para obtener sin una previa dilución de las muestras, valores de medición fiables. En particular, esto sería ventajoso para el empleo de dichos dispositivos de ensayo en el control del curso de las correspondientes sintomatologías.

En el estado actual de la técnica no faltan proyectos para solucionar los problemas descritos más arriba. De todas maneras hasta el momento, ninguna de las propuestas ha sido convincente en todos los puntos. En particular, la conversión del proyecto al campo de los dispositivos de ensayo inmuno-cromatográficos no se ha logrado satisfactoriamente hasta el momento.

La patente US 6.248.597 describe un inmunoensayo de aglutinación heterogéneo basado en la dispersión de la luz, en el cual el margen dinámico de medición es ampliado porque se emplea una mezcla de partículas con diferentes propiedades de dispersión. A este respecto, se inmovilizan sobre las partículas que ocasionan una gran dispersión de la luz, los socios de unión que tienen una alta afinidad para el analito. Sobre las partículas que ocasionan poca dispersión de la luz se inmovilizan por el contrario los socios de unión que tienen una afinidad más pequeña para los analitos.

Un procedimiento semejante está descrito en la patente US 5.585.241. En la misma se propone en conexión con un inmunoensayo de flujocitometría, para el aumento del margen dinámico de medición, emplear dos partículas de diferente tamaño con dos diferentes anticuerpos afines contra el mismo antígeno (partículas pequeñas con anticuerpos de alta afinidad; partículas grandes con anticuerpos de pequeña afinidad) y para la detección del antígeno mediante la formación de un complejo sandwich, emplear otro anticuerpo marcado detectable. El sistema propuesto trabaja por consiguiente con dos distintas curvas estándar (una para cada lugar de la partícula) y permite la determinación cuantitativa del analito mediante un complicado programa informático.

Para evitar el efecto “gancho” en el caso de altas concentraciones de analito (“high dose hook effect”)(“efecto gancho de las dosis altas”), la patente US 4.743.542 da a conocer un procedimiento según el cual junto a un anticuerpo marcado detectable contra el antígeno diana, se añade sencillamente a la muestra una determinada cantidad del mismo, pero de anticuerpo sin marcar. Con ello, entran en competencia ambos anticuerpos para la molécula del analito y para el efecto gancho típico aparece la sobresaturación - en general - solamente en el caso de altas concentraciones de antígeno. En consecuencia, se amplía el margen dinámico de medición a altas concentraciones, aunque de todas maneras, a coste de la sensibilidad. Con el mismo efecto, se propone el empleo de anticuerpos de pequeña afinidad.

La patente US 4.595.661 describe inmunoensayos sandwich heterogéneos, en los cuales se evita el efecto gancho de manera que, junto a un anticuerpo captador inmovilizado, se emplean dos anticuerpos solubles que tienen diferente afinidad y especificidad para el antígeno. El anticuerpo con poca afinidad contribuye marcadamente a este respecto, solamente a altas concentraciones de antígeno, para la señal de medición, y así evita que se note el efecto Hook.

A partir de la patente 5.073.484 se describe la detección cuantitativa con ayuda de varias zonas discretas de unión, dispuestas una después de otra, en un soporte capaz de ser atravesado por una corriente, de un analito inmunológicamente detectable. Cuanto más analito está presente en la muestra, en tantas más zonas tienen lugar las reacciones específicas de unión y detección. El número de zonas que después del contacto con la muestra presentan una coloración, es correlativo con la cantidad de analito en la muestra. La patente US 5.073.484 propone, para aumentar la exactitud y para la ampliación del margen de medición, elevar el número de zonas de unión. Es desventajoso para ello, que una evaluación automática de las zonas de unión requiera una óptica relativamente costosa, la cual está en situación en determinadas condiciones, de incluir y valorar simultáneamente un gran número de zonas para permitir de esta forma una determinación cuantitativa del analito. Además los dispositivos de ensayo, en base al relativamente gran número de zonas de unión discretas, separadas espacialmente unas de otras, deben ser correspondientemente largos.

ES 2 313 341 T3

Para un recorrido seguro de la muestra a través del dispositivo de ensayo debe operarse con volúmenes de muestra relativamente grandes, lo cual en particular para el caso que deba emplearse sangre entera, es igualmente desventajoso en particular debido a la obtención de la muestra.

5 La patente WO 00/31538 describe tiras de ensayo inmunocromatográficas en las cuales junto a una zona de detección del analito están dispuestas una o varias zonas de control sobre una matriz absorbente. Los socios de unión provistos de un marcado detectable, se unen a la matriz, tanto en la zona de detección del analito como también en las zonas de control. En las zonas de control se unen cantidades exactamente definidas de socios de unión marcados, por lo cual estas cantidades son independientes de la cantidad de analito en la muestra. De preferencia, en las zonas de control se unen diferentes cantidades del socio de unión marcado, de manera que en la tira de ensayo se obtienen casi unas escalas internas de comparación. En la evaluación de la zona de detección del analito se consultan las zonas de control para la calibración. Para aumentar el margen dinámico de medición, en particular para relaciones concentración-sígnal de medición, no lineales, la patente WO 00/31538 propone proveer zonas de control adicionales sobre la tira de ensayo.

15 La patente US 2003/0119204 describe tiras de ensayo inmunocromatográficas, las cuales junto a una zona de detección del analito contienen dos o más zonas de control sobre una matriz absorbente. Las dos o más zonas de control sirven para establecer una calibración interna determinando los valores de la intensidad sobre la tira de ensayo y poniéndolas en relación con concentraciones de analito previamente conocidas, de manera que se construye una curva de calibración o respectivamente una relación de calibración. Con su ayuda se determina en un siguiente paso a partir de la intensidad determinada de la zona de detección del analito, la concentración de analito. Un aumento del margen dinámico de medición a elevadas concentraciones de analito en las que el efecto de saturación limita el margen de medición, no es posible con este procedimiento.

25 En el trabajo de J. Hampl *et al.*, "Upconverting Phosphor Reporters in Immunochromatographic Assays" ("Informadores de la sobreconversión del fósforo en ensayos inmunocromatográficos"), *Analytical Biochemistry* **288**, 176 - 187 (2001), se describe el utilizar en las tiras de ensayo inmunocromatográficas, el marcado fluorescente para la detección del analito, en la propia zona de detección ("línea diana"), la cual contiene una forma inmovilizada de anticuerpos específicos para el analito, y también la zona de control ("línea de control") la cual contiene una forma inmovilizada de un anticuerpo específico de la especie, para efectuar la evaluación de la señal de medición. Una aplicación análoga está descrita por OraSure Technologies, Inc., Bethlehem, PA, U.S.A. en www.orasure.com. La evaluación tanto de la "línea diana" como también de la "línea de control" tiene lugar fundamentalmente para eliminar las variaciones en la señal de medición que son motivadas en la zona ópticamente medida mediante la cantidad efectiva de líquido. Indirectamente con ello, aumenta la sensibilidad del procedimiento de detección (ensayos) (ocurre pues una ampliación del margen dinámico de medición para concentraciones pequeñas). Por el contrario, no se ha informado sobre una ampliación del margen dinámico de medición para concentraciones mayores.

35 Una ampliación del margen dinámico de medición de dispositivos de ensayo inmunocromatográficos puede de hecho también lograrse diluyendo correspondientemente el material de muestra, antes del análisis. Una ampliación del margen de medición logrado de esta forma es sin embargo insatisfactorio, puesto que para ello es necesario un paso manual del análisis potencialmente creador de errores. Además, particularmente en los casos en los cuales un analito en muestras semejantes puede encontrarse posiblemente tanto en concentraciones muy altas como también en concentraciones muy pequeñas, una dilución controlada de la muestra únicamente es aconsejable cuando el analito está en altas concentraciones en la muestra, pero no en el caso contrario, puesto que en este caso, generalmente en determinadas circunstancias, el límite inferior de detección disminuye con la dilución y el analito de la muestra, equivocadamente, no se detecta.

40 Para los dispositivos de análisis inmunocromatográficos no existen hasta ahora posibilidades sencillas y seguras de ampliar el margen dinámico de medición para altas concentraciones de analito, sin perjudicar el límite inferior de detección, para la detección del analito.

45 La presente invención tiene como fundamento la tarea de solucionar las desventajas del estado actual de la técnica. En particular, un objetivo de la presente invención es el de ampliar el margen dinámico de medición basándose en reacciones específicas de unión, en particular elementos de análisis inmunológicos para concentraciones altas de analito, y cuando esto en particular sea posible, que no tenga que tolerarse a cambio, ningún deterioro con respecto al límite inferior de detección.

Esta tarea se resuelve mediante el objeto de la invención.

60 El objeto de la invención es un procedimiento según la reivindicación 1 y un empleo según la reivindicación 9. Las formas de ejecución preferidas de la invención son objeto de las reivindicaciones secundarias.

65 La invención hace posible desplazar el margen dinámico de medición de elementos de ensayo basados en reacciones específicas de unión, en particular inmunológicas, para más altas concentraciones de analito, sin tener que tolerar a cambio, deterioros con respecto a los límites de detección. Para ello se propone preparar, según la invención, por lo menos dos zonas en, o sobre, el elemento de ensayo, las cuales contienen los reactivos, los cuales en base a la distinta afinidad para los analitos (por ejemplo en el caso de diferentes anticuerpos afines contra los analitos), o en base a diferentes principios de la interacción con los analitos, o con otros reactivos participantes en la detección del

ES 2 313 341 T3

analito (por ejemplo anticuerpos dirigidos contra los analitos en una zona y el analito o el análogo al analito en otra zona), producen unas señales detectables fuertemente diferentes. “Diferentes principios de la interacción” pueden ser por ejemplo diferentes principios de ensayo, por ejemplo la formación de complejos sandwich en una zona y la conducción competitiva del ensayo en otra zona. Para la evaluación de la relación concentración de analito - intensidad de la señal, se utilizan las señales por lo menos de dos zonas y mediante un procedimiento adecuado (correlación) se utilizan para la determinación del analito.

Las dos zonas importantes en el procedimiento según la invención, en o sobre el elemento de ensayo, reciben los nombres, de aquí en adelante, para una mejor comprensión y diferenciación, de zona de detección del analito (abreviadamente: zona de detección), y zona de control. Esta denominación debe también mantenerse aún cuando, según el uso convencional del idioma, sea inusual, por ejemplo cuando en las zonas se aplican distintos socios de unión que son afines, y por esta razón se puede observar una señal solamente a partir de una concentración umbral del analito.

La invención comprende también un procedimiento en el cual se evalúan más de 1 zona de detección y/o más de 1 zona de control sobre un elemento de ensayo. Por ejemplo el procedimiento puede emplearse también para la evaluación de elementos de ensayo, los cuales contienen una franja de detección con socios de unión altamente afines, una franja de detección con socios de unión muy poco afines, y una zona de control (que contiene por ejemplo un análogo del analito inmovilizado).

La solución según la invención se refiere en particular a la ampliación del margen de medición de dispositivos de ensayo inmunológico mediante la evaluación cuantitativa adicional de la región de control en los ensayos sandwich. Este sirve habitualmente solamente como control funcional para el usuario y no se utiliza para la cuantificación del analito. Con un contenido creciente de analito se capturan sin embargo cada vez más conjugado-anticuerpo-marca en la franja de señales o se satura con analito, de forma que cada vez se une menos conjugado-anticuerpo-marca (por ejemplo conjugado- anticuerpo-oro) en la franja de control. La franja de control disminuye por ello la intensidad de la señal con una concentración creciente de analito. Mediante mediciones simultáneas de la intensidad de la señal (por ejemplo mediante la medición de la remisión o de la fluorescencia) en la franja de control y en la franja de la señal, y el cálculo efectuado con ambas intensidades de la señal, con un algoritmo apropiado, se puede mejorar claramente el margen dinámico de medición así como la pendiente de la curva de calibración (y con ello también la precisión a altas concentraciones).

Análogamente, esto sirve naturalmente también para elementos de ensayo que se basan en otras reacciones de unión específicas inmunológicas. En correspondencia, las reacciones de unión específicas son ya conocidas por el especialista. Como ejemplo pueden citarse los siguientes pares de unión:

Anticuerpos con haptenos, antígenos u otros anticuerpos (por ejemplo interacciones anticuerpo-anticuerpo específicas de especies), en donde parcialmente son suficientes en cada caso también, fragmentos de estas especies;

Biotina con avidina o estreptavidina;

Hormona con el receptor de la hormona;

Azúcar con lectina;

Ácido nucleico con ácido nucleico complementario; y similares.

Con el fin de una mejor comprensión y visión general, a a partir de ahora se debe acceder principalmente sobre pares de unión inmunológicos, es decir sobre los pares de unión anticuerpo con hapteno o respectivamente antígeno o respectivamente anticuerpo, sin que esto deba ser sin embargo limitante sobre esta forma de ejecución preferida, pero no única, de la invención.

El procedimiento según la invención sirve en particular para la ampliación del margen dinámico de medición a altas concentraciones de analito en las cuales aparece el efecto de saturación limitando el margen de medición, en particular el “High-Dose Hook-Effect” “Efecto gancho de las dosis altas”, sin ninguna influencia sobre el límite inferior de detección, con ayuda de un elemento de ensayo inmunológico. El elemento de ensayo tiene a este respecto tanto una zona de detección del analito como también una zona de control. La muestra es puesta en contacto con el elemento de ensayo y con los reactivos específicos para el analito, y el analito - siempre que esté contenido en la muestra - conduce mediante la acción recíproca con los reactivos específicos a una señal detectable en la zona de detección del analito. La señal de medición depende de la cantidad de analito en la muestra. Una parte de los reactivos específicos que no entran en interacción con el analito o respectivamente los reactivos que no entran en acción recíproca en la zona de detección, conduce en la zona de control a una señal detectable. A este respecto, es importante que esta señal detectable en la zona de control sea igualmente dependiente de la cantidad de analito en la muestra. Las señales en la zona de detección del analito y en la zona de control, se miden y mediante un algoritmo apropiado, por ejemplo entre sí, se utilizan para efectuar el cálculo. El resultado del cálculo se compara con una curva de calibración, y finalmente se determina la concentración del analito.

ES 2 313 341 T3

Los analitos apropiados según la invención, son analitos, los cuales se pueden detectar en base a una relación específica de la pareja de unión. En particular, para el caso preferido de la detección inmunológica, éstos son anticuerpos, antígenos, haptenos (inclusive en cada caso, los fragmentos de los mismos). Son particularmente preferidos los analitos detectables inmunológicamente hCG, BNP, (NT-) proBNP, troponina I, troponina T, mioglobina, D-dímero, CRP, HIV, HCV, CD40, CK-MB, TSH, etc.

Como muestra, a partir de la cual deben ser determinados los analitos, son adecuados según la invención, todos los líquidos o aquellos materiales de muestra que pueden ser transformados en una forma líquida. En particular, los más adecuados son los líquidos corporales como la sangre y las fracciones derivadas de la misma (suero, plasma), saliva, orina, líquido cerebroespinal, esperma, líquido intersticial, sudor, y similares. Son también adecuados aquellos materiales de muestra que no son líquidos en sí mismos, pero pueden transformarse en una fase líquida mediante su disolución o suspensión en disolventes, en particular en disolventes acuosos.

Los elementos de ensayo que pueden emplearse inmunológicamente según la invención son ya conocidos por el experto. La detección del analito con ayuda de dichos elementos de ensayo se basa en una interacción específica entre el analito y un socio de unión. Estas interacciones comprenden los pares de unión antígeno/anticuerpo, anticuerpo/anticuerpo, hapteno/anticuerpo, fragmento de antígeno/anticuerpo, fragmento de anticuerpo/anticuerpo, etc. Como ya se citó al principio, los elementos de ensayo contienen en su mayoría un material capaz de ser atravesado por una corriente (por ejemplo, papel, napa, membrana, canal capilar), el cual eventualmente está fijado sobre un soporte inerte. Típicamente un elemento de ensayo presenta una o varias zonas de entrega de muestras, zonas de absorción, zonas de cromatografía, zonas de detección, zonas de reacción, y zonas de control. Es importante para la invención únicamente, que por lo menos estén presentes una zona de detección (del analito) y por lo menos una zona de control.

Como zona de detección del analito sirve típicamente un material espacialmente de límites estrechos, separada del margen de la zona de control, en o sobre el material capaz de ser atravesado por una corriente, en el cual en el curso del empleo según la determinación del elemento de ensayo puede detectarse una especie cuya masa está unida a la del analito de tal manera que puede ser detectada visualmente, ópticamente, o de otra forma. Típicamente se une un socio de unión detectable para el analito, por ejemplo un correspondiente anticuerpo anti analito marcado, mediante una interacción específica en la zona de detección del analito. Con esta finalidad, se encuentra en la zona de detección del analito un socio de unión correspondiente, inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo contra el analito (de forma que puede formarse un complejo sandwich detectable, del anticuerpo inmovilizado, del analito y del anticuerpo marcado detectable) o una especie de otra pareja de unión, por ejemplo la (poli-)(estrept-)avidina (de manera que puede formarse un complejo sandwich formado previamente a partir de un anticuerpo biotinilado, un analito y un anticuerpo marcado detectable). La construcción, funcionamiento y otras modificaciones de dichas zonas de detección son ya conocidas en sí mismas por el experto.

Como zona de control sirve típicamente una zona de límites estrechos separada de la zona de detección del analito, y en su mayoría situada aguas abajo de la misma, o en el material capaz de ser atravesado por una corriente, en el cual en el curso del empleo según la determinación del elemento de ensayo, independientemente de la presencia del analito en la muestra está unido de tal forma a una especie, que puede ser detectado visualmente, ópticamente o de otra manera. La zona de control sirve habitualmente para el control del funcionamiento del elemento de ensayo. Una señal en la zona de control prueba que la muestra atraviesa debidamente el soporte capaz de ser atravesado por una corriente e idealmente que los reactivos de unión correspondientes son capaces de funcionar. Típicamente un socio de unión para el analito, detectable, por ejemplo un anticuerpo-anti-analito correspondientemente marcado, está unido mediante una acción recíproca específica, en la zona de control. Para esta finalidad se encuentra en la zona de control un correspondiente socio de unión, inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo contra el anticuerpo-anti analito marcado (de manera que se puede formar un complejo detectable a partir del anticuerpo inmovilizado y el anticuerpo marcado detectable) o un análogo de analito inmovilizado (de forma que se puede formar un complejo de analito y anticuerpo marcado detectable). La construcción, funcionamiento y otras modificaciones de dichas zonas de control ya son conocidas por el experto.

Los reactivos específicos contenidos en el elemento de ensayo, o los reactivos específicos añadidos al elemento de ensayo, o respectivamente a la muestra (llamados también como sinónimos "socios específicos de unión"), entran en una reacción de unión selectiva con el analito o con los socios de unión inmovilizados sobre el soporte. Ellos permiten directa o indirectamente formular una conclusión sobre la cantidad de analito presente en la muestra.

Son socios de unión preferidos los anticuerpos (en alemán Antikörper ó AK; en inglés antibodies ó AB), en particular los anticuerpos policlonales (en alemán polyklonale Antikörper ó PAK; en inglés polyclonal antibodies ó PAB) o anticuerpos monoclonales (en alemán monoklonale Antikörper ó MAK; en inglés monoclonal antibodies ó MAB), así como antígenos y haptenos, así como fragmentos de los mismos, mientras sean activos para la finalidad de la detección específica de analitos.

De preferencia, una parte del socio de unión se encuentra disponible sobre el dispositivo de ensayo de manera que puede ser disuelto por éste mediante el líquido de muestra, por ejemplo, mediante la impregnación de materiales soporte apropiados como, la napa, membranas, etc. ó mediante la aplicación y secado en correspondientes estructuras de canales (capilares).

ES 2 313 341 T3

Sin embargo, es también posible, añadir por lo menos uno de los socios de unión en forma de reactivo disuelto, para un ensayo rápido, por ejemplo mezclar la muestra con la solución de reactivos o aplicar la solución de reactivos independientemente de la muestra, sobre el dispositivo de ensayo. Según la invención, es también posible, aunque es menos preferido, poner todos los socios de unión específicos en una solución o en varias soluciones. Sobre el dispositivo de ensayo se encuentra entonces en la zona de detección solamente otro socio de unión el cual puede captar el correspondiente socio de unión específico marcado, y así crear una unión indirecta del analito en fase sólida del ensayo rápido. Análogamente se encuentra en la zona de control un socio de unión, el cual puede captar el correspondiente socio de unión específico marcado, sin que sea necesaria una participación directa del analito.

Tanto en la zona de detección como también en la zona de control, un socio de unión allí inmovilizado conduce a una señal detectable. A este respecto, es posible, aunque no es lo preferido, que las señales en ambas zonas estén basadas en principios distintos. Por el contrario, se prefiere que tanto la señal en la zona de detección del analito así como también en la zona de control tenga su fundamento en los mismos principios. Las señales detectables son por ejemplo, las ópticamente o visualmente registrables, variaciones de color, señales luminiscentes en particular de fluorescencia, radiación radiactiva y similares. La señal detectable se origina a este respecto, a partir de una especie correspondientemente marcada (socio de unión), la cual - como se ha expuesto más arriba - está unida en la zona de detección del analito o en la zona de control. Como marcas del socio de unión entran, según la invención, entre otras, en cuestión: marcas particulares por ejemplo el empleo de látex coloreado, marcas de polímero o nano cristales semiconductores (los llamados "Quantum Dots") o marcas de un metal(sol) (oro, selenio, etc.), así como marcas no particulares (marcas de enzimas, radioisótopos, fluorescentes) y similares.

Según la marca empleada son necesarios y posibles naturalmente, otros métodos de detección (p.ej. medición por fluorescencia, medición por radiactividad, determinación de la actividad enzimática, etc.). Con estos métodos de detección se pueden medir las señales producidas en la zona de detección del analito y de la zona de control, en particular, con instrumentos de medición contruidos correspondientemente. Los mismos, son ya conocidos por el experto en el estado actual de la técnica. Según la invención es importante sin embargo, que se registre tanto la señal en la zona de detección del analito como también en la zona de control del aparato de medición. Aparatos de medición y procedimientos apropiados para la evaluación de elementos de ensayo son ya conocidos por el experto en el estado actual de la ciencia. Como ejemplo típico para un aparato de medición puede citarse el sistema "Cardiac Reader" ("lector cardíaco") de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. En este caso, se ilumina una tira de ensayo inmunológico mediante una o varias fuentes de luz (por ejemplo LEDs), y mediante la medición de la remisión local extinguida, se determinan los valores grises de la zona de detección (franja de señales) y de la zona de control. Un correspondiente procedimiento de medición y evaluación está descrito por ejemplo en la patente US 5.717.778.

Según la invención, se registran tanto las señales de la zona de control como también de la zona de detección, y se efectúa el cálculo entre sí, mediante un procedimiento matemático adecuado. Esto tiene lugar por ejemplo en la unidad central de cálculo del aparato de medición. Es importante según la invención, que ambas señales sean dependientes de la concentración del analito, por lo menos en determinados márgenes de concentración del analito. Mediante un procedimiento matemático, explicado como ejemplo más detalladamente en dependencia con los ejemplos siguientes, es posible ampliar el margen dinámico de medición de los elementos de análisis (comparar con la evaluación única de la señal en la zona de detección).

La determinación de la concentración del analito a partir de las señales medidas de las zonas de detección y de control, se efectúa como habitualmente, mediante la comparación de los valores de medición con las correspondientes curvas de calibración que fueron obtenidas mediante la medición de soluciones estándar con cantidades conocidas de analito. De preferencia, para el establecimiento de la curva de calibración se utilizan tanto las señales de la franja de detección como también de la franja de control.

Una posible realización del procedimiento según la invención prevé que los reactivos que conducen a una señal detectable en la zona de detección del analito y en la zona de control, tengan una diferente afinidad, o respectivamente capacidad de reacción, con el analito. De preferencia participan en la zona de control, reactivos muy poco afines, o respectivamente pocos anticuerpos reactivos, contra los analitos en la formación de la señal, como en la zona de detección del analito.

Una posible realización alternativa del procedimiento según la invención, prevé que los reactivos que conducen, en la zona de detección del analito y en la zona de control, a una señal detectable, en base a diferentes principios de la acción recíproca del analito o con otros reactivos que participan en la detección del analito, originen señales distintas fuertemente detectables. En particular pueden unirse en la zona de detección del analito, anticuerpos dirigidos contra los analitos, y en la zona de control, el analito o un análogo del analito. También es posible que en la zona de control un socio de unión inmovilizado se una a otro epitopo del anticuerpo o a un elemento estructural heterólogo, el cual fue añadido sintéticamente al anticuerpo, o que un anticuerpo específico de la especie contra el anticuerpo a inmovilizar sea inmovilizado en la zona de control. Todas estas variantes son ya conocidas por el experto en el estado actual de la técnica.

Existe una posibilidad, de extender el margen de medición hasta muy altas concentraciones, mediante la adición de un llamado "high dose hook effect" ("efecto gancho de las dosis altas"). En este caso disminuye de nuevo la intensidad

ES 2 313 341 T3

de la franja de la señal a muy altas concentraciones del analito, dado que la cantidad de anticuerpo disponible ya no es suficiente en cualquier caso para formar un complejo sandwich. Se forman complejos múltiples de analito y un anticuerpo (-conjugado) en cada caso. En este margen de concentración la intensidad o respectivamente la dependencia de la concentración de la franja de control puede ser demasiado débil para ser evaluable. Por el contrario, es evaluable la disminución de la intensidad de la franja de la señal en dependencia de la concentración. Por lo tanto para este caso existen tres márgenes de evaluación:

1. Aumento de intensidad de la franja de la señal en dependencia de la concentración
2. Disminución de la intensidad de la franja del control en dependencia de la concentración
3. Disminución de la intensidad de la franja de la señal en dependencia de la concentración

Puede lograrse una diferenciación automática entre los tres márgenes citados por ejemplo mediante el siguiente algoritmo:

A) en el caso de que la remisión de la franja de la señal sea más grande que X1%, y la remisión de la franja de control sea más pequeña que Y1%; evaluar solamente la franja de la señal y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito de A1 hasta A2 mg/ml.

B) en el caso de que la remisión de la franja de la señal sea más pequeña que X2% y la remisión de la franja del control sea mayor que Y2% y más pequeña que Y3%, evaluar solamente la franja del control y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito desde A3 hasta A4 mg/ml.

C) en el caso de que la remisión de la franja de la señal sea mayor que X3 y la remisión de la franja del control sea mayor que Y4%, evaluar solamente la franja de la señal y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito de A5 hasta A6 mg/ml.

La invención se describe con más detalle a la vista de los siguientes ejemplos y figuras. Aunque en los ejemplos se muestran como ejemplos, solamente dispositivos de ensayo inmunológicos, los cuales trabajan con socios de unión marcados en oro y se mide fotométricamente la remisión, la invención no está limitada por los mismos. Junto a las acciones recíprocas inmunológicas, basadas sobre pares de unión antígeno (o respectivamente hapteno)-anticuerpo, son también posibles otros pares de unión, en particular hormona- receptor, azúcar-lectina, ácido nucleico-ácido nucleico complementario, biotina-(estrept)-avidina, y similares. Además de las marcas en oro son posibles también otras marcas particulares como por ejemplo el empleo de latex de colores, marcas con polímero, o nanocristales semiconductores (los llamados "Quantum Dots") u otras marcas de metal(sol), así como marcas no particulares (marcas de enzimas, de radioisótopos, de fluorescencia) y similares. Según la marca empleada son también necesarios y posibles naturalmente, otros métodos de detección (por ejemplo medición por fluorescencia, medición por radioactividad, determinación de la actividad enzimática, etc.). Estas variaciones son ya conocidas por el experto en una gran cantidad de posibilidades de ejecución.

En la figura 1 se representa esquemáticamente una forma preferida de ejecución de un dispositivo de análisis a emplear según la invención en forma de una tira de ensayo inmunocromatográfica.

En la figura 2 se representan los valores relativos de la remisión (R en %) en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control (KS) en dependencia de la concentración de troponina T en la muestra (C en ng/ml).

En la figura 3 se representan las curvas de calibración para una tira de ensayo de troponina-T, que resultan de emplear los algoritmos descritos más exactamente en el ejemplo 2, en a) (estado actual de la técnica), y b) (invención) sobre los valores de medición de la figura 2.

En la figura 4 está reproducida la curva de calibración para una tira de ensayo de troponina T, que resulta de emplear en la algoritmo descrito más exactamente en el ejemplo 2, en c) (invención) sobre los valores de medición de la figura 2.

En la figura 5 están representados los valores de la remisión (R en %) en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control (KS) en dependencia de la concentración de NT-proBNP en la muestra (C en ng/ml).

En la figura 6 están reproducidas las curvas de calibración para una tira de análisis NT-proBNP, las cuales resultan de emplear los algoritmos descritos más exactamente en el ejemplo 3, en a) (estado actual de la técnica), y b) (invención), sobre los valores de medición de la figura 5.

En la figura 7 están representados los valores relativos de la remisión (R en %) en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control (KS) en dependencia de la concentración del dímero D en la muestra (c en $\mu\text{g/ml}$) en tres figuras parciales (las cuales se refieren cada vez a distintos márgenes de concentración).

ES 2 313 341 T3

Los números en las figuras, significan:

- 1 zona de entrega de la muestra
- 5 2 zona de separación de los eritrocitos
- 3 zona de detección
- 4 zona de absorción
- 10 5 material de soporte
- 6 matriz de entrega de la muestra (“napa de biotina” y “napa de oro”)
- 15 7 matriz de separación de los eritrocitos
- 8 matriz de detección
- 9 primera zona de inmovilización en forma de una franja (franja de detección; zona de detección del analito)
- 20 10 segunda zona de inmovilización en forma de una franja (franja de control; zona de control)
- 11 matriz de absorción

Ejemplos

1) *preparación de un dispositivo de ensayo para la determinación de antígenos a partir de sangre entera (comparar con figura 1)*

El dispositivo de ensayo (figura 1) consiste en un material de soporte (5) sobre el cual se aplican, una zona de entrega de la muestra (1), una zona de separación de los eritrocitos (2), una zona de detección (3) y una zona de absorción (4). En la zona de entrega de la muestra (1) está colocada una matriz de entrega de muestras (6), la cual solapa parcialmente la matriz de separación de los eritrocitos (7). La matriz de separación de los eritrocitos (7) por su parte solapa algo la matriz de detección (8) (zona de detección), sobre la poliestreptavidina en forma de una franja (9) como franja de detección, y el antígeno o respectivamente un análogo de antígeno, por ejemplo un antígeno-péptido sintético o respectivamente recombinante, en forma de una franja como franja de control, están inmovilizados. Una matriz de absorción (10) solapa algo la matriz de detección (8). En la matriz de entrega de muestras (6) están aplicados todos aquellos reactivos que son necesarios para la formación de un complejo con el analito a detectar. En el caso presente, la zona de entrega de la muestra consta de 2 napa colocadas una encima de otra, en donde la primera (“napa de oro”) está impregnada con un anticuerpo contra el analito marcado en oro, y la segunda napa (“napa de biotina”) contiene un anticuerpo biotinilado contra el analito. El analito es aquí un antígeno que se encuentra en la sangre, en particular la troponina T, NT-proBNP ó el dímero D.

Como franja de soporte 5, se emplea una lámina de poliéster de 350 μm de grueso (Pütz). Como “napa de oro” o respectivamente “napa de biotina” de la matriz de entrega de la muestra 6, se emplea una napa de poliéster de 360 μm de grueso (Roche Diagnostics). Como matriz de separación de los eritrocitos 7, se emplea una napa de fibra de vidrio de 1,8 mm de grueso (Roche Diagnostics). Como matriz de detección 8, se emplea una membrana de nitrocelulosa de 140 μm de grueso (Sartorius). Como matriz de absorción 10, se emplea una napa de fibra de vidrio de 1,8 mm de grueso (Roche Diagnostics). Los componentes individuales (6, 7, 8, 11) están pegados ligeramente solapados sobre la franja del soporte 5, como muestra la figura 1, mediante un adhesivo de fusión.

Las recetas de impregnación para las “napas de oro y de biotina” de los ejemplos mencionados son:

Tira de ensayo de probBNP:

- 55 “Napa de biotina”: 100 mM de Hepes, pH 7,4, 0,1% de Tween[®],
anticuerpo biotinilado contra los analitos
- 60 “Napa de oro”: 100 mM de Hepes, pH 7,4,
anticuerpo contra los analitos como conjugado de oro

Tira de ensayo de troponina T:

- 65 “Napa de biotina”: 100 mM de MES, pH 5,6
anticuerpo biotinilado contra los analitos

ES 2 313 341 T3

“Napa de oro”: 100 mM de ácido succínico, pH 5,6, 0,1% de Tween
anticuerpo contra los analitos como conjugado de oro

5 Tira de ensayo de dímero D:

“Napa de biotina”: 100 mM de Hepes, pH 7,4, 0,1% de Tween®,
anticuerpo biotilado contra los analitos

“Napa de oro”: 100 mM de Hepes, pH 7,4,
anticuerpo contra los analitos como conjugado de oro

15 2) *evaluación de una tira de ensayo para la determinación de la troponina-T (figura 2 hasta figura 4)*

20 Se trataron tiras de ensayo de troponina T según el ejemplo 1, con muestras de sangre entera a la cual se había añadido troponina T en diferentes cantidades, obtenida recombinantemente. Las tiras se evaluaron, o bien según dos procedimientos según la invención (variantes b) y c), ver más abajo), o bien, con fines comparativos, según el procedimiento convencional (variante a)). Se determinó la remisión para la franja de detección (NS) (9) y la franja de control (KS) con un aparato convencional de medición montado sobre una cámara CCD (Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH), y se utilizaron las señales para el cálculo según el siguiente algoritmo:

- 25 a) $[\text{Rem NS}(0) - \text{Rem NS}(c)]$
b) $[\text{Rem KS}(0) - \text{Rem KS}(c)] + [\text{Rem NS}(0) - \text{Rem NS}(c)]$
30 c) $[\text{Rem KS}(0) - \text{Rem NS}(c)] * [\text{Rem NS}(0) - \text{Rem NS}(c)]$

donde la alternativa a) del algoritmo representa solamente la evaluación habitual de la franja de detección según el estado actual de la técnica. Según la invención, se utilizan b) y c) para la evaluación tanto de la señal de la franja de detección como también la señal de la franja de control.

35 En las fórmulas, significan:

Rem NS (0) remisión de la franja de detección en % en concentración de analito 0

40 Rem NS (c) remisión de la franja de detección en % en concentración de analito c

Rem KS (0) remisión de la franja de control en % en concentración de analito 0

Rem KS (c) remisión de la franja de control en % en concentración de analito c

45 En la figura 2, están representados los valores relativos de la remisión (R en %) en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control (KS) en dependencia de la concentración de troponina T en la muestra (c en ng/ml). La figura 2 muestra la disminución de la señal (aumento de la remisión) de la franja de control con una concentración creciente de la analito en un aumento simultáneo de la señal (disminución de la remisión) de la franja de detección.

50 En la figura 3 se reproducen las curvas de calibración para una tira de ensayo de troponina T, las cuales proporcionan mediante el empleo de los algoritmos más arriba citados a) (estado actual de la técnica), y b) (invención), los valores de medición de la figura 2. En la figura 4 se reproduce la curva de calibración para una tira de ensayo de troponina T, la cual mediante el empleo del algoritmo c) descrito con mayor detalle más arriba (invención), proporciona los valores de medición de la figura 2. Mientras que con la sola evaluación de la franja de detección (algoritmo a)) en este ensayo de determinación de la concentración solamente pueden efectuarse determinaciones de la concentración hasta aproximadamente 10 ng/ml, mediante la evaluación del KS y NS según los algoritmos b) y c), pueden determinarse todavía concentraciones de más de 20 ng/ml.

60 3) *evaluación de una tira de ensayo para la determinación de la NT-proBNP (figura 5 hasta 6)*

65 Se trataron tiras de ensayo NT-proBNP según el ejemplo 1, con muestras de sangre entera a las cuales se había añadido NT-proBNP sintético en distintas cantidades. Las tiras se evaluaron tanto según el procedimiento según la invención (variante b), ver más abajo), como también con fines comparativos según el procedimiento convencional (variante a)). Se determinó la remisión para la franja de detección (NS) (9) y para la franja de control (KS), con un aparato de medición convencional montado sobre una cámara CCD (Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH), y se utilizaron las señales para el cálculo según el siguiente algoritmo:

ES 2 313 341 T3

- a) 1 - Rem NS (c)
- b) Rem KS (c) : Rem (c)

5 en donde la alternativa a) del algoritmo representa solamente la evaluación habitual de la franja de detección según el estado actual de la técnica. Según la invención se utiliza tanto la alternativa b) para la evaluación de la señal de la franja de detección como también la señal de la franja de control.

Las abreviaturas en las fórmulas tienen el mismo significado que en el ejemplo 2.

10

En la figura 5 están representados los valores relativos de la remisión (R en %) en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control (KS) en dependencia de la concentración de NT-proBNP en la muestra (c en ng/ml). La figura 5 muestra la disminución de la señal (aumento de la remisión) de la franja de control con una concentración creciente de analito en un aumento simultáneo de la señal (disminución de la remisión) de la franja de detección.

15

En la figura 6, se reproducen las curvas de calibración para una tira de análisis NT-proBNP, las cuales resultan del empleo del algoritmo a) citado más arriba (estado actual de la técnica), y b) (invención) sobre los valores de medición de la figura 5. Mientras que con la sola evaluación de la franja de detección (algoritmo a) solamente pueden efectuarse en este ensayo, determinaciones de la concentración hasta aproximadamente 6 ng/ml, mediante la evaluación del KS y NS según el algoritmo b), pueden determinarse todavía concentraciones de más de 14 ng/ml.

20

4) Evaluación de una tira de ensayo para la determinación del dímero D (figura 7)

25

Se trataron tiras de ensayo de dímero D según el ejemplo 1 (en la franja de detección el anticuerpo biotinilado el cual está dirigido contra los analitos, está inmovilizado; por el contrario la franja de control consta de fragmentos de fibrina inmovilizados, los cuales contienen el elemento estructural del dímero D; a los mismos puede unirse el anticuerpo-oro libre-conjugado), con muestras de sangre entera a las cuales se había añadido fragmentos de fibrina conteniendo el dímero D en diferentes cantidades. Las tiras se evaluaron tanto según el procedimiento según la invención (variante b, ver más abajo) como también, para fines comparativos, según el procedimiento convencional (variante a). Se determinó la remisión para la franja de detección (NS) (9) y para la franja de control (KS) con un aparato de medición convencional montado sobre una cámara CCD (Cardiac Reader, Roche Diagnostics GmbH), y se utilizaron las señales para el cálculo según el siguiente algoritmo:

30

35 a) Rem NS (c)

b) 1) en caso de que la remisión en la franja de la señal sea mayor del 30% y la remisión en la franja de control sea más pequeña del 40%, evaluar solamente la franja de la señal de (Rem NS(c)) y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito de 0 hasta 3 $\mu\text{l/ml}$.

40

2) en caso de que la remisión en la franja de la señal sea menor del 50% y la revisión en la franja de control sea mayor del 40% y menor del 70%, evaluar solamente la franja de control a partir de (Rem KS (c)), y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito de 3 hasta 20 $\mu\text{g/ml}$.

45

3) en caso de que la remisión en la franja de la señal sea mayor del 30% y la remisión en la franja de control sea mayor del 70%, evaluar solamente la franja de la señal a partir de (Rem NS (c)), y emplear la curva de calibración para concentraciones de analito de 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$.

50

en donde la alternativa a) del algoritmo representa solamente la evaluación habitual de la franja de detección según el estado actual de la técnica. Según la invención se emplea la alternativa b) para la evaluación tanto de la señal de la franja de detección como también la señal de la franja de control.

Las abreviaturas de las fórmulas tienen el mismo significado que en el ejemplo 2.

55

En la figura 7 están representados los valores relativos de la remisión (R en %), en la evaluación de la franja de detección (NS) y de la franja de control, en dependencia de la concentración del dímero D en la muestra (c en $\mu\text{g/ml}$).

60

Hasta una concentración del dímero D de 3 $\mu\text{g/ml}$, puede efectuarse la evaluación como habitualmente mediante la disminución de la remisión (aumento de la intensidad) de la franja de la señal. Hasta aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ puede evaluarse el aumento de la remisión (disminución de la intensidad) de la franja de control. A una concentración del analito superior a los 20 $\mu\text{g/ml}$, la dependencia a la concentración de la señal de la franja de control es demasiado pequeña. A partir de aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ hasta > 1000 $\mu\text{g/ml}$ el aumento de la remisión (disminución de la intensidad) de la franja de la señal puede ser empleado para la evaluación. Dado que el límite inferior del margen de medición es < 0,5 $\mu\text{g/ml}$, puede alcanzarse con ello un factor dinámico de > 1000.

65

ES 2 313 341 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la ampliación del margen dinámico de medición a altas concentraciones de analito, en las cuales el efecto de saturación limita el margen de medición, en particular el “High-Dose-Hook-Effect” (“efecto gancho de las dosis altas”), sin influir en el límite inferior de detección, basado en reacciones de unión específicas, en particular de un elemento de ensayo inmunológico, el cual tiene tanto una zona de detección del analito como también una zona de control, en donde:

10 a) se pone en contacto una muestra con el elemento de ensayo y con los reactivos específicos para un analito;

b) el analito - en tanto está presente en la muestra - conduce a una señal detectable mediante la acción recíproca con reactivos específicos, en la zona de detección del analito, la cual depende de la cantidad de analito en la muestra;

15 c) una parte de los reactivos específicos que no han entrado en acción recíproca con el analito o los reactivos en la zona de detección del analito, conduce a una señal detectable en la zona de control, la cual depende igualmente de la cantidad de analito en la muestra;

d) se mide la señal en la zona de detección del analito y en la zona de control;

20 e) se efectúa el cálculo con ambas señales mediante un algoritmo apropiado;

f) se compara el resultado obtenido con una curva de calibración; y

25 g) se determina la concentración del analito.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en el paso e), ambas señales se utilizan entre sí para el cálculo.

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque existen por lo menos dos distintas curvas de calibración para la zona de detección del analito y la zona de control, y en dependencia de las señales medidas en el paso d) ó bien solamente la señal de la zona de detección del analito o bien solamente la señal de la zona de control se comparan con la correspondiente curva de calibración.

35 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque para establecer la curva de calibración se emplean tanto las señales de la franja de detección como también las señales de la franja de control.

40 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque los reactivos que conducen en la zona de detección del analito y en la zona de control a una señal detectable, presentan diferentes afinidades o respectivamente diferentes reactividades con el analito.

45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque en la zona de control participan anticuerpos poco afines o respectivamente pocos anticuerpos reactivos contra el analito en la formación de la señal como también en la zona de detección del analito.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque los reactivos que conducen a una señal detectable en la zona de detección del analito y en la zona de control en base a diferentes principios de la interacción con el analito o con otros reactivos participantes de la detección del analito originan señales diferentes fuertemente detectables.

50 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque en la zona de detección del analito están unidos, anticuerpos dirigidos contra el analito, y en la zona de control está unido el analito o un análogo del analito.

55 9. Empleo de un elemento de ensayo basado sobre reacciones específicas de unión en particular inmunológicas, para la ampliación del margen dinámico de medición a altas concentraciones de analito en las cuales el efecto de saturación limita el margen de medición, en particular aparece el “High-Dose-Hook-Effect” (“efecto gancho de las dosis altas”), sin influir el límite inferior de detección, en donde el elemento de ensayo presenta tanto una zona de detección del analito como también una zona de control, y la señal detectada en la zona de detección del analito y la señal detectada en la zona de control dependen en cada caso de la cantidad del analito en la muestra, y ambas señales se utilizan para el cálculo mediante un algoritmo apropiado.

60 10. Empleo según la reivindicación 9, en donde:

a) se pone en contacto una muestra con el elemento de ensayo y con reactivos específicos para un analito;

65 b) se miden las señales en la zona de detección del analito y en la zona de control;

c) ambas señales se emplean conjuntamente para el cálculo;

ES 2 313 341 T3

d) el resultado del mismo se compara con una curva de calibración; y

e) se determina la concentración del analito.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

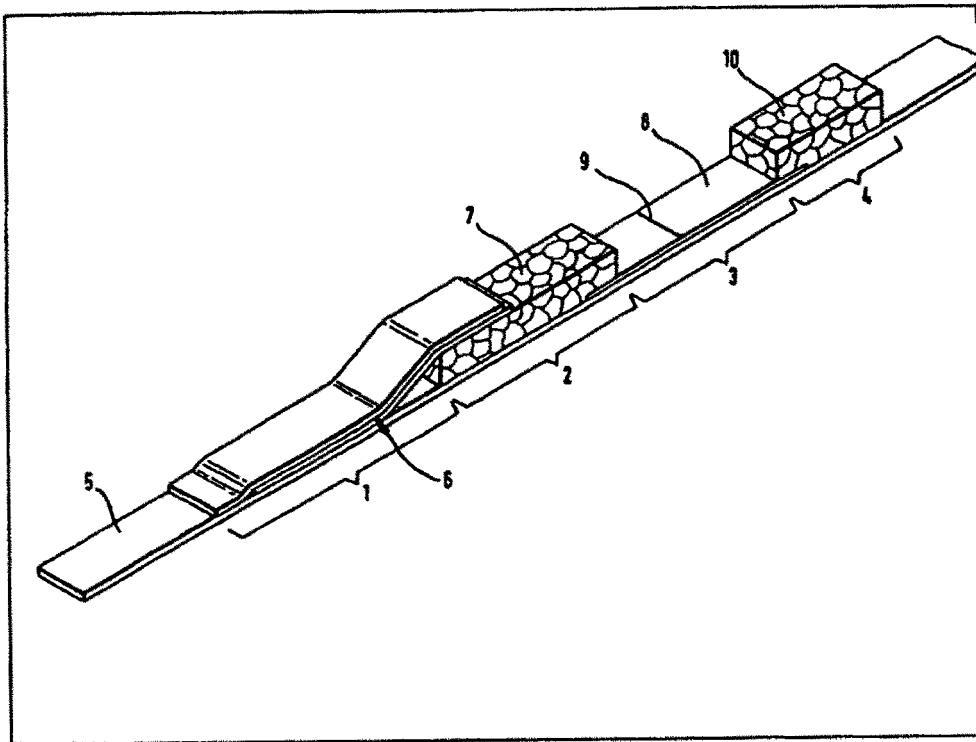


Fig. 2

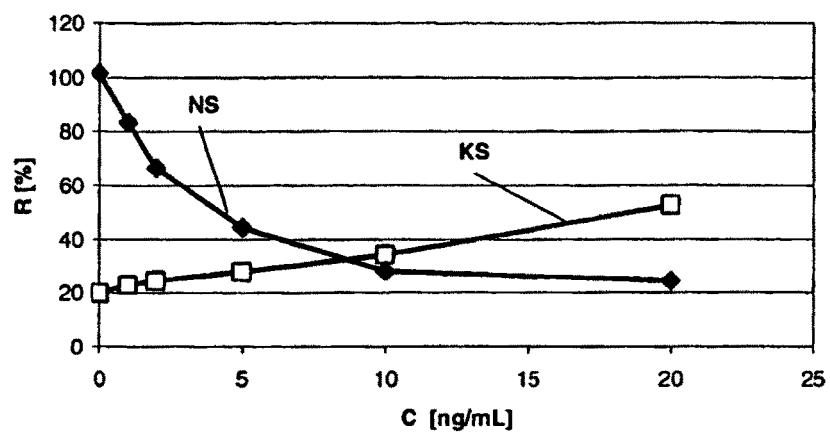


Fig. 3

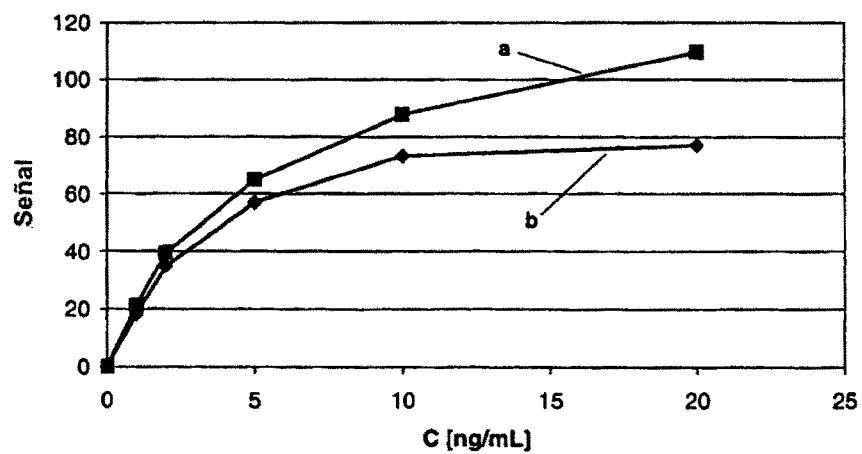


Fig. 4:

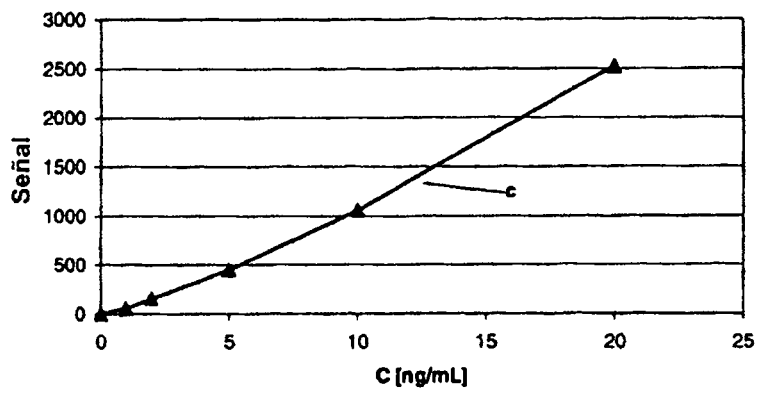


Fig. 5

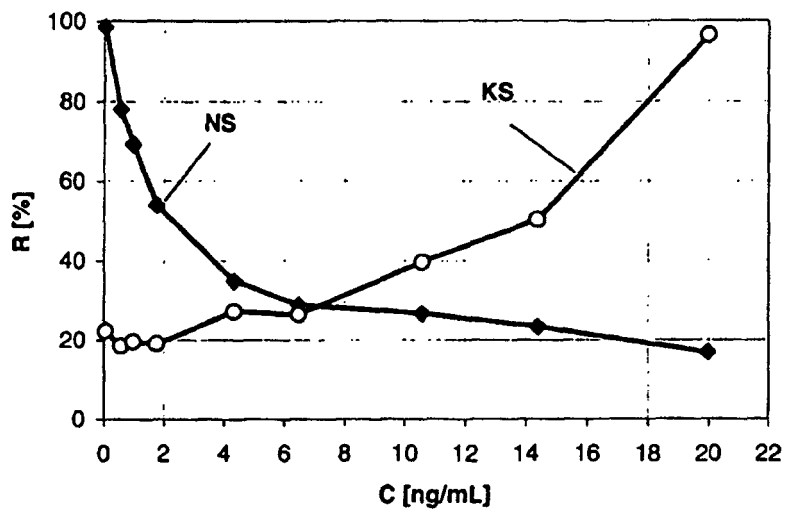


Fig. 6

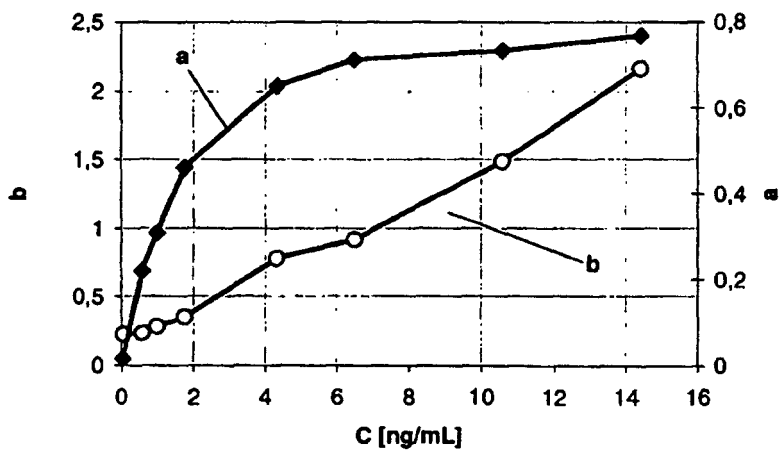


Fig. 7

