

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 082**

51 Int. Cl.:

G01N 33/536 (2006.01)

C12Q 1/6818 (2008.01)

G16B 40/10 (2009.01)

G16C 20/10 (2009.01)

G16C 20/30 (2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2020** **E 23189658 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025** **EP 4245862**

54 Título: **Método y kit para medir analitos en sistemas bicomponentes y usos de estos**

30 Prioridad:

25.06.2019 EP 19182157

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

14.05.2025

73 Titular/es:

**ACTOME GMBH (100.00%)
Georges-Köhler-Allee 103
79110 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**JENEY, CSABA y
KOLTAY, PETER**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 018 082 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

Método y kit para medir analitos en sistemas bicomponentes y usos de estos

5 La presente invención se refiere a un método y un kit para medir parámetros de un analito mediante el uso de métodos de detección bicomponentes y usos de estos. El método reivindicado comprende mediciones de diluciones del analito con un intervalo de concentración medible extendido de mediciones. Las mediciones se basan en la curva estándar no biyectiva predeterminada de las mediciones, lo que proporciona de esta manera un método para leer la curva estándar no biyectiva de un método de detección bicomponente para cada medición. De esta manera, la relación matemática para calcular la concentración del analito se determina correctamente en un intervalo de medición más amplio. En otro aspecto, la presente invención se relaciona con la aplicación de dicha curva estándar predeterminada no biyectiva del método de mediciones en métodos de detección bicomponentes compartimentados. En otro aspecto más, la presente invención se relaciona con la aplicación de dicha curva estándar predeterminada no biyectiva del método de mediciones mediante el uso de componentes identificados molecularmente únicos en métodos de detección bicomponentes compartimentados.

Antecedentes de la invención

Campo técnico

20 La presente invención se refiere a métodos y kits para medir parámetros de un analito mediante el uso de un método de detección bicomponente y usos de estos. También se describen aplicaciones de los métodos y kits.

Análisis de la técnica relacionada

25 En particular, los métodos y kits son adecuados para determinar la concentración de un analito mediante el uso de métodos de detección bicomponentes y se relacionan con una mayor magnitud del intervalo de medición mediante el uso de métodos de detección bicomponentes y usos de estos.

30 El efecto de saturación o "efecto de gancho" es un fenómeno común en los sistemas de detección que implica la saturación de los componentes reactivos usados para capturar parejas de unión o analitos específicos, generalmente. Sin embargo, el trasfondo matemático es diferente en el caso de los métodos de detección monoccomponentes o bicomponentes.

35 Los sistemas de detección bicomponentes se explotan típicamente en ensayos homogéneos donde se aplican dos componentes para producir señales de detección. Muchos de estos ensayos aplican un concepto de proximidad y es necesario acercar el analito y los componentes para producir una señal. Las tecnologías de ensayo de proximidad tales como FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia), BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia) (Pfleger, Seeber, y Eidne, 2006), par de proteína fluorescente cian (CFP) - proteína fluorescente amarilla (YFP), PCA (ensayos de complementariedad de proteínas) (Morell, Ventura, y Avilés, 2009), Alphascreen (Taouji, Dahan, Bosse, y Chevet, 2009), y métodos de proximidad marcados con ADN (PLA - ensayo de ligadura de proximidad, PEA - ensayo de extensión de proximidad) (Söderberg y otros, 2006), y un ensayo no basado en la proximidad llamado acoplamiento de emulsión son ejemplos representativos de sistemas y métodos de detección bimoleculares (bicomponentes).

45 En los sistemas de detección monoccomponentes, solo se requiere un componente del ensayo, llamado trazador, para producir una señal. Los ensayos de unión de filtración que implican trazadores radiactivos o fluorescentes son buenos ejemplos de sistemas de detección monoccomponentes. Las curvas estándar obtenidas mediante el uso de sistemas de detección monoccomponentes muestran una forma sigmoidea típica que termina en una meseta (también llamada 'gancho' comúnmente) obtenida a concentraciones del trazador de saturación. Estas curvas también se denominan curvas de saturación.

50 Las curvas estándar producidas con sistemas de detección bimoleculares son atípicas. Estas curvas son no biyectivas y se caracterizan por una disminución de la señal ('efecto de gancho') después de una meseta obtenida después de un aumento de la señal dependiente de la concentración inicial. El intervalo de concentraciones de moléculas diana donde la señal comienza a caer se denomina punto de gancho. Por debajo del punto de gancho, los componentes del ensayo se saturan progresivamente por la molécula diana y se mide un aumento de la señal. En el punto de gancho, ambos componentes están saturados con la molécula diana y se detecta una señal máxima. Por encima del punto de gancho, un exceso de moléculas diana sobresatura los componentes, lo que inhibe su asociación y provoca una disminución progresiva de la señal.

60 En la técnica anterior es necesario determinar el punto de gancho de una curva estándar no biyectiva de dos segmentos antes de llevar a cabo una medición de la concentración de un analito para garantizar que todas las mediciones se lleven a cabo en el intervalo de un segmento progresivamente saturado de la curva estándar no biyectiva de dos segmentos. La sobresaturación generalmente se considera un fallo de medición.

65

Un fallo de este requisito puede dar como resultado mediciones falsas ya que los valores determinados no corresponden exclusivamente a una concentración de analito en la curva estándar no biyectiva.

5 Para evitar tales errores, típicamente el intervalo dinámico de la medición se limita al intervalo dinámico del segmento progresivamente saturado de la curva estándar no biyectiva.

En la técnica anterior, se conocen algunos enfoques para abordar el efecto de gancho, en particular en inmunoensayos en sándwich.

10 Wu y otros 2018 analizan la aparición del efecto de gancho en un inmunoensayo tipo sándwich debido a un exceso de anticuerpos de captura y detección y sugieren diluir la muestra para evitar la mala interpretación de los resultados.

15 El documento JP H06 109740 A se refiere a un inmunoensayo de turbidimetría (TIA) para un análisis cuantitativo del componente diana en una muestra mediante el uso de una reacción antígeno-anticuerpo. El documento JP H06 109740 A analiza la aparición de una prozona para un exceso de antígeno en métodos conocidos, que en tales casos repiten la prueba en una dilución de la muestra. Como mejora, el documento JP H06 109740 A sugiere obtener dos o más curvas de calibración para muestras que tienen diferentes concentraciones y decidir cuál curva de calibración es aplicable en base a la desviación de una curva virtual. La descripción del documento JP H06 109740 A, sin embargo, se restringe conceptualmente a prevenir el efecto de prozona para evitar mediciones falsas negativas, sin permitir un intervalo dinámico más amplio del ensayo a partir de relaciones matemáticas definidas.

25 El documento EP 0 576 879 A2 se refiere a métodos para determinar la concentración de un componente en una muestra médica y analiza el efecto de gancho en los esquemas de detección inmunológica en exceso de antígeno, así como también una curva de calibración no monótona, no biyectiva resultante, que se denomina "curva Heidelberg". El documento EP 0 576 879 A2 describe que se conoce en la técnica anterior superar la ambigüedad de la curva de calibración no monótona mediante el uso de dos diluciones de la muestra diferentes. Como mejora adicional el documento EP 0 576 879 A2 sugiere el uso de un algoritmo de aprendizaje y análisis estadístico multivariado para correlacionar un valor de entrada medido con un régimen correcto de una curva de calibración. Sin embargo, el documento EP 0 576 879 A2 se refiere al análisis de la señalización en un ensayo de precipitación y, por lo tanto, no puede extenderse de manera directa a los ensayos bicomponentes, especialmente porque la precipitación es una reacción variable/de múltiples componentes con estequiometría indefinida. Además, mediante el uso del algoritmo de aprendizaje, los resultados pueden variar para diferentes condiciones experimentales, de manera que pueden volverse necesarias diferentes curvas de calibración para cada condición experimental.

35 El documento CN 106 226 516 B se refiere a métodos de detección que implican curvas de calibración hiperbólicas y también analiza estrategias para hacer frente al efecto de gancho. El documento CN 106 226 516 B sugiere realizar reacciones separadas de estándares de diferentes concentraciones de analitos con cantidades iguales de reactivo para ensamblar una curva de calibración en el punto de gancho a partir de una curva de pre-calibración y post-calibración.

40 Binder y otros, 2008, describen algoritmos de calibración para una micromatriz GeneChip que pueden tener en cuenta un efecto de gancho y comprender el coprocesamiento de la diferencia logarítmica y la suma de intensidades de sondas de coincidencia perfecta y no coincidencia.

45 Dada la enseñanza de la técnica anterior, por lo tanto, hay margen de mejora para proporcionar métodos y kits adecuados para determinar la concentración de un analito mediante el uso de ensayos de detección bicomponentes, que pueden ampliar de manera confiable, efectiva y con poco esfuerzo adicional el intervalo dinámico de tales ensayos de detección bicomponentes y proporcionar una relación matemática definida que elimine la necesidad de usar métodos aproximados.

50 En química, bioquímica, tecnologías médicas y farmacología, una constante de disociación (K_d) es un tipo específico de constante de equilibrio que mide la propensión de un complejo mayor a disociarse de manera reversible en componentes más pequeños (Friguet, Chaffotte, Djavadi-Ohanian y Goldberg, 1985). La constante de disociación es el inverso de la constante de asociación. En el caso especial de los métodos de medición bicomponentes, las constantes de disociación son las constantes de disociación entre los dos componentes y el analito. Como los componentes pueden ser anticuerpos, la determinación de las constantes de disociación tiene un amplio interés.

En la técnica anterior se conocen algunos enfoques para determinar las constantes de disociación.

60 Rossant y otros, 2015 y Xiong Y. y otros (2017) describen enfoques para determinar los parámetros de equilibrio (K_d) de complejos de afinidad mediante el uso de ensayos basados en FRET, pero se refieren a complejos binarios.

65 Rey y otros, 2017, exploran el papel de la cooperatividad en el diseño de quimeras dirigidas a la proteólisis (PROTAC) potentes para la degradación de la tirosina cinasa de Brutón (BTK). Rey y otros proponen que maximizar la actividad de PROTAC en BTK se asocia con maximizar el complejo ternario de BTK: PROTAC: CRBN y describen un análisis por TR-FRET de dichos complejos ternarios con miembros de una biblioteca de PROTAC que sirven como analito y

BTK y CRBN como ligandos, que están cada uno marcados con una molécula fluorescente FRET (donante/aceptor). Rey y otros describen además curvas no biyectivas para la formación de complejos ternarios (y señal de FRET resultante) sobre la concentración de un analito, así como también el ajuste numérico para derivar las constantes de disociación (valores de K_D) para la unión de PROTAC con BTK o CRBN.

El documento EP 2 837 937 A1 describe un modelo matemático para los equilibrios de unión en complejos de afinidad ternarios. El documento EP 2 837 937 A1 analiza las características de la formación de complejos ternarios, que incluyen la curva de unión de "forma de campana" o "efecto de gancho". También se describen ecuaciones para las relaciones entre las constantes de disociación de equilibrio y las concentraciones de analito, componentes de unión y/o concentraciones de complejos ternarios.

Si bien Rey y otros, 2017, y el documento EP 2 837 937 A1 abordan una estimación de los parámetros de equilibrio en la formación de complejos ternarios y mencionan la aparición de un efecto de gancho, no proporcionan una solución para tener en cuenta adecuadamente estos efectos.

El documento EP 1 460 414 A1 se refiere a un ensayo FRET resuelto en el tiempo homogéneo para la identificación de anticuerpos líderes potenciales en procesos de descubrimiento de fármacos. El documento EP 1 460 414A1 describe ejemplos para usar el ensayo HFRET para analizar las interacciones proteína-proteína. Como desventaja de los ensayos de unión directa el documento EP 1 460 414 A1 describe que el cribado de muestras no diluidas puede aumentar el número de falsos negativos como resultado del efecto de "gancho". Se propone realizar el cribado a múltiples diluciones de muestra para limitar el efecto, pero puede afectar el tiempo y los costos.

Zorba y otros describen los principios del ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado (AlphaLISA) que se modificó de un ensayo de competencia de unión para detectar las interacciones entre el dominio de activación de la transcripción p53 y sus ligandos. Zorba y otros analizan la aparición del efecto de gancho en concentraciones excesivas y proponen una valoración adecuada para evitarlo.

Douglass y otros, 2013, analizan diferentes ensayos para monitorear la interacción proteína-proteína e identificar moléculas pequeñas como inhibidores, que incluyen AlphaScreen o AlphaLISA. Douglass y otros también analizan el efecto de gancho y sugieren valoraciones para elegir una concentración de proteína evitando el punto de gancho para el ensayo.

Además, los métodos para determinar las constantes de disociación de los métodos de detección bicomponentes en la técnica anterior son elaborados y costosos, sin embargo, especialmente de manera paralela, están seriamente limitados. Los métodos usados más frecuentemente, como ELISA de desplazamiento, método de polarización de fluorescencia y resonancia de plasmones de superficie, necesitan la paralelización de mediciones independientes. Por lo tanto, existe la necesidad de un método simplificado y paralelo a nivel de reacción, pero robusto.

Descripción de la invención

A la luz de la técnica anterior, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios alternativos y/o mejorados para determinar la concentración de un analito mediante el uso de un método de detección bicomponente.

En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un método o kit de medición de un intervalo extendido de concentración de un analito mediante el uso de métodos de detección bicomponentes.

Un objeto de la presente invención es también proporcionar un método y un kit de medición de la concentración de un analito mediante el uso de métodos de medición de detección bicomponentes compartimentados y usos de estos.

En particular, un propósito de la invención es proporcionar un método de medición de la concentración de un analito con un intervalo dinámico extendido cuantificado absoluto y la detección paralela en métodos de detección bicomponentes compartimentados y usos de estos.

Este objeto se resuelve mediante los elementos de las reivindicaciones independientes. Las modalidades preferidas de la presente invención se proporcionan por las reivindicaciones dependientes.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para determinar la concentración de un analito, preferentemente en una muestra con una concentración desconocida de analito, mediante el uso de un método de detección bicomponente que comprende:

- a. proporcionar dos componentes de unión específica al analito a concentraciones conocidas para realizar un método de detección bicomponente en una solución, que comprende poner dichos dos componentes de unión específica al analito en contacto con dicho analito para producir una señal que depende de la concentración de complejos bicomponente/analito formados en dicha solución

b. proporcionar una curva de referencia de concentración del analito para dicho método de detección bicomponente que es una función matemática que refleja la dependencia de dicha señal de la concentración del analito, en donde la curva de referencia de concentración del analito no es una función biyectiva y preferentemente presenta un segmento monótono creciente y uno decreciente

- 5
- c. preparar una o más diluciones de dicha muestra mediante el uso de factores de dilución definidos,
- d. aplicar el método de detección bicomponente a la muestra y las una o más diluciones
- 10 e. determinar la concentración del analito en la muestra mediante el uso de dicha señal detectada en la muestra y en las una o más diluciones como una entrada de restricción para un ajuste matemático para dicha curva de referencia de concentración del analito no biyectiva a diferentes concentraciones del analito.

15 En algunas modalidades, el método abarca después de aplicar el método de detección bicomponente una etapa de comparación de las señales detectadas en la muestra y en las una o más diluciones con la curva de referencia de concentración del analito, para determinar qué punto de la curva de referencia de concentración del analito es aplicable para la concentración del analito en la muestra, en donde se tienen en cuenta los factores de dilución definidos. En algunas modalidades, la determinación de la concentración del analito en la muestra comprende comparar la señal que refleja la formación de complejos bicomponente/analito en la muestra con el punto aplicable de la curva de

20 referencia de concentración del analito.

25 Preferentemente, los dos componentes de unión específica al analito, así como también el analito, no están inmovilizados y están en solución, de manera que los complejos bicomponente/analito se forman igualmente en solución. En algunas modalidades, el método comprende una etapa de proporcionar una muestra con una concentración desconocida de analito. En algunas modalidades, el método es un método *in vitro*, en donde preferentemente una etapa de proporcionar una muestra no comprende un tratamiento quirúrgico o invasivo de un cuerpo humano o animal vivo.

30 El método de la invención permite determinar una concentración desconocida de un analito conocido mediante el uso de métodos de detección bicomponentes no compartimentados o compartimentados con un intervalo dinámico extendido.

35 Como se analizó anteriormente, las curvas de referencia para los métodos de detección bicomponentes saturables son funciones no biyectivas con dos segmentos separados por el llamado punto de gancho. Función biyectiva significa que es posible una correspondencia uno a uno. En términos matemáticos, una función biyectiva, es una función entre los elementos de dos conjuntos, donde cada elemento de un conjunto se empareja con exactamente un elemento del otro conjunto, y viceversa. Para las curvas de referencia o curvas estándar de métodos de detección bicomponentes saturables, este no es el caso. La misma señal que refleja la formación de la concentración de complejos bicomponentes/analito puede dar como resultado al menos dos concentraciones de analito diferentes. Por lo tanto, la

40 misma señal detectable producida por la formación de complejos bicomponente/analito puede provenir de dos concentraciones de analito reales diferentes.

45 Para evitar ambigüedades, existen enfoques en la técnica anterior para estimar el punto de gancho de la curva de referencia no biyectiva de dos segmentos antes de llevar a cabo una medición de la concentración de un analito. Subsecuentemente, las mediciones se llevan a cabo típicamente solo en el intervalo de uno de los segmentos, lo que limita considerablemente el intervalo dinámico.

50 Mediante el uso del presente método, se eliminan tales limitaciones. En cambio, el método prepara una o más diluciones de la muestra con factores de dilución conocidos, y aplica el método de detección bicomponente a la muestra, así como también a las una o más diluciones. La aplicación del método de detección bicomponente significa preferentemente que los dos componentes de unión específica al analito a concentraciones conocidas se ponen en contacto con la muestra y una o más diluciones para producir una señal que depende de la concentración de complejos analito/bicomponente formados en dicha solución.

55 Como se detalla en la presente descripción, la señal puede tomar una variedad de formas y depende del sistema y el método de detección bicomponente usados. Por ejemplo, en el caso de ensayos de proximidad tales como un ensayo FRET, la señal puede referirse a una señal de fluorescencia de un par de donante-aceptor FRET que indica la formación de complejos bicomponente/analito. En caso de un método bicomponente compartimentado tal como el acoplamiento de emulsión, la señal también puede referirse a señales resultantes de un ddPCR mediante el uso de

60 productos de PCR etiquetados con fluorescencia o secuenciación de NGS que indican la presencia de un complejo bicomponente/analito en base a una desviación de la distribución de Poisson esperada en las gotitas compartimentadas.

65 Dado que la señal que refleja la formación de complejos bicomponente/analito se adquiere para la muestra, así como también para una o más diluciones, las señales y factores de dilución pueden usarse para determinar qué punto de la curva de referencia de concentración del analito es aplicable para la concentración del analito en la muestra. Para este

fin, se realiza una comparación de las señales que provienen de la muestra, así como también de una o más diluciones, con la curva de referencia.

5 Como se muestra en la Figura 1, la curva de referencia para un método de detección bicomponente presentará típicamente una curva de forma de campana con un segmento monótono creciente para concentraciones de analito más bajas y un segmento monótono decreciente para concentraciones de analito más altas (régimen de saturación). El aumento y la disminución se relacionan con una alternancia de la señal en dependencia de la concentración del analito.

10 Pueden preverse diferentes escenarios para las señales detectadas en la muestra y las diluciones. Por ejemplo, la señal que proviene de la muestra puede ser mayor que una señal que proviene de una dilución (que tiene una concentración de analito más baja). A partir de esta información, puede deducirse que ambas señales provienen del segmento monótono creciente o que la señal de la muestra proviene del segmento monótono decreciente y la señal de la dilución proviene del segmento monótono creciente. La diferencia entre los dos escenarios puede determinarse mediante el ajuste del factor de dilución entre la muestra y la dilución (ver Ejemplo 3).

15 Se señala que, en base a los factores de dilución, se conocen las relaciones de concentración esperadas entre las concentraciones del analito de la muestra y una o más diluciones. En la curva representada de la Figura 1, esto corresponde a una distancia del eje horizontal.

20 Ventajosamente, un ajuste matemático para dos señales de una diferencia/relación de concentración de analito conocida dará como resultado fielmente un posicionamiento óptimo de las señales en la curva de referencia no biyectiva, de manera que pueda determinarse la concentración aplicable. En otras palabras, diluir la muestra para detectar múltiples señales con factores de dilución conocidos proporciona restricciones adicionales para un ajuste matemático de los datos adquiridos, lo que permite deducir de manera sólida el valor de concentración aplicable y correspondiente de una señal que proviene de la muestra.

25 Se señala que pueden determinarse señales adicionales que provienen de una o más diluciones y la información puede usarse para mejorar la precisión de la medición de la concentración del analito.

30 La determinación de la relación señal-concentración matemática no biyectiva de un método de dos componentes, es decir, la curva de referencia o estándar, y mediante el uso de diluciones definidas del analito, es posible restringir la medición para evitar fallos de una determinación del punto de gancho de la curva estándar no biyectiva de dos segmentos. En un caso típico, el intervalo dinámico de la señal de los métodos bicomponentes puede usarse de este modo en ambos segmentos de la curva de referencia no biyectiva. Dado que, para los métodos de la técnica anterior, es importante dejar una distancia considerable desde el punto de gancho, esto conduce efectivamente a más del doble del intervalo dinámico.

35 Si bien la técnica anterior sugiere en cierta medida un concepto de dilución para evitar una ambigüedad asociada con el efecto de gancho, el método descrito en la presente descripción permite preferentemente determinar la concentración considerando el requisito de cálculo de la curva no biyectiva, para lo cual preferentemente son necesarias dos entradas independientes para un ajuste matemático. En otras palabras, más allá de un concepto de dilución en sentido amplio general, la invención proporciona preferentemente una comprensión matemática, que conduce a ventajas adicionales significativas. En particular, preferentemente, toda la curva de referencia de concentración del analito no biyectiva puede usarse como curva de calibración para determinar la concentración de un analito. Si bien un concepto de dilución generalmente se limita a encontrar empíricamente diluciones, que permiten una medición que evita una ambigüedad, no consideran toda la curva no biyectiva como una curva de calibración. En cambio, los métodos descritos en la presente descripción pueden proporcionar preferentemente parámetros esenciales para calcular una curva no biyectiva y considerar toda la curva no biyectiva como curva de calibración, para determinar la concentración de un analito mediante el uso de reacciones de detección bicomponentes.

40 En una modalidad, la curva de referencia se obtiene experimentalmente al proporcionar una muestra de referencia de concentración de analito conocida, generar una serie de diluciones conocidas de dicha muestra de referencia y realizar para la muestra de referencia y cada dilución conocida de la misma dicho método de detección bicomponente.

45 Ventajosamente, la curva de referencia para un método de detección bicomponente dado tiene que determinarse experimentalmente solo una vez. Para ello, se proporciona un sistema de detección bicomponente con componentes con una afinidad definida por el analito a una concentración dada, así como también una muestra de referencia de concentración de analito conocida. Para la muestra de referencia, se genera una serie de diluciones y en cada una de las diluciones se aplica el método de detección bicomponente, lo que genera por tanto una serie de señales que reflejan la formación de un complejo bicomponente/analito para una concentración de analito dada. Dicha dependencia obtenida experimentalmente de la señal que refleja la formación de un complejo bicomponente/analito en la concentración de analito puede interpolarse para formar una curva de referencia o estándar para su uso como se describe en la presente descripción.

50

Sin embargo, también es posible proporcionar la curva de referencia mediante métodos analíticos o simulaciones numéricas.

5 En una modalidad, la curva de referencia de concentración del analito se calcula analíticamente mediante la solución de ecuaciones de equilibrio químico y conservación de la masa o se proporciona mediante soluciones numéricas basadas en proporcionar constantes de disociación para cada uno de los dos componentes de unión específica al analito con el analito.

10 En el Ejemplo 1 se proporciona una demostración de proporcionar una curva de referencia basada en métodos analíticos o simulaciones numéricas.

15 Generalmente, los métodos analíticos y numéricos para proporcionar la curva de referencia requerirán algunos parámetros adicionales que definan el método de detección bicomponente en relación con el analito. En particular, para proporcionar numéricamente una curva de referencia, tienen que estimarse las constantes de disociación para cada uno de los dos componentes de unión específica al analito con el analito. Como se detalla en los ejemplos más abajo, esencialmente con esta información se puede proporcionar una curva de referencia para la señal que refleja la formación de complejos bicomponentes/analito de manera eficiente y robusta.

20 En una modalidad, el método puede usarse para determinar la concentración de un analito mediante el uso de métodos de detección bicomponentes compartimentados y se refiere a una mayor magnitud del intervalo de medición mediante el uso de métodos de detección bicomponentes compartimentados y usos de estos. Los métodos de detección bicomponentes compartimentados se prefieren en gran medida, ya que permiten determinar la concentración absoluta del analito.

25 El método compartimentado atípico es el método de PCR digital (ddPCR) (Quan, Souza y Brouzes, 2018) que utiliza un sistema de gotitas de emulsión de agua-aceite. Las gotitas se forman en una emulsión de agua-aceite para formar particiones (compartimientos) que separan las moléculas de ADN plantilla. Las gotitas cumplen esencialmente la misma función que los tubos de ensayo individuales o los pocillos de una placa en la que tiene lugar la reacción de PCR. La partición masiva de la muestra es un aspecto clave de la técnica ddPCR.

30 La tecnología ddPCR es digital, en lo que respecta a que las gotitas admiten la amplificación por PCR de las moléculas plantilla que contienen y generan señales en base a las moléculas de ADN plantilla individuales. Después de la PCR, cada gotita se analiza o lee para determinar la fracción de gotitas positivas a la PCR en la muestra original. Estos datos se analizan después mediante el uso de estadísticas de Poisson para determinar la concentración absoluta de ADN plantilla en la muestra original.

35 En otra modalidad, el método puede usarse para aplicar el principio de cuantificación absoluta (Quan y otros, 2018) a los métodos de medición bicomponentes. La señal del analito se basa en la detección de las moléculas individuales de los complejos de analito-bicomponente compartimentados y la estadística de Poisson, en donde los complejos de analito-bicomponente se determinan mediante los balances químicos en base a la concentración de las moléculas y sus propiedades analíticas, específicamente las constantes de disociación.

40 En esta modalidad, la creación de decenas, miles o millones (o incluso un número mayor) de gotitas y su aplicación para el método de detección bicompetente significa que una única medición de muestra que tiene el número de gotitas como el intervalo dinámico primario del método bicomponente, de una manera cuantitativa absoluta, altamente lineal, en lugar de usar una única señal inherentemente no lineal como en el caso de las mediciones no compartimentadas obtenidas. De esta manera, se incorporan la cuantitatividad absoluta y los elementos estadísticos inherentes a los métodos compartimentados en la detección de la concentración de analitos mediante el uso de métodos bicompetentes. Estos enfoques de compartimentalización pueden combinarse con los métodos descritos en la presente descripción para proporcionar un intervalo extendido de una curva de referencia de dos segmentos no biyectiva de métodos de medición bicomponentes y duplicar efectivamente el intervalo dinámico disponible de las mediciones.

45 En algunas modalidades, estos métodos se prefieren para mediciones de múltiples analitos ya que generalmente tienen grandes diferencias de concentración. En tales modalidades, se puede medir el número de copias de ADN (baja abundancia) y el número de copias de ARN/proteína (alta abundancia) en la misma muestra mediante el uso de un método bicomponente compartimentado adecuado tal como el acoplamiento de emulsión (ver ejemplos más abajo y el documento EP 3224360).

50 El número de compartimentos no tiene límites superiores, con respecto al principio de generación de señales, si se aplica un método de generación de señales digital lineal. Debido al amplio intervalo de medición mediante el uso del método descrito en la presente descripción, un intervalo dinámico de señal duplicado está disponible para la medición, al tiempo que se mantiene la sensibilidad y la precisión que son las características distintivas de los métodos bicomponentes compartimentados.

65

Por lo tanto, los métodos bicomponentes compartimentados en combinación con el método descrito en la presente descripción proporcionan una precisión inigualable, ya que la partición masiva de la muestra permite la medición confiable de diferencias en veces pequeñas en los analitos diana. Esto conduce a un aumento de la relación señal-ruido, ya que la plantilla dominante en una muestra no obstaculiza la detección de dianas raras. Los métodos bicomponentes compartimentados proporcionan tasas de error de caída de la señal más bajas adicionales, ya que la alta dilución inherente de los métodos elimina sustancias que pueden interferir con la generación efectiva de la señal.

De acuerdo con la invención, los métodos mencionados anteriormente también son adecuados para determinar las constantes de disociación de los complejos bicomponente/analito.

En otra modalidad de los métodos descritos en la presente descripción, se prefiere usar tecnologías de lectura paralela. La secuenciación del ADN de próxima generación se prefiere en algunas modalidades como una tecnología de lectura bicomponente. Particularmente, esos métodos bicomponentes son adecuados para la lectura basada en la secuenciación del ADN, que generan señales de ADN únicas como parte de los principios de detección. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, ligadura de proximidad, ensayo de extensión y acoplamiento de emulsión.

En otra modalidad, se prefieren los métodos de medición bicomponentes basados en la lectura de secuencias del ADN, si los métodos bicomponentes son un método bicomponente compartimentado. En condiciones compartimentadas, la generación de señales de ADN únicas no está sesgada, en comparación con las mediciones no compartimentadas.

En otro aspecto de la generación compartimentada de señales de ADN, se refiere a señales de ADN no sesgadas que se habilitan mediante el uso de lectura de señales de identificadores moleculares únicos (UMI) (Parekh, Ziegenhain, Vieth, Enard, y Hellmann, 2017).

Se han desarrollado varios métodos para mejorar la precisión de la cuantificación de diferentes polinucleótidos en una muestra mediante el uso de tecnologías de secuenciación de próxima generación, que incluyen métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR), descrita en la patente de Estados Unidos núm. 5,213,961 y secuenciación de código de barras profunda mediante el uso de identificadores moleculares únicos (UMI), como se describe en (Smith y otros, 2009).

Los identificadores moleculares únicos, o códigos de barras moleculares, proporcionan una ventaja en la cuantificación de señales de ADN únicas de los métodos de medición bicomponentes en una muestra. Sin embargo, si los UMI se implican en más de la primera ronda de detección, el mismo UMI puede introducirse en diferentes dianas, lo que da como resultado errores de conteo. Además, el método de UMI original se basa en una situación ideal, pero poco realista, es decir, donde tanto la PCR como las tecnologías de secuenciación son perfectas y no se introducen errores. La estrategia de UMI opera bajo el supuesto de que tanto las etapas de PCR como de secuenciación informan las dianas subyacentes y fragmentos de UMI libres de errores. Estas condiciones son difíciles de proporcionar en condiciones no compartimentadas, pero se proporcionan sin problemas en condiciones compartimentadas. Los componentes marcados con UMI son moléculas únicas o pocas por compartimiento en un método de medición bicomponente compartimentado, lo que significa la incorporación efectiva de los códigos de barras UMI en las señales de ADN únicas.

En otro aspecto, los identificadores moleculares únicos (UMI) que representan señales de ADN únicas pueden incorporarse en señales de ADN únicas y amplificarse además en un método bicomponente compartimentado. Sin embargo, sin el uso de los identificadores moleculares únicos, la cuantificación de la señal de ADN única está sesgada. La amplificación puede ser específica para ciertas señales de ADN únicas; para equilibrar su relación con respecto a otras señales de ADN únicas no amplificadas adicionalmente.

En otro aspecto, los identificadores moleculares únicos incorporados en señales de ADN únicas pueden usarse para detectar analitos con dos o más sitios de unión idénticos o analitos con más de dos sitios de unión no idénticos. Estos arreglos son particularmente preferidos para detectar analitos en interacción, como proteínas u otras moléculas.

En otro aspecto, los métodos y kits de métodos de medición bicomponentes mediante el uso de tecnologías de lectura paralela, pueden medir tanto la concentración de analito como las constantes de disociación de los componentes de manera paralela. Hoy en día, las tecnologías de secuenciación de próxima generación pueden proporcionar miles de millones de lecturas independientes, que son directamente proporcionales al paralelismo alcanzable de la lectura.

En una modalidad adicional, el analito se selecciona de un grupo que consiste de proteínas, péptidos, segmentos de ácido nucleico, carbohidratos, lípidos, anticuerpos (monoclonales o policlonales), antígenos, oligonucleótidos, proteínas receptoras específicas, ligandos, moléculas, células, microorganismos, así como también productos fragmentados o combinaciones de estos.

En una modalidad, los dos componentes de unión específicos del analito se seleccionan de un grupo que consiste de ácidos nucleicos, preferentemente oligonucleótidos de ARN y/o ADN, anticuerpos, péptidos, proteínas, aptámeros, polímeros impresos molecularmente, células o combinaciones de estos.

En una modalidad, la muestra comprende dos o más tipos diferentes de analitos.

En una modalidad, se usan dos o más pares de componentes de unión específica al analito de diferentes tipos.

5 Una ventaja particular de los métodos descritos en la presente descripción es que incluso es posible tener más de un tipo de analito (por ejemplo, ADN; ARN; proteína, proteínas que interactúan y sus modificaciones químicas) y de manera similar más de un tipo de componente de unión en el mismo ensayo.

10 Mediante el uso de enfoques paralelos como se describe en la presente descripción, la concentración del analito para diferentes tipos de analitos puede determinarse en paralelo, así como también las constantes de disociación para diferentes tipos de componentes de unión específica al analito.

15 En una modalidad, el método bicomponente comprende emplear un ensayo basado en proximidad para producir la señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito, en donde el ensayo basado en proximidad usa dos componentes de unión específica al analito que producen una señal detectable en dependencia de su proximidad.

20 En una modalidad, el método bicomponente comprende emplear un ensayo de transferencia de energía de resonancia, preferentemente un ensayo de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) o un ensayo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), un ensayo de complementación de proteínas (PCA), Alphascreen o un ensayo de proximidad marcado con ADN, preferentemente un ensayo de ligadura de proximidad (PLA) o un ensayo de extensión por proximidad (PEA).

25 En una modalidad, el método de detección bicomponente comprende emplear un ensayo compartimentado para producir una señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito, en donde la señal refleja la presencia de dichos dos componentes de unión específica al analito en un solo compartimiento.

30 En una modalidad, el ensayo compartimentado emplea un método de gotitas en emulsión, en donde cada gotita en la emulsión representa un compartimiento separado.

35 En una modalidad, el ensayo compartimentado es el acoplamiento de emulsión. Como se describe en detalle más abajo, el acoplamiento de emulsión se refiere a un concepto de ensayo digital basado en la detección de complejos moleculares ternarios individuales doblemente marcados (bicomponentes) en emulsión, que pueden identificarse, por ejemplo, mediante PCR digital en gotitas (ddPCR) mediante el uso de productos de PCR etiquetados con fluorescencia o secuenciación de próxima generación (NGS).

Ventajosamente, tal enfoque permite una cuantificación absoluta de la concentración del analito, así como también una determinación paralela de la concentración de múltiples analitos de una manera robusta y eficiente.

40 En una modalidad, el método de detección bicomponente comprende emplear un método analítico basado en el recuento molecular absoluto. Tal método analítico basado en el recuento molecular absoluto se refiere preferentemente a la aplicación de métodos de detección digital, tales como una PCR digital o secuenciación de próxima generación.

45 En una modalidad, el método de detección bicomponente comprende emplear un ensayo de PCR digital en gotitas.

50 En una modalidad, el método de detección bicomponente comprende el uso de componentes de unión específica al analito asociados con marcadores de ácido nucleico amplificables únicos y emplea un ensayo compartimentado, en donde se realiza una amplificación de ácido nucleico para cada compartimiento mediante el uso de productos de amplificación etiquetados con fluorescencia.

En modalidades preferidas, la amplificación de ácido nucleico es una PCR y los productos de amplificación etiquetados con fluorescencia son productos de PCR etiquetados con fluorescencia.

55 Los componentes de unión específica al analito (tales como un par de anticuerpos) pueden marcarse preferentemente mediante marcadores de ADN amplificables por PCR únicos, es decir, los dos componentes de unión específica al analito, por ejemplo, dos anticuerpos, pueden marcarse preferentemente con un ADN de una sola hebra que identifica de manera única el componente de unión (por ejemplo, anticuerpo). Los componentes de unión marcados (por ejemplo, anticuerpos) se añaden a la muestra o a las una o más diluciones para permitir la formación de complejos bicomponente/anticuerpo.

60

Subsecuentemente, la reacción se diluye preferentemente en gran medida, por ejemplo, mediante un factor de dilución de más de 20 000, preferentemente más de 50 000, 100 000 para lograr la separación de un solo complejo en una compartimentalización, por ejemplo, mediante emulsión en gotitas.

65

Para la amplificación del ácido nucleico, se usan productos de amplificación etiquetados con fluorescencia que reconocen el componente de unión (por ejemplo, anticuerpo) de marcadores de ácido nucleico amplificables únicos específicos. Por ejemplo, pueden usarse productos de PCR etiquetados con fluorescencia, por ejemplo, mediante el uso de sondas de PCR en tiempo real marcadas con FAM o VIC que son complementarias al ADN de una sola hebra que identifican de manera única el componente de unión.

La amplificación del ácido nucleico se realiza en cada uno de los compartimientos, por ejemplo, las gotitas de emulsión y una lectura de la señal se puede realizar mediante la detección de la fluorescencia única de los compartimientos, por ejemplo, el 'color' de las gotitas.

Preferentemente, se emplea ddPCR y de acuerdo con una evaluación estándar de ddPCR, los grupos de gotitas pueden determinarse de acuerdo con las señales fluorescentes de las gotitas. En la presente descripción, el número de componentes de unión marcados (por ejemplo, anticuerpos) se determina en cada reacción (contando todas las gotitas positivas para un marcador dado, y mediante el uso de la misma definición de conglomerado de gotitas para todas las reacciones). Adicionalmente, también se determina el número de componentes de unión doblemente coloreados (que tienen dos marcadores de componentes de unión diferentes).

Sin la formación de complejos ternarios bicomponente/analito, la partición de los anticuerpos marcados sigue la distribución de Poisson, y da como resultado un número calculable de gotitas doblemente coloreadas (que tienen dos componentes de unión en un compartimiento en base a la pura casualidad). En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de las gotitas doblemente coloreadas detectadas (que tienen complejos ternarios adicionales) es mayor de lo que se esperaría solo por la distribución de Poisson. Sobre la base de dicho análisis, el número de complejos ternarios puede calcularse de esta manera. Ventajosamente, la modalidad permite una cuantificación absoluta de los complejos de analito ternarios formados.

En una modalidad del método descrito en la presente descripción, se determinan múltiples analitos en paralelo.

En una modalidad, el método de detección bicomponente comprende el uso de múltiples componentes de unión específica al analito que comprenden códigos de barras de ácido nucleico y emplea un ensayo compartimentado, en donde se realiza una amplificación de ácido nucleico para cada compartimiento que produce códigos de barras de ácido nucleico unidos, los compartimientos se reúnen en un grupo común y se usa una técnica de secuenciación de ácido nucleico paralela para producir la señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito.

Una técnica de secuenciación de ácido nucleico paralela preferida usada en la presente descripción es una técnica de secuenciación de próxima generación.

En modalidades preferidas, los componentes de unión que comprenden códigos de barras de ácido nucleico se refieren a anticuerpos marcados con marcadores de ADN amplificables por PCR únicos, que comprenden un marcador único para el tipo de anticuerpo denominado y también un marcador para la molécula individual (identificador molecular único - UMI) (ver también Parekh y otros, 2017). Los anticuerpos así marcados se añaden a la muestra para permitir la formación de complejos bicomponente/anticuerpo.

La realización de la amplificación del ácido nucleico para cada compartimiento para producir códigos de barras de ácido nucleico unidos puede lograrse mediante la dilución elevada de la muestra antes de la amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, con un factor de dilución de más de 20 000, preferentemente más de 50 000, con mayor preferencia más de 100 000. En modalidades preferidas, la amplificación del ácido nucleico es PCR. Los reactivos de PCR pueden añadirse para lograr la separación de un solo complejo y la amplificación de ácido nucleico por gotita de emulsión de agua en aceite. Para este fin, los protocolos estándar de PCR digital en gotitas pueden ser particularmente adecuados.

Posteriormente, los compartimientos, por ejemplo, las gotitas de emulsión, pueden recombinarse en un grupo común y puede usarse una técnica de secuenciación de ácido nucleico paralela para evaluar los marcadores de UMI diméricos específicos de anticuerpos. En la presente descripción, el número de anticuerpos marcados puede determinarse en cada reacción mediante el recuento de todos los marcadores UMI únicos para un anticuerpo dado (el recuento se limita a un anticuerpo dado - por ejemplo, en un contexto de marcador dado). Un posible marcaje múltiple del mismo anticuerpo puede eliminarse mediante el uso de sus secuencias preferentemente diméricas, ya que múltiples marcajes por anticuerpo exhiben dímeros de doble marcador UMI con un contexto de marcador específico de anticuerpo dado, ya que se colocan en la misma gotita.

Los complejos bicomponente/anticuerpos ternarios pueden contarse sobre la base de sus productos de PCR marcados con UMI dobles diméricos en dos marcadores específicos de anticuerpos diferentes, denominados heterodímeros) con una corrección de acuerdo con los múltiples marcadores de anticuerpos.

Sin la formación de complejos ternarios, la partición de los anticuerpos marcados sigue una distribución de Poisson, y da como resultado un número calculable de complejos ternarios (basado en la detección de heterodímeros) en las gotitas. En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de heterodímeros detectados es mayor

de lo que se esperaría por la distribución de Poisson pura. En base a esta medición, puede calcularse el número de complejos.

5 En un método bicomponente compartimentado, es ventajoso incorporar UMI en diferentes dianas como una etapa de codificación para la colocación de señales de ADN únicas.

10 En una modalidad preferida, la invención se refiere a un kit, preferentemente para llevar a cabo el método para determinar la concentración de un analito mediante el uso de un método de detección bicomponente como se describe en la presente descripción, que comprende:

15 a. dos componentes de unión específica al analito a concentraciones conocidas para realizar un método de detección de dos componentes que comprende poner dichos dos componentes de unión específica al analito en contacto con dicho analito para producir una señal que depende de la concentración de complejos bicomponente/analito formados en dicha solución

20 b. una curva de referencia de concentración del analito para dicho método de detección bicomponente, que es una función matemática que refleja la dependencia de dicha señal de la concentración del analito, en donde la curva de referencia de concentración del analito es una función no biyectiva y presenta un segmento monótono creciente y uno decreciente

25 c. opcionalmente instrucciones para preparar una o más diluciones de dicha muestra y aplicar el método de detección bicomponente a la muestra y las una o más diluciones

30 d. un programa de computadora cuando se ejecuta en un ordenador configurado para realizar las etapas computacionales de comparación de señales detectadas en la muestra y en una o más diluciones con la concentración del analito curva de referencia no biyectiva para determinar la concentración del analito en la muestra

35 Los elementos técnicos que se han descrito para los métodos descritos en la presente descripción también se aplican a los kits para su uso en tales métodos. Por lo tanto, un experto en la técnica reconocerá que los elementos preferidos de los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse ventajosamente también en el contexto de los kits.

40 El método de la presente invención, en algunas modalidades, también puede referirse a un producto de programa de computadora, tal como un producto de software.

45 El software puede configurarse para su ejecución en dispositivos informáticos comunes y se configura para llevar a cabo una o más de las etapas del método descrito en la presente descripción.

50 En una modalidad, el programa de computadora puede configurarse para llevar a cabo la etapa e) de acuerdo con la reivindicación 1 que es comparar las señales detectadas en la muestra y en una o más diluciones con la curva de referencia de concentración del analito para determinar la concentración del analito en la muestra o modalidades preferidas adicionales de las etapas computacionales como se describe en la presente descripción.

55 En una modalidad, una curva de referencia de concentración para el método de detección bicomponente puede proporcionarse en forma de datos de referencia.

60 En la presente descripción, los datos de referencia para una curva de referencia de concentración para un método de detección bicomponente se relacionarán preferentemente con cualquier dato que permita proporcionar una función matemática que refleje la dependencia de la señal que refleja la formación de complejos bicomponente/analito formados en dicha solución en la concentración de analito.

65 Típicamente, los datos de referencia pueden almacenarse en un medio legible por ordenador o utilizable por ordenador en la unidad de control. Cualquier formato puede ser adecuado que se use en la industria. Los datos de referencia pueden almacenarse en un archivo separado y/o integrarse en el código informático o software (por ejemplo, en el código fuente) para realizar las etapas computacionales para determinar la concentración del analito en la muestra, como se describió anteriormente.

El producto o kit de programa de computadora que comprende el programa de computadora de la presente invención, por lo tanto, también abarca y se relaciona directamente con los elementos como se describen para el método proporcionado en la presente descripción. Se proporcionan más detalles sobre los enfoques basados en ordenador preferidos en los ejemplos y referencias relevantes como se describe en la presente descripción.

Descripción detallada de la invención

65

Antes de describir la presente invención con respecto a los ejemplos, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solo para el propósito de describir modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

5 El término "muestra" o "solución de muestra" como se usa en la presente se refiere a una solución que comprende analitos, preferentemente de una concentración desconocida. Los ejemplos de muestras incluyen fluidos biológicos tales como suero, plasma, orina, lágrimas, células, mezclas de células, sobrenadantes de cultivos celulares, o lisados de células que contienen una o más moléculas diana biológicas. Además, las muestras pueden comprender además cualquier reactivo de acondicionamiento (por ejemplo, reactivos permeabilizantes) necesarios para hacer que los
10 analitos sean solubles y accesibles para la detección y cuantificación. Tales reactivos de acondicionamiento pueden añadirse a la muestra en cualquier momento antes o después de realizar los métodos descritos en la presente descripción.

15 El término "analito" se refiere a una sustancia que se va a detectar, cuantificar o analizar de cualquier otra manera mediante el método de la presente invención. Los analitos típicos pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, segmentos de ácido nucleico, carbohidratos, lípidos, anticuerpos (monoclonales o policlonales), antígenos, oligonucleótidos, proteínas receptoras específicas, ligandos, moléculas, células, microorganismos, fragmentos, productos y sus combinaciones, o cualquier sustancia para la cual pueden desarrollarse sitios de unión, miembros de unión o receptores (tales como anticuerpos). Los analitos también pueden referirse a complejos de dichas entidades.
20 Por ejemplo, un analito puede referirse a un agregado o complejo formado por múltiples entidades o moléculas, por ejemplo, un complejo proteína-proteína, en donde la interacción de las entidades/moléculas es de interés.

25 Por "proteína", se entiende una secuencia de aminoácidos para la cual la longitud de la cadena es suficiente para producir los niveles más altos de estructura terciaria y/o cuaternaria. Los "péptidos" se refieren preferentemente a proteínas de menor peso molecular.

30 El término "ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, que incluye, sin limitación, ADN, ARN e híbridos o variantes modificadas y polímeros ("polinucleótidos") de estos en forma de cadena simple o doble. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otra forma, una molécula de ácido nucleico/polinucleótido particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de estos (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como también la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse mediante la
35 generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer y otros, Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y otros, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y otros, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). Los nucleótidos se indican por sus bases mediante las siguientes abreviaturas estándar: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G).

40 Como se usa en la presente, el término "amplificación del ácido nucleico" se refiere a un proceso mediante el cual una cantidad limitada de ácido nucleico se somete a una reacción bioquímica en la que se genera una cantidad mayor de ácido nucleico. Por lo tanto, la amplificación de ácido nucleico se refiere a la generación de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico y generalmente se lleva a cabo mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o reacción en cadena de ligasa (LCR) u otras tecnologías bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.).

45 Como se usa en la presente, el término "método de detección bicomponente" o "método de detección bimolecular" se refiere a un método que usa dos componentes de unión específica al analito y determina una señal que refleja la formación de complejos de bicomponente/analito, cuando dichos dos componentes de unión específica al analito se ponen en contacto con una solución que contiene el analito. El término "sistema de detección bicomponente" o "sistema de detección bimolecular", se refiere preferentemente a los componentes o reactivos necesarios para llevar a cabo un método de detección bicomponente. Esto abarca preferentemente dos componentes de unión específica al analito, proporcionados preferentemente en una solución única o separada a una concentración conocida, así como
50 también una solución de muestra opcional que contiene el analito a analizar.

55 Preferentemente, los dos componentes de unión específica al analito, así como también el analito, se proporcionan no inmovilizados, es decir, en solución, de manera que los complejos bicomponente/analito se forman igualmente en solución. El término método de detección bicomponente como se usa en la presente, por lo tanto, preferentemente aborda una formación de fase líquida de complejos ternarios y es distinto de los inmunoensayos de tipo sándwich comunes que implican como una fase sólida agentes de unión de captura (primarios) inmovilizados, así como también agentes de unión de detección (secundarios).

60 El término "no inmovilizado" se refiere por tanto preferentemente a los componentes, tales como los componentes de unión específica al analito, que pueden difundirse libremente dentro de una solución (líquida), de manera que la cinética de unión al analito, que se difunde igualmente libremente en dicha solución líquida, se rige por ecuaciones
65

para la ley de conservación de la masa y la ley de acción de la masa en la solución, como se describe en la presente descripción.

5 El término "componentes de unión específica al analito" o "socios de unión específica al analito" se refiere preferentemente a un miembro de un par de unión, en donde el segundo miembro es el analito y en donde el término "par de unión" incluye cualquiera de la clase de pares de unión de tipo inmunitario, tales como sistemas de antígeno/anticuerpo o hapteno/anti-hapteno; y también cualquiera de la clase de pares de unión de tipo no inmunitario, tales como biotina/avidina; biotina/estreptavidina; ácido fólico/proteína de unión a folato; segmentos de ácido nucleico complementarios tales como hebras de ADN complementarias o hebras de ARN complementarias; proteína A o G/immunoglobulinas; y pares de unión que forman enlaces covalentes, tales como grupos reactivos de sulfhidrilo que incluyen maleimidias y derivados de haloacetilo, y grupos reactivos de amina tales como isotriocianatos, ésteres de succinimidilo y haluros de sulfonilo.

15 Los componentes de unión del método de detección bicomponente pueden referirse preferentemente a cualquier componente que tenga un potencial de unión al analito. En modalidades preferidas, los componentes de unión específica al analito pueden ser ácidos nucleicos, preferentemente oligonucleótidos de ARN y/o ADN, anticuerpos, péptidos, proteínas, aptámeros, polímeros impresos molecularmente, células o combinaciones de estos.

20 El término "anticuerpo" como se usa en la presente abarca anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

25 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o región variable de este. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

30 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen a un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige a un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden fabricarse mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler y otros, Nature 256:495 (1975), o pueden hacerse mediante métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos núm. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos mediante el uso de las técnicas descritas en Clackson y otros, Nature 352:624-628 (1991) y Marks y otros, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

45 Los anticuerpos monoclonales en la presente descripción incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (immunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica o homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica o homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpos, así como también fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos núm. 4,816,567; y Morrison y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

50 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son parte de las cadenas variables en las inmunoglobulinas (anticuerpos), generadas por las células B, donde estas moléculas se unen a su antígeno específico. Como las partes más variables de las moléculas, las CDR son cruciales para la diversidad de especificidades antigénicas generadas por las inmunoglobulinas. Hay tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3), dispuestas no consecutivamente, en la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de una inmunoglobulina. Dado que las inmunoglobulinas están compuestas típicamente por dos dominios variables (en dos cadenas polipeptídicas diferentes, cadena pesada y ligera), hay seis CDR para cada receptor de antígeno que puede entrar en contacto colectivamente con el antígeno.

60 Además, los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unirse a antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste de dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. y otros, Nature 341 :544-546 (1 989)) que consiste de un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird y otros, Science

242:423-426 (1988); Huston y otros, PNAS USA 85:5879-5883 (1988)); (viii) dímeros de Fv de cadena simple biespecíficos (WO93/11161) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (WO94/1 3804; P. Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)).

5 Un "dominio de unión al antígeno" es la parte de un anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Un dominio de unión al antígeno puede proporcionarse por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un dominio de unión al antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

10 En algunas modalidades, los componentes de unión pueden basarse en andamios de proteínas manipuladas genéticamente. Los andamios de proteínas se derivan de estructuras proteicas naturales, estables y solubles que se han modificado para proporcionar un sitio de unión para una molécula diana, es decir, un analito, de interés. Los ejemplos de andamios de proteínas manipuladas genéticamente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, que se basan en el dominio Z de la proteína A estafilocócica que proporciona una interfaz de unión en dos de sus hélices α (Nygren, P. A. (2008). FEBS J 275(1 1): 2668- 76); anticualinas, derivadas de lipocalinas, que incorporan sitios de unión para ligandos pequeños en el extremo abierto de un pliegue de barril beta (Skerra, A. (2008) FEBS J 275(1 1): 2677-83), nanocuerpos y DARPin. Los andamios de proteínas manipuladas genéticamente se dirigen típicamente a unirse a las mismas proteínas antigénicas que los anticuerpos. Los péptidos cortos también pueden usarse para unirse a una proteína diana. Los filómeros son péptidos estructurados naturales derivados de genomas bacterianos. Tales péptidos representan una diversa serie de plegamientos estructurales de proteínas y pueden usarse para inhibir/alterar las interacciones proteína-proteína *in vivo* (Watt, P. M. (2006). Nat Biotechnol 24(2): 177-83)].

25 En los métodos de detección bicomponentes, preferentemente se usan dos componentes de unión específica al analito que exhiben un potencial de unión al analito. Preferentemente, los dos componentes de unión específica al analito no compiten entre sí por la unión al analito, sino que se eligen y diseñan para permitir una unión simultánea de los componentes para formar complejos bicomponente/analito. Como se indicó previamente, el analito puede referirse a un agregado o complejo formado por múltiples entidades, por ejemplo, un complejo proteína-proteína. Uno de los dos componentes de unión específica al analito puede unirse a una entidad del complejo del analito, por ejemplo, una primera proteína, y el otro a una segunda entidad del analito, por ejemplo, una segunda proteína. De esta manera, un complejo bicomponente/analito solo se forma en caso de interacción de ambas proteínas, que a su vez están marcadas con los componentes de unión.

35 En algunas modalidades, los componentes de unión pueden ser aptámeros. Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos (ADN o ARN) que reconocen moléculas diana con alta afinidad y especificidad a través de una combinación de complementariedad de forma y enlaces químicos no covalentes (Blank y Blind, Current Opin. Chem. Biol., 2005, 9:336-342). Estos ligandos artificiales se obtienen *in vitro* y puede desarrollarse para reconocer una gran variedad de clases de moléculas diferentes que varían desde simples iones (por ejemplo, Pb²⁺, Liu y Lu, 2003. J Am Chem Soc, 125, 6642-6643) a nucleótidos, moléculas pequeñas, proteínas, virus y células hasta organismos completos (Menger y otros, 2006. Handbook of Experimental Pharmacology, 359-373). Los aptámeros de alta afinidad de unión se han seleccionado a través del conocido método SELEX (Ellington y Szostak, 1990. Nature, 346, 818-822) para la detección de moléculas de bajo peso molecular como la teofilina (Jenison y otros, 1994. Science, 263, 1425-1429), L-arginina (Geiger y otros, 1996. Nucl. Acids Res., 24, 1029-1036), moenomicina (Schuerer y otros, 2001. Bioorg. Med. Chem., 92, 2557-2563), 17 β -estradiol (Kim y otros, 2007. Biosens. Bioelectron., 22, 2525-2531) pero también para moléculas más grandes como la trombina (aptámero de unión a trombina:5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') (Baldrich y otros, Anal Chem. 2004, 76, 23, 7053-63), toxina del cólera o proteína tat del VIH-1, entre otros (para la reseña ver Tombelli y otros, 2007, Biomolec Eng., 24, 191-200).

50 Algunos de los aptámeros mencionados anteriormente se han usado en ensayos similares a ELISA en microplacas o en la superficie de transductores de biosensores (QCM, SPR). También se ha desarrollado un sistema colorimétrico de AuNP modificado por aptámero para la determinación de la proteína PDGF en un ensayo basado en sándwich (Huang y otros, 2005, 77, 5735-5741).

55 Como se usa en la presente, el término "complejos analito/bicomponente" o "complejos bicomponente/analito" se refiere a un complejo ternario que contiene el analito y ambos componentes de unión específica al analito. Tales complejos bicomponente/analito se forman cuando se aplica un método de detección bicomponente a una solución que contiene un analito. Más específicamente, la formación de complejos bicomponente/analito en una detección bicomponente refleja directamente la presencia (y concentración) de un analito en una solución dada. Para usar la formación de complejos bicomponente/analito con el fin de determinar la concentración real de un analito, se debe adquirir una señal que refleje la formación del complejo ternario.

60 Como se usa en la presente, la expresión "señal que depende de la concentración de complejos bicomponente/analito" o "señal que refleja la formación de complejos bicomponente/analito" se refiere a cualquier información cuantificable que permite deducir la cantidad de complejos bicomponente/analito ternarios formados.

65

Naturalmente, la señal dependerá del método de detección bicomponente aplicado. Por ejemplo, si se emplea un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), la señal puede referirse a la señal de fluorescencia que un aceptor de FRET emitirá cuando un donante de FRET absorba un haz de excitación en estrecha proximidad. En el sistema bicomponente, el aceptor FRET o el donante FRET se acoplan preferentemente a los dos componentes de unión específica al analito. Dado que una señal de fluorescencia del FRET-donante-receptor solo se produce cuando los componentes de unión respectivos están muy próximos, la señal refleja directamente la formación de complejos ternarios bicomponente/analito.

De manera similar, Alphascreen (ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado) desarrollado por PerkinElmer y ampliamente disponible comercialmente es un método de detección bicomponente prototipo adicional, donde la generación de la señal se basa en la proximidad de perlas "donantes" y "receptoras" recubiertas con una capa de hidrogel que proporciona grupos funcionales para la bioconjugación. Cuando una interacción biológica entre moléculas acerca las perlas, se inicia una cascada de reacciones químicas para producir una señal muy amplificada. Tras la excitación con láser, un fotosensibilizador en la perla "donante" convierte el oxígeno ambiental en un estado de singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno en estado singlete se difunden para reaccionar con un quimioluminiscente en la perla "receptora" que activa además los fluoróforos contenidos dentro de la misma perla. Los fluoróforos emiten subsecuentemente luz a 520-620 nm.

Los grupos funcionales en las perlas pueden representar los dos componentes de unión específica al analito, por ejemplo, en forma de anticuerpos específicos. Solo cuando el complejo ternario que contiene el analito y los dos componentes específicos del analito se forman las perlas donantes y receptoras están en estrecha proximidad, lo que da como resultado una señal fluorescente detectable.

Debido a la dependencia del ensayo FRET o el ensayo Alphascreen de la proximidad del donante y el aceptor y, por lo tanto, los componentes de unión específica al analito, dichos ensayos se denominan ensayos de detección basados en proximidad. En la técnica se conocen muchos ensayos basados en proximidad en el contexto de los métodos de detección bicomponentes y pueden emplearse en los métodos descritos en la presente descripción.

Como se usa en la presente, el término "método de detección bicomponente basado en proximidad" se referirá a cualquier ensayo en donde la señal que refleja la formación de complejos analito/bicomponente se basa en la proximidad de los dos componentes de unión específica al analito. Estadísticamente, los dos componentes de unión específica al analito probablemente estarán en estrecha proximidad en una solución para producir una señal detectable, si forman parte del mismo complejo ternario.

Los ejemplos no limitantes de métodos bicomponentes basados en proximidad comprenden métodos que emplean un ensayo de transferencia de energía de resonancia, preferentemente un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) o un ensayo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), un ensayo de complementación de proteínas (PCA), Alphascreen o un ensayo de proximidad marcado con ADN, preferentemente un ensayo de ligadura de proximidad (PLA) o un ensayo de extensión por proximidad (PEA).

Estas tecnologías de ensayo de proximidad se conocen bien en la técnica. Para más referencias sobre FRET o BRET, ver por ejemplo (Pfleger, Seeber, y Eidne, 2006), para un ensayo de complementación de proteínas Morell, Ventura, y Avilés, 2009, para Alphascreen Taouji, Dahan, Bosse, y Chevet, 2009 y para métodos de proximidad de ADN marcados tales como PLA (ensayo de ligadura de proximidad) o PEA (ensayo de extensión de proximidad) Söderberg y otros, 2006.

Los ensayos basados en proximidad se prefieren particularmente para los "métodos de detección bicomponentes no compartimentados", que se usan en la presente descripción se refieren a métodos de detección bicomponentes, en donde no se realiza ninguna compartimentación de la solución de muestra al aplicar el método de detección bicomponente. Algunos ensayos no compartimentados también pueden denominarse ensayos homogéneos. En otras palabras, el método bicomponente no compartimentado comprende preferentemente la etapa de poner en contacto el analito y los bicomponentes en una solución de reacción homogénea y la etapa de detección con el fin de adquirir la señal que refleja la formación de complejos ternarios de bicomponente/analito puede realizarse en la solución de muestra homogénea sin la separación de componentes no unidos o analito.

En modalidades preferidas particulares, los métodos como se describen en la presente descripción usan métodos de detección bicomponentes compartimentados. Como se usa en la presente, el término "métodos de detección bicomponentes compartimentados" se referirá a métodos de detección bicomponentes que compartimentalizan la muestra después de poner los componentes de unión específica al analito en contacto con el analito para cuantificar la formación de analito/componentes de unión ternarios.

En general, los métodos de detección bicomponentes compartimentados se basan en la compartimentación de una solución en pequeños compartimientos de manera que, sin la formación de métodos de analito/ componente de unión ternarios, la presencia de ambos componentes de unión en el compartimiento es poco probable y sigue una distribución de Poisson.

Para la compartimentalización, pueden imaginarse diferentes ensayos. Por ejemplo, puede usarse un método de gotitas de emulsión para formar gotitas en una emulsión (por ejemplo, agua en aceite), en donde cada gotita representa un compartimiento separado. La compartimentalización puede implicar ubicaciones o compartimientos físicos, o un entorno de difusión limitado.

5 El término de una "gotita" como se usa en la presente, se refiere preferentemente a una porción aislada de un primer fluido rodeado por un segundo fluido. El primer fluido comprende preferentemente un fluido hidrófilo tal como agua, un medio acuoso, o un tampón, y comprende preferentemente la solución de muestra o las una o más diluciones de esta a las que se añaden los sistemas de detección bicomponentes u otros reactivos. El segundo fluido es preferentemente un fluido hidrófobo, tal como hidrocarburos, aceites de silicona, aceites minerales, solvente orgánico. Las técnicas de emulsiones para compartimentar soluciones de muestra se conocen bien en la técnica.

10 En modalidades particularmente preferidas, el método de detección bicomponente compartimentado es el acoplamiento de emulsión, que se refiere a un concepto de ensayo digital basado en la detección de complejos moleculares ternarios individuales de doble marcado (bicomponente) en emulsión, que pueden identificarse, por ejemplo, mediante PCR digital en gotitas (ddPCR) o secuenciación de próxima generación (NGS).

15 La PCR digital en gotitas (ddPCR) se refiere preferentemente a un método para realizar la PCR digital que se basa en la tecnología de gotitas de emulsión de agua-aceite. Las gotitas de aceite pueden fabricarse mediante el uso de un generador de gotitas que aplica un vacío a cada uno de los pocillos (ver, por ejemplo, Pinheiro y otros. *Analytical Chemistry* 84 (2):1003-11)). Típicamente, la muestra puede fraccionarse en 20 000 o más gotitas, y la amplificación por PCR de las moléculas plantilla ocurre en cada gotita individual. Ventajosamente, la tecnología ddPCR usa reactivos y flujos de trabajo similares a los usados para la mayoría de los ensayos basados en sonda TaqMan estándar.

20 La "secuenciación de próxima generación (NGS)" como se usa en la presente abarcará las tecnologías desarrolladas recientemente para la secuenciación de ácidos nucleicos que típicamente permiten un rendimiento mucho mayor que el enfoque tradicional de Sanger (ver Schuster, *Next-generation sequencing transforms today's biology*, *Nature Methods* 5:16-18 (2008); Metzker, *Sequencing technologies the next generation*. *Nat Rev Genet.* 2010 January; 11(1):31-46. Estas plataformas pueden permitir el secuenciamiento de moléculas individuales de fragmentos de ácido nucleico expandidos clonalmente o no amplificados. Ciertas plataformas implican, por ejemplo, el secuenciamiento por ligadura de sondas modificadas con colorante (que incluye ligadura y escisión cíclica), pirosecuenciación y secuenciación de moléculas individuales. Las especies de secuencia de nucleótidos, las especies de ácido nucleico de amplificación y los productos detectables generados a partir de estas pueden analizarse mediante tales plataformas de análisis de secuencia. La secuenciación de próxima generación puede usarse en los métodos de la invención, por ejemplo, para cuantificar las etiquetas de ADN amplificables por PCR únicas para evaluar la formación de complejos bicomponente/analito como se describe más abajo.

25 Los detalles del acoplamiento de emulsión como un método de detección bicomponente compartimentado preferido se describen en el documento EP 3224360.

30 Para una detección de ddPCR en un ensayo de acoplamiento de emulsión, los componentes de unión específica al analito (tales como un par de anticuerpos) se marcan mediante marcadores de ADN amplificables por PCR únicas y los componentes de unión marcados de este modo se añaden a la muestra (o diluciones de esta, ver, por ejemplo, Ejemplo 3).

35 Antes de una emulsificación de las muestras, la reacción se diluye altamente (~100 000 veces) y se añaden reactivos de PCR para lograr la separación de un solo complejo y la amplificación de PCR por gotita de emulsión de agua en aceite. La ddPCR puede llevarse a cabo mediante el uso del protocolo de ddPCR estándar.

40 La evaluación de la reacción puede basarse en la partición de los marcadores en una reacción de ddPCR mediante el uso de productos de PCR etiquetados con fluorescencia (por ejemplo, mediante el uso de sondas de PCR en tiempo real marcadas con FAM o VIC). De acuerdo con la ddPCR, la evaluación estándar del conglomerado de gotitas puede determinarse de acuerdo con las señales fluorescentes de las gotitas. En la presente descripción, el número de componentes de unión marcados (por ejemplo, anticuerpos) se determina en cada reacción (contando todas las gotitas positivas para un marcador dado, y mediante el uso de la misma definición de conglomerado de gotitas para todas las reacciones).

45 Adicionalmente, también se determina el número de las doblemente coloreadas (que tienen dos marcadores de componentes de unión diferentes). Sin complejos ternarios, la partición de los anticuerpos marcados sigue la distribución de Poisson y da como resultado un número calculable de gotitas doblemente coloreadas (que tienen dos componentes de unión en un compartimiento en base a la pura casualidad). En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de gotitas doblemente coloreadas detectadas (que tienen complejos ternarios adicionales) es mayor de lo que se esperaría por la distribución de Poisson.

50

Sobre la base de estas mediciones, puede calcularse el número de complejos (ver, por ejemplo, el documento EP 3224360 o Karakus y otros, 2019 para referencia adicional). Esto da como resultado una cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos de analitos ternarios.

5 Para una detección de secuenciación de próxima generación en un ensayo de acoplamiento de emulsión, los componentes de unión pueden marcarse preferentemente mediante marcadores de ADN amplificables por PCR únicos, que comprenden un marcador específico para el componente de unión (por ejemplo, anticuerpo) y preferentemente también un marcador individual para la molécula, es decir, un código de barras molecular único o un identificador molecular único- UMI (ver Parekh y otros, 2017). Los componentes de unión marcados pueden añadirse a las muestras o diluciones de estas (ver Ejemplo 3).

10 Después de la unión de los componentes de unión, por ejemplo, los anticuerpos, y antes de la emulsificación de las muestras, la reacción puede estar muy diluida (por ejemplo, ~100 000 veces) y se pueden añadir reactivos de PCR para lograr una separación de complejo único. La amplificación por PCR puede realizarse por gotita de emulsión de agua en aceite. La ddPCR puede llevarse a cabo mediante el uso del protocolo de ddPCR.

15 La evaluación de la reacción puede basarse en la lectura de NGS del componente de unión, por ejemplo, anticuerpo, marcadores UMI diméricos específicos generados de acuerdo con el protocolo estándar de acoplamiento de emulsión. El número de componentes de unión marcados, por ejemplo, anticuerpos, puede determinarse en cada reacción mediante el recuento de todos los marcadores UMI únicos para un componente de unión dado, por ejemplo, anticuerpo (el recuento se limita a un componente de unión dado). El posible marcaje múltiple del mismo componente de unión, por ejemplo, anticuerpo, puede eliminarse mediante el uso de sus secuencias preferentemente diméricas (marcadores múltiples por componente de unión siempre darán como resultados dímeros de marcador UMI doble con un contexto de marcador específico de anticuerpo dado, ya que se colocan en la misma gotita).

20 Los complejos de anticuerpo ternario/bicomponente se cuentan en base a sus productos de PCR marcados con UMI doble diméricos (en el contexto de dos marcadores específicos de componente de unión diferentes (por ejemplo, anticuerpo) denominados heterodímeros). Puede usarse una corrección para el marcaje múltiple de componentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) siguiendo el concepto descrito anteriormente, que tiene en cuenta dímeros de marcadores UMI dobles con un marcador específico de componente dado (por ejemplo, anticuerpo).

25 Una evaluación adicional de las muestras puede llevarse a cabo como en el caso de la PCR etiquetada con fluorescencia (PCR digital en gotitas), brevemente sin complejos ternarios, la partición de los anticuerpos marcados sigue la distribución de Poisson, y da como resultado un número calculable de complejos ternarios (basado en la detección de heterodímeros) en gotitas (que tienen solo dos anticuerpos por casualidad). En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de heterodímeros detectados es mayor de lo que se esperaría por la distribución de Poisson pura. Sobre la base de estas mediciones, puede calcularse el número de complejos (documento EP 3224360, (Karakus y otros, 2019)). Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos ternarios.

30 Las diluciones de las muestras pueden medirse en la misma reacción de secuenciación mediante el uso de códigos de barras de ADN específicos de muestras (por ejemplo, cebadores codificados con códigos de barras) y como los anticuerpos tienen marcadores específicos de componentes distinguibles (por ejemplo, anticuerpo), se pueden realizar muchas mediciones (mediante el uso de diferentes pares de anticuerpos contra diferentes antígenos) en paralelo.

35 En modalidades de acoplamiento de emulsión, los componentes de unión pueden proporcionarse como una biblioteca de componentes de unión adecuados para la detección de múltiples analitos. En estas modalidades, cada miembro de la biblioteca de componentes de unión puede asociarse con una secuencia de nucleótidos única, que puede usarse para identificar el componente de unión.

40 "Asociado" puede significar en el contexto del acoplamiento de emulsión que la presencia de los componentes de unión en el complejo puede detectarse por la presencia de la secuencia de ácido nucleico dentro de la secuencia unida generada en el método. La secuencia de nucleótidos puede unirse como un marcador al componente de unión, ser parte del propio componente de unión, por ejemplo, un aptámero, o estar presente dentro del componente de unión, por ejemplo, ácido nucleico dentro de un fago. Por ejemplo, cada miembro de la biblioteca puede marcarse con una secuencia de nucleótidos única que es una secuencia de nucleótidos que se une a los componentes de unión.

45 Los métodos para unir nucleótidos a componentes de unión tales como anticuerpos o compuestos se conocen en la técnica. Alternativamente, si la biblioteca de componentes de unión es una biblioteca de presentación de fagos, la secuencia de nucleótidos única puede ser la secuencia que codifica una o más regiones de CDR o el dominio de unión presentado. Por ejemplo, una biblioteca de presentación puede generarse mediante la inserción de secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos a presentar en un fago en una ubicación conocida. Después, pueden usarse cebadores universales que amplificarán las secuencias insertadas y, por lo tanto, identificarán la secuencia de unión. Alternativamente, si el componente de unión puede ser un aptámero y el propio aptámero puede ser la secuencia de nucleótidos única.

La secuencia de nucleótidos puede ser un oligonucleótido y puede comprender ARN o ADN, de una sola o doble hebra. Los nucleótidos usados para marcar el agente de unión o la diana pueden tener preferentemente de 5- 150 bases de longitud, por ejemplo, de 10-40, o de 40 -80 bases de longitud. Los nucleótidos que forman el ácido nucleico pueden modificarse químicamente para aumentar la estabilidad de la molécula, para mejorar su biodisponibilidad o para conferirle actividad adicional. Por ejemplo, las bases de pirimidina pueden modificarse en las posiciones 6 u 8, y las bases de purina en la posición 5 con CH₃ o halógenos tales como I, Br o Cl. Las modificaciones o bases de pirimidina también incluyen 2 NH₃, O-CH₃, N-CH₃ y N₂-CH₃. Las modificaciones en la posición 2' son modificaciones de azúcar e incluyen típicamente un grupo NH₂, F u OCH₃. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5' tales como la "protección con caperuza".

Alternativamente, pueden usarse nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de morfolino, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los oligonucleótidos morfolino se ensamblan a partir de diferentes subunidades morfolino, cada una de las cuales contiene una de las cuatro bases genéticas (adenina, citosina, guanina y timina) unidas a un anillo de morfolina de 6 miembros. Las subunidades se unen mediante enlaces intrasubunitarios de fosfordiamidato no iónico para dar un oligonucleótido de morfolino. Los monómeros de LNA se caracterizan porque la conformación del anillo de furanosa se restringe mediante un enlazador de metileno que conecta la posición 2'-O a la posición 4'-C. El PNA es un análogo del ADN en el que la cadena principal es un pseudopéptido en lugar de un azúcar.

Cada miembro de una biblioteca puede estar asociado con una secuencia de nucleótidos única, es decir, cada miembro puede tener un marcador de identidad de ácido nucleico detectable único. Preferentemente, los marcadores de identidad de ácido nucleico únicos pueden enlazarse. Enlazado puede significar que el proceso de enlace tiene el potencial de formar productos de ácido nucleico multímeros aleatorios en base a la colocación de estos marcadores de identidad de ácido nucleico en condiciones adecuadas del ensayo. Preferentemente, el producto multimérico es un dímero. Las condiciones de ensayo adecuadas pueden incluir marcadores de amplificación y amplificación de consenso específica de las secuencias únicas que producen amplicones enlazables. La unión de los amplicones enlazables, por ejemplo, ácidos nucleicos específicos de componentes, forma etiquetas de identidad enlazadas, que codifican la información de colocación de los marcadores de identidad. La reacción de unión puede ser basada en amplificación o implicar otras técnicas. La unión basada en la amplificación puede utilizar dos o más pares de cebadores de amplificación con capacidades de unión idénticas, pero con etiquetas 5' complementarias o secuencias de enlace de dímeros que dan como resultado la formación de híbridos de ácido nucleico de ADN polimerasa extensibles. Las etiquetas o secuencias de enlazador de dímeros significan que la secuencia amplificada por un par de cebadores se hibridará con secuencias amplificadas por el segundo par de cebadores. Los marcadores de identidad se enlazan de esta manera.

Los marcadores de identidad, es decir, las secuencias nucleotídicas únicas asociadas usadas en bibliotecas, tales como la biblioteca de presentación de proteínas y la biblioteca de anticuerpos, pueden ser diferentes en su trasfondo biológico, y por lo tanto el proceso de amplificación y unión se basa en dos pares de cebadores diferentes, por ejemplo, un par de cebadores amplifica secuencias diana tales como marcadores de identidad basados en ADNc y el segundo par de cebadores amplifica secuencias nucleotídicas específicas de agentes de unión usados como marcadores de identidad. La unión de los diferentes marcadores permite vincular la información específica del agente de unión a la información diana, por ejemplo, proteínas codificadas por los ADNc mostrados.

El método, el kit u otros aspectos implementados por ordenador de la invención pueden comprender y/o emplear en algunas modalidades uno o más dispositivos informáticos convencionales que tienen un procesador, un dispositivo de entrada tal como un teclado o un ratón, memoria tal como un disco duro y memoria volátil o no volátil, y código informático (software) para el funcionamiento de la invención.

Los componentes de los dispositivos informáticos pueden ser convencionales, aunque el dispositivo puede configurarse a medida para cada implementación particular. Las etapas o el sistema implementados por ordenador pueden ejecutarse en cualquier arquitectura particular, por ejemplo, sistemas personales/microordenador, minicomputadores o de gran escala. Los sistemas operativos ilustrativos incluyen Apple Mac OS X e iOS, Microsoft Windows y UNIX/Linux; sistemas basados en SPARC, POWER e Itanium; y z/Architecture. El código informático para realizar las etapas del método descrito en la presente descripción puede escribirse en cualquier lenguaje de programación o entorno de desarrollo basado en modelos, tal como, pero sin limitarse a, Python, C/C++, C#, Objective-C, Java, Basic/VisualBasic, MATLAB, Simulink, StateFlow, Lab View o ensamblador. El código informático puede comprender subrutinas que están escritas en un lenguaje informático patentado que es específico del fabricante de una placa de circuito, controlador u otro componente de hardware informático usado junto con la invención.

La información procesada y/o producida por el método, es decir, una representación digital de señales que reflejan la formación de complejos ternarios de bicomponente/análito puede emplear cualquier tipo de formato de archivo que se use en la industria. Puede utilizarse cualquier medio legible por ordenador adecuado. El medio legible por ordenador o utilizable por ordenador puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse a, un sistema, aparato, dispositivo o medio de propagación electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor. Ejemplos más específicos (una lista no exhaustiva) del medio legible por ordenador incluiría lo siguiente: una conexión eléctrica que tiene uno o más cables, un disquete de ordenador portátil, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria

de solo lectura (ROM), una memoria de solo lectura programable y borrable (EPROM o memoria Flash), una fibra óptica, una memoria de solo lectura de disco compacto portátil (CD-ROM), un dispositivo de almacenamiento óptico, un medio de transmisión tal como aquellos que admiten Internet o una intranet, almacenamiento en la nube o un dispositivo de almacenamiento magnético.

5 Todos los documentos citados de la patente y la literatura no patentada se incorporan de este modo como referencia en su totalidad.

10 Como se usa en la presente, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a casetes de expresión, vectores reporteros y respectivos componentes de estos que están abiertos a la inclusión de elementos no especificados.

15 El término "que consiste de" se refiere a los casetes de expresión, vectores reporteros y respectivos componentes de estos descritos en la presente descripción, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la modalidad.

Figuras

20 La invención se explicará con más detalle mediante la referencia a las figuras de dibujo adjuntas, en las que:

25 La Figura 1 muestra una curva y el principio básico del trasfondo matemático del intervalo dinámico extendido de la medición en base a una simulación de un proceso bicomponente saturable compartimentado. Se han usado los siguientes parámetros: número de compartimientos = 200 000, volumen de entrada = 20 microL, factor de dilución antes de la emulsificación = 192 000, concentración de objetivo nM - variada, concentración del componente A, nM = 1, concentración del componente B, nM = 0,3, constante de disociación del componente A = 0,1 nM, constante de disociación del componente B = 0,1 nM; (1) número de complejos de analito de dos componentes, ternarios (moléculas), (2) - número de compartimientos dobles positivos sin analito (fondo de Poisson), (3) - número de compartimientos dobles positivos con objetivo (fondo de Poisson), y (4) de la suma de (1) y (3).

30 La Figura 2 muestra la determinación de las constantes de disociación de los componentes. Representación gráfica de los resultados de la simulación. La intersección de la Ec 3 a diferentes concentraciones de antígeno (Ag) (indicadas) y a las concentraciones de componentes 1 y 5 nM respectivamente. Número de gotitas: 10 000, factor de dilución 10 000 y el volumen de reacción es de 20 microL. Mediante el uso de estos parámetros la sustancia química se equilibra, se simula al proceso de Poisson, y se ha determinado el número de complejos ternarios formados. Los valores, mediante el uso de la Ec. 3, de las Kd calculadas son idénticos a los valores usados para la simulación como entradas (ver Ejemplo 3).

Modo óptimo para llevar a cabo la invención

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1.

45 De acuerdo con la ley de acción de masa en solución y la ley de conservación de la masa, las reacciones bicomponentes saturables entre dos componentes de unión (por ejemplo, anticuerpo) y una molécula diana/analito (por ejemplo, antígeno) pueden expresarse como el siguiente sistema de ecuaciones:

$$50 \quad kd_1 = \frac{ab_1}{c_1}, kd_2 = \frac{ab_2}{c_2}, kd_3 = \frac{b_1c_2}{c_{12}}, kd_4 = \frac{b_2c_1}{c_{12}},$$

$$b_{10} = b_1 + c_1 + c_{12}, b_{20} = b_2 + c_{12} + c_2, a_0 = a + c_1 + c_{12} + c_2 \quad \text{Ec. 1.}$$

55 donde b_{10} , b_{20} son las concentraciones generales de anticuerpos (componentes) con constantes de disociación correspondientes (kd_1 , kd_2) y a_0 es la concentración de antígeno total, los anticuerpos y el antígeno están en a , b_1 , b_2 o c_1 , c_2 , c_{12} estado unido, donde c_{12} es el complejo bicomponente (ternario) (por ejemplo, ambos anticuerpos unidos) del antígeno (la señal proporcional).

60 Resolviendo el sistema de la Ec. 1. para a_0 da como resultado dos raíces:

65

$$a0 = \frac{1}{2c_{12}(c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20})} \left[c_{12}^4 - c_{12}^3(b_{10} + b_{20} + kd_1 + kd_2) - \right. \\ \left. c_{12}b_{10}b_{20}(b_{10} + b_{20} + kd_1 + kd_2) + c_{12}^2 \left(2b_{20}kd_1 + 2b_{10}(b_{20} + kd_2) - \right. \right. \\ \left. \left. \sqrt{(c_{12}^2 + b_{10}b_{20} - c_{12}(b_{10} + b_{20} + kd_1))^2 - 2c_{12}((c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20}) + c_{12}kd_1)kd_2 + c_{12}^2kd_2^2} \right) + \right. \\ \left. b_{10}b_{20} \left(b_{10}b_{20} + \sqrt{(c_{12}^2 + b_{10}b_{20} - c_{12}(b_{10} + b_{20} + kd_1))^2 - 2c_{12}((c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20}) + c_{12}kd_1)kd_2 + c_{12}^2kd_2^2} \right) \right]$$

$$a0 = \frac{1}{2c_{12}(c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20})} \left[c_{12}^4 - c_{12}^3(b_{10} + b_{20} + kd_1 + kd_2) - \right. \\ \left. c_{12}b_{10}b_{20}(b_{10} + b_{20} + kd_1 + kd_2) + c_{12}^2 \left(2b_{20}kd_1 + 2b_{10}(b_{20} + kd_2) + \right. \right. \\ \left. \left. \sqrt{(c_{12}^2 + b_{10}b_{20} - c_{12}(b_{10} + b_{20} + kd_1))^2 - 2c_{12}((c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20}) + c_{12}kd_1)kd_2 + c_{12}^2kd_2^2} \right) + \right. \\ \left. b_{10}b_{20} \left(b_{10}b_{20} - \sqrt{(c_{12}^2 + b_{10}b_{20} - c_{12}(b_{10} + b_{20} + kd_1))^2 - 2c_{12}((c_{12} - b_{10})(c_{12} - b_{20}) + c_{12}kd_1)kd_2 + c_{12}^2kd_2^2} \right) \right]$$

Ec. 2.

Ambas son raíces positivas reales de acuerdo con la curva de referencia no biyectiva, es decir, no permite una correspondencia uno a uno entre la señal detectada (c12) y la concentración de analito (a0). Las relaciones de antígeno activo/inactivo (con respecto a la capacidad de unión) y anticuerpos también pueden añadirse a estas ecuaciones, considerando que las concentraciones generales de estos analitos no están disponibles para las reacciones, sino solo una fracción de ellas. Estas relaciones pueden determinarse mediante el uso de un concepto similar al descrito en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2.

También se describe una simulación ilustrativa de la determinación de Kd mediante el uso de la tecnología de acoplamiento de emulsión (EC) útil para comprender la invención.

La reacción de antígeno (Ag) y dos anticuerpos reactivos al antígeno diferentes (Ab1 = 5 nM y Ab2 = 1 nM) se simuló (de acuerdo con el equilibrio químico y las ecuaciones de conservación de la masa (Ecuación 1) con Kd1 = 0.2 nM y Kd2 = 0.1 nM establecidos) en un volumen de 20 microlitros. El volumen de reacción simulado se diluyó (1e+5 veces) y mediante la simulación basada en la distribución de Poisson se usó para clasificar los reactivos en 100 000 gotitas (volumen total: 20 microlitros). Todas las gotitas se clasifican y cuentan de acuerdo con sus reactivos encapsulados. Las funciones kd1 - kd2 (Ec. 3) se calcularon a tres concentraciones diferentes de Ag [a0] con las siguientes entradas: concentración total de Ag [a0], Ab1 [b10], Ab2 [b20] y el complejo Ag-Ab1-Ab2 [c12] determinado por la simulación se sustituyó en las ecuaciones y el punto de intersección de funciones se determinó (ver Figura 2).

$$\begin{aligned}
 kd_1 = & \frac{-a_0c_{12}^2 + 2a_0c_{12}b_{20} - c_{12}^2b_{20} - a_0b_{10}b_{20}}{2c_{12}b_{20}} + \\
 & \frac{2c_{12}b_{10}b_{20} - b_{10}b_{20}^2 - c_{12}^2kd_2 - b_{10}b_{20}kd_2}{2c_{12}b_{20}} \\
 & \frac{(c_{12}^2 - b_{10}b_{20})\sqrt{a_0^2 - 2a_0b_{20} + b_{20}^2 + 2a_0kd_2 + 2b_{20}kd_2 + kd_2^2}}{2c_{12}b_{20}} \\
 kd_1 = & \frac{-a_0c_{12}^2 + 2a_0c_{12}b_{20} - c_{12}^2b_{20} - a_0b_{10}b_{20}}{2c_{12}b_{20}} + \\
 & \frac{2c_{12}b_{10}b_{20} - b_{10}b_{20}^2 - c_{12}^2kd_2 - b_{10}b_{20}kd_2}{2c_{12}b_{20}} \\
 & \frac{(c_{12}^2 - b_{10}b_{20})\sqrt{a_0^2 - 2a_0b_{20} + b_{20}^2 + 2a_0kd_2 + 2b_{20}kd_2 + kd_2^2}}{2c_{12}b_{20}}
 \end{aligned}$$

Ec. 3.

Ecuación 3. Ag [a0], Ab1 [b10], Ab2 [b20] y Ag-Ab1-Ab2 [c12] se sustituyen en las ecuaciones. En el caso de [c12] su valor se determina mediante simulación, los otros son valores de entrada de la simulación.

La Figura 2 representa la intersección de las curvas de la Ec 3 (mediante el uso de la ecuación anterior) a diferentes concentraciones de Ag. Los valores de las Kd calculadas son idénticos a los valores usados para la simulación como entradas (ver más arriba).

De acuerdo con los resultados de la simulación, ambas Kd pueden calcularse a partir de la cantidad inicial de antígeno y las concentraciones de anticuerpos y la concentración medida del complejo analito-bicomponente (ternario), mediante la determinación de las intersecciones de la Ec. 3. En los experimentos, es beneficioso si las intersecciones por pares se calculan como una aproximación de las Kd experimentales y los valores dados se tratan mediante enfoques estadísticos como, por ejemplo, distribuciones Gauss mixtas u otras.

Se debe señalar que no todas las combinaciones de parámetros de entrada dan como resultado un sistema que se puede resolver, pero siempre se podrían encontrar condiciones adecuadas, no solo cambiando la concentración de antígeno, sino también cambiando las concentraciones de los anticuerpos. Además, solo una de las ecuaciones (Ecuación 3) dará como resultado dos raíces positivas, que en un caso individual deben determinarse.

Las relaciones de antígeno activo/inactivo (con respecto a la capacidad de unión) y anticuerpos también pueden añadirse a estas ecuaciones, considerando que las concentraciones generales de estos analitos no están disponibles para las reacciones, sino solo una fracción de ellas. Estas relaciones pueden determinarse mediante el uso de más diluciones que extienden el concepto descrito en el Ejemplo 2.

Ejemplo 3.

Una medición ilustrativa de la concentración de un analito

Se proporciona una muestra que contiene una concentración desconocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Para detectar el analito mediante el uso de un método bicomponente, se aplica Alphascreen. Alphascreen es un método de detección bicomponente de prototipo, donde la generación de la señal se basa en la proximidad de perlas "donantes" y "receptoras" recubiertas con una capa de hidrogel que proporciona grupos funcionales para la bioconjugación. Cuando una interacción biológica entre moléculas acerca las perlas, se inicia una cascada de reacciones químicas para producir una señal muy amplificada. Tras la excitación con láser, un fotosensibilizador en la perla "donante" convierte el oxígeno ambiental en un estado de singlete más excitado. Las moléculas de oxígeno en estado singlete se difunden para reaccionar con un quimioluminiscente en la perla "receptora" que activa además los fluoróforos contenidos dentro de la misma perla. Los fluoróforos emiten subsecuentemente luz a 520-620 nm. Los grupos funcionales, que están involucrados en la interacción biológica, se proporcionan por dos anticuerpos, como una figura ilustrativa del par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061), los anticuerpos se conjugan a la superficie de las perlas donante y aceptora, respectivamente. Tras el contacto de las perlas donantes y aceptoras con la muestra, los anticuerpos se unirán a la proteína HER2 formando un complejo

ternario, que mantiene las perlas donantes yceptoras en estrecha proximidad lo que da como resultado una señal fluorescente detectable de acuerdo con el principio descrito anteriormente.

Para medir la concentración desconocida de un analito de proteína HER2, puede hacerse una comparación con señales predeterminadas de una serie de concentraciones conocidas diferentes de proteínas HER2. Tal curva de referencia para un ensayo bicomponente se caracteriza por un cierto valor de señal que tiene una correspondencia con dos valores de concentración del analito en la mayoría de los casos, por ejemplo, una curva de referencia no biyectiva. Por lo tanto, la curva no permite una correspondencia uno a uno entre la concentración del analito y la señal detectada. Para determinar la concentración de HER2 se realizan una o más diluciones de factores definidos a partir de la muestra de cantidad desconocida de HER2 y las señales se determinan. Cada señal de las diluciones tiene dos concentraciones correspondientes si se compara con la curva de referencia. Como la relación de las concentraciones deducidas y su factor de dilución definido debe ser igual, puede determinarse la concentración de la muestra de HER2. Matemáticamente $f(x) = s1$ donde $f(x)$ es la función de la curva de referencia, que es una función de concentración x y $s1$ es la señal medida. $f(x) = s1$ puede satisfacerse mediante dos concentraciones $x1$ o $x2$. Sin embargo, x puede determinarse si $f(x/c) = s2$ se determina, donde c es un factor de dilución definido y $s2$ es la señal medida; de manera similar, como arriba, $f(x/c) = s2$ puede satisfacerse por $x3$ o $x4$. Como $x1/x3$ o $x1/x4$ o $x2/x3$ o $x2/x4$ deben ser c y se puede demostrar que solo uno o dos de ellos pueden ser iguales a c y si dos de ellos son iguales, solo pueden satisfacerse en el mismo x , por lo tanto, la ambigüedad puede resolverse. Por ejemplo, si $s1=1000$ unidades fluorescentes (FU), corresponde en la curva de referencia hipotética a 100 nM ($x1$) y 5 nM ($x2$) de proteína HER2, diluir la muestra original de HER2 por un factor de 10 da como resultado 2000 (FU) de señal, que corresponde en una curva de referencia hipotética a 90 nM ($x3$) y 10 nM ($x4$) de proteínas HER2. $x1/x3=100/90$ o $x1/x4=100/10$ o $x2/x3=5/90$ o $x2/x4=5/10$ como solo $x1/x4=c$, los resultados son $x = x1 = 100$ nM.

Ejemplo 4.

Una medición ilustrativa de la concentración de un analito mediante el uso de un método bicomponente compartimentado

Se proporciona una muestra que contiene una concentración desconocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se usa como reactivos de detección, es decir, como componentes de unión específica al analito. El método bicomponente compartimentado es el acoplamiento de emulsión (documento EP 3224360, Karakus y otros). El acoplamiento de emulsión es un concepto de ensayo digital basado en la detección de complejos moleculares ternarios individuales (bicomponentes) doblemente marcados en emulsión, que se identifican, por ejemplo, mediante ddPCR. Para la detección de ddPCR, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se marca mediante marcadores de ADN amplificables por PCR únicos. La muestra se diluye por factores definidos y los anticuerpos marcados se añaden a las muestras, como en el Ejemplo 3. Antes de la emulsificación de las muestras, la reacción se diluye altamente (~100 000 veces) y se añaden reactivos de PCR para lograr la separación de un solo complejo y la amplificación de PCR por gotita de emulsión de agua en aceite. La ddPCR se lleva a cabo mediante el uso del protocolo estándar de ddPCR (Biorad QX200 ddPCR).

La evaluación de la reacción se basa en la partición de los marcadores en las reacciones de ddPCR mediante el uso de productos de PCR etiquetados con fluorescencia (mediante el uso de sondas de PCR en tiempo real marcadas con FAM o VIC). De acuerdo con la evaluación estándar de ddPCR, el conglomerado de gotitas se determina de acuerdo con las señales fluorescentes de las gotitas, el número de anticuerpos marcados se determina en cada reacción (contando todas las gotitas positivas al marcador para un marcador dado, y mediante el uso de la misma definición de grupo de gotitas para todas las reacciones). Adicionalmente, también se determina el número de las doblemente coloreadas (que tienen dos marcadores de anticuerpos diferentes). Sin complejos ternarios (proteína HER2 con dos anticuerpos unidos), la partición de los anticuerpos marcados sigue una distribución de Poisson, y da como resultado un número calculable de gotitas doblemente coloreadas (que tienen dos anticuerpos basados en la pura casualidad). En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de gotitas doblemente coloreadas detectadas (que tienen complejos ternarios adicionales) es mayor de lo que se esperaría por la distribución de Poisson. Sobre la base de estas mediciones, puede calcularse el número de complejos (ver documento EP 3224360, Karakus y otros, 2019 para referencia adicional). Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos de analito ternarios. De acuerdo con la Ec. 1, con constantes de disociación conocidas y fracción activa de los anticuerpos aplicados, también puede calcularse la concentración absoluta original del analito (HER2). Sin embargo, la Ec. 1 tiene dos raíces, solo una de ellas es la concentración. Siguiendo un cálculo similar al del Ejemplo 3 dado, la concentración correcta de la muestra de HER2 desconocida puede determinarse (ver Ejemplo 3 para un ejemplo numérico).

Ejemplo 5.

También se describe una medición ilustrativa de las constantes de disociación de anticuerpos en un ensayo bicomponente no compartimentado útil para comprender la invención.

Se proporciona una muestra que contiene una concentración conocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se usa como un reactivo ilustrativo. El método bicomponente es Alphascreen como en el Ejemplo 3 mediante el uso de diluciones y la curva de referencia descrita en el Ejemplo 3. Para determinar la relación de la señal de Alphascreen y la concentración correspondiente de los complejos ternarios, puede usarse un método descrito en el Ejemplo 4 paralelo a las mediciones de la curva de referencia de Alphascreen. Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos ternarios relacionados con las señales de Alphascreen. Para calcular las constantes de disociación (K_d) de los anticuerpos, se aplican las Ec. 3, que tienen más de una dilución del analito con cantidad conocida de analito y la cantidad determinada de complejo ternario; esta última se determina mediante el uso de la correspondencia determinada entre la concentración de los complejos ternarios y la señal de Alphascreen. Las dos K_d pueden calcularse de acuerdo con el Ejemplo 2. Matemáticamente, se aplica $f(kd1, c12, a0) = kd2$ donde $kd1$ y $kd2$ son constantes de disociación y $c12$ es la concentración medida del complejo ternario del analito y a es la concentración del analito. Como las diferentes diluciones del analito corresponden a diferentes concentraciones del $c12$, la función f tiene diferentes formas. Sin embargo, como las K_d son constantes materiales, en consecuencia, todas las formas de la función f deben satisfacerse mediante un cierto par de valores de K_d , que pueden determinarse, ver el Ejemplo 2.

Ejemplo 6.

También se describe una medición ilustrativa de las constantes de disociación de anticuerpos en un ensayo bicomponente compartimentado útil para comprender la invención.

Se proporciona una muestra que contiene una concentración conocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se usa como reactivos de detección ilustrativos, es decir, componentes de unión específicos del analito. El método bicomponente compartimentado es el acoplamiento de emulsión (documento EP 3224360, (Karakus y otros, 2019)) mediante el uso de Biorad QX200 ddPCR como dispositivo de detección como en el Ejemplo 4 mediante el uso de diluciones y el número de complejos ternarios puede calcularse (documento EP 3224360, Karakus y otros, 2019) como en el Ejemplo 4. Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos ternarios. Para calcular las constantes de disociación de los anticuerpos se aplican las Ec 3, que tienen más de una dilución del analito con cantidad conocida de analito, anticuerpos y cantidad determinada de complejo ternario, las dos K_d pueden calcularse de acuerdo con el Ejemplo 2. Matemáticamente se aplica $f(kd1, c12, a0) = kd2$, donde $kd1$ y $kd2$ son constantes de disociación y ac es la concentración medida del complejo ternario del analito y a es la concentración del analito. Como diferentes diluciones corresponden a diferentes valores (concentración) del 'ac', la función f tiene diferentes formas. Sin embargo, dado que las K_d son constantes materiales, en consecuencia, todas las formas de la función f deben satisfacerse mediante un cierto par de valores de K_d , que pueden determinarse, ver Ejemplo 2.

Ejemplo 7.

Una medición ilustrativa de la concentración de un analito mediante el uso de un método bicomponente compartimentado mediante el uso de secuenciación de próxima generación

Se proporciona una muestra que contiene una concentración desconocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se usa como reactivos de detección, es decir, componentes de unión específica al analito. El método bicomponente compartimentado es el acoplamiento de emulsión (documento EP 3224360, Karakus y otros, 2019)). El acoplamiento de emulsión es un concepto de ensayo digital basado en la detección de complejos moleculares individuales (ternarios) doblemente marcados en emulsión, que se identifican, por ejemplo, mediante la secuenciación de próxima generación (NGS). Para la detección por NGS, el par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) se marca mediante marcadores de ADN amplificables por PCR únicas (marcador específico de anticuerpo), que también tiene el código de barras molecular único de la molécula marcada individual (UMI) (Parekh y otros, 2017). Se preparan diluciones del analito definidas y los anticuerpos marcados se añaden a las muestras, como en el Ejemplo 3. Después de la unión del anticuerpo y antes de la emulsificación de las muestras, la reacción se diluye altamente (~100 000 veces) para lograr la separación de un solo complejo, se añaden reactivos de PCR y la amplificación por PCR por gotita de emulsión de agua en aceite, como en ddPCR, se lleva a cabo mediante el uso del protocolo de ddPCR (Biorad QX200 ddPCR).

La evaluación de la reacción se basa en la lectura por NGS de los marcadores UMI diméricos específicos de anticuerpo generadas de acuerdo con el concepto de acoplamiento de emulsión (documento EP 3224360). El número de anticuerpos marcados se determina en cada reacción mediante el recuento de todos los marcadores UMI únicos para un anticuerpo dado (el recuento se limita a un contexto de marcador específico de anticuerpo dado), y los posibles múltiples marcadores del mismo anticuerpo se eliminaron mediante el uso de sus secuencias preferentemente diméricas (los múltiples marcadores por anticuerpo siempre tienen dímeros de marcadores UMI dobles con el mismo contexto de marcador específico de anticuerpo, ya que se colocan en la misma gotita). Los complejos ternarios se cuentan sobre la base de sus productos de PCR marcados con UMI dobles diméricos (dos marcadores específicos de

anticuerpos diferentes denominados heterodímeros) con corrección de acuerdo con los múltiples marcadores de anticuerpos (siguiendo el concepto presentado anteriormente para eliminar el efecto de los múltiples marcadores por anticuerpo). La evaluación adicional de las muestras se lleva a cabo de acuerdo con el Ejemplo 4, brevemente sin complejos ternarios, la partición de los anticuerpos marcados sigue la distribución de Poisson, y da como resultado un número calculable de complejos ternarios (basado en la detección de heterodímeros) en gotitas (que tienen solo dos anticuerpos por casualidad). En el caso de complejos ternarios presentes en la reacción, el número de heterodímeros detectados es mayor de lo que se esperaría por la distribución de Poisson pura. Sobre la base de estas mediciones, puede calcularse el número de complejos (documento EP 3224360). Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos ternarios. De acuerdo con la Ecuación 1-2 con constantes de disociación conocidas y fracción activa (esta última es opcional) de los anticuerpos aplicados también puede calcularse la concentración absoluta original del analito (HER2). Sin embargo, la Ecuación 1-2 tiene dos raíces, solo una de ellas siempre es real. Como se describe en el Ejemplo 3, mediante el uso de diluciones puede determinarse la concentración correcta de la muestra de HER2 desconocida (ver Ejemplo 3 para un ejemplo numérico). Las diluciones de las muestras pueden medirse en la misma reacción de secuenciación mediante el uso de códigos de barras de ADN específicos de las muestras (por ejemplo, cebadores codificados con códigos de barras).

Ejemplo 8.

También se describe una medición ilustrativa de las constantes de disociación de anticuerpos en un ensayo bicomponente compartimentado mediante el uso de secuenciación de próxima generación útil para comprender la invención.

Se proporciona una muestra que contiene una concentración conocida de un analito conocido. Como caso ilustrativo, el analito es una proteína, también como ejemplo es HER2, una variante del receptor del EGFR, par de anticuerpos ErbB2/Her2 (Novus Biologicals DP0061) marcado con marcadores UMI específicos de anticuerpos. El método bicomponente compartimentado fue el acoplamiento de emulsión (documento EP 3224360,) mediante el uso de NGS como el método de detección como en el Ejemplo 7 y mediante el uso de diluciones y Ec1-2, puede calcularse el número de complejos ternarios (documento EP 3224360). Esto da como resultado la cuantificación absoluta (el recuento de moléculas) de los complejos ternarios. Para calcular las constantes de disociación (Kd) de los anticuerpos, se aplica la Ec. 3, que tiene más de una dilución del analito (estas pueden ser parcialmente las mismas diluciones que las anteriores) con una cantidad conocida del analito y una cantidad determinada del complejo ternario, las dos Kd pueden calcularse de acuerdo con el Ejemplo 2. Matemáticamente, se aplica $f(kd1, c12, a0) = kd2$ donde $kd1$ y $kd2$ son constantes de disociación y $c12$ es la concentración medida del complejo ternario del analito y $a0$ es la concentración del analito. Como las diferentes diluciones corresponden a diferentes valores (concentración) de $c12$, la función f tiene diferentes formas, sin embargo, como las Kd son constantes materiales, en consecuencia, todas las formas de la función f deben satisfacerse mediante un cierto par de valores de Kd, que pueden determinarse, ver Ejemplo 2. Las diluciones de las muestras pueden medirse en la misma reacción de secuenciación mediante el uso de códigos de barras de ADN específicos de las muestras (por ejemplo, cebadores codificados con códigos de barras).

Las relaciones de antígeno activo/inactivo (con respecto a la capacidad de unión) y anticuerpos también pueden añadirse a estas ecuaciones, considerando que las concentraciones generales de estos analitos no están disponibles para las reacciones, sino solo una fracción de ellas. Estas relaciones pueden determinarse mediante el uso de más diluciones que extienden el concepto descrito en el Ejemplo 8.

Referencias

- Binder H. y otros. (2008) "Hook"-calibration of GeneChip-microarrays: Theory and algorithm, Algorithms for molecular biology, Biomed Central LTD, LO, vol. 3, no. 1, página 12, 29 de agosto de 2008.
- Douglass E. F. y otros: "A Comprehensive Mathematical Model for Three-Body Binding Equilibria", Journal of the American Chemical Society, vol. 135, núm. 16, 16 de abril de 2013.
- Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L., y Goldberg, M. E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Immunological Methods, 77(2), 305-319. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981007>
- Karakus, U., Thamamongood, T., Ciminski, K., Ran, W., Günther, S. C., Pohl, M. O., ... Stertz, S. (2019). MHC class II proteins mediate cross-species entry of bat influenza viruses. Nature 567(7746) <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0955-3>
- Morell, M., Ventura, S., y Avilés, F. X. (2009). Protein complementation assays: Approaches for the in vivo analysis of protein interactions. FEBS Letters, 583(11), 1684-1691. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.002>
- Parekh, S., Ziegenhain, C., Vieth, B., Enard, W., y Hellmann, I. (2017). zUMIs: A fast and flexible pipeline to process RNA sequencing data with UMIs. BioRxiv, 2-7. <https://doi.org/10.1101/153940>

Pfleger, K. D. G., Seeber, R. M., y Eidne, K.A. (2006). Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. *Nature Protocols*, 1(1), 337-345. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.52>

5 Quan, P. L., Sauzade, M., y Brouzes, E. (2018). DPCR: A technology review. *Sensors (Switzerland)*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/s18041271>

Rey E. G. y otros (2017): "Mitigating the Hook Effect in Lateral Flow Sandwich Immunoassays Using Real-Time Reaction Kinetics", *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 89, núm. 9, páginas 5095-5100, XP055566188.

10 Rossant C. J. y otros. (2015): "Versatility of homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assays for biologic drug discovery", *Journal of Biomolecular Screening Society for Laboratory Automation and Screening*.

15 Xiong Y. y otros. (2017): "Development of a novel immunoassay to detect interactions with the transactivation domain of p53: application to screening of new drugs", *SCIENTIFIC REPORTS*, vol. 7, núm. 1.

20 Smith, A. M., Heisler, L. E., Mellor, J., Kaper, F., Thompson, M. J., Chee, M., ... Nislow, C. (2009). Quantitative phenotyping via deep barcode sequencing. *Genome Research*, 19(10), 1836-1842. <https://doi.org/10.1101/gr.093955.109>

Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., ... Landegren, U. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods*, 3(12), 995-1000. <https://doi.org/10.1038/nmeth947>

25 Taouji, S., Dahan, S., Bosse, R., y Chevet, E. (2009). Current Screens Based on the AlphaScreen[®] Technology for Deciphering Cell Signalling Pathways. *Current Genomics*, 10(2), 93-101. <https://doi.org/10.2174/138920209787847041>

30 Wu y otros. (2018). Förster resonance energy transfer immunoassays using engineered proteins for breast cancer biomarker detection. Tesis doctoral. Université Paris-Saclay.

35 Zorba A. y otros: "Delineating the role of cooperativity in the design of potent PROTACs for BTK", *Proceedings of the national academy of sciences*, vol. 115, núm. 31, 16 de julio de 2018.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la concentración de un analito en una muestra con una concentración desconocida de analito mediante el uso de un método de detección bicomponente que comprende:
 - a. proporcionar dos componentes de unión específica al analito no inmovilizados a concentraciones conocidas para realizar un método de detección bicomponente en una solución que comprende poner dichos dos componentes de unión específica al analito en contacto con dicho analito para producir una señal que depende de la concentración de complejos bicomponente/analito formados en dicha solución,
 - b. proporcionar una curva de referencia de concentración del analito no biyectiva para dicho método de detección bicomponente que es una función matemática que refleja la dependencia de dicha señal de la concentración del analito,
 - c. preparar una o más diluciones de dicha muestra mediante el uso de factores de dilución definidos,
 - d. aplicar el método de detección bicomponente a la muestra y las una o más diluciones,
 - e. determinar la concentración del analito mediante el uso de dicha señal detectada en la muestra y en las una o más diluciones como una entrada de restricción para un ajuste matemático para dicha curva de referencia de concentración del analito no biyectiva a diferentes concentraciones del analito.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha curva de referencia de concentración del analito no biyectiva se obtiene experimentalmente al proporcionar una muestra de referencia de concentración del analito conocida, generar una serie de diluciones conocidas de dicha muestra de referencia y realizar para la muestra de referencia y cada dilución conocida de la misma dicho método de detección bicomponente.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha curva de referencia de concentración del analito no biyectiva se calcula analíticamente mediante la resolución del equilibrio químico y las ecuaciones de conservación de la masa o se proporciona mediante soluciones numéricas basadas en la provisión de constantes de disociación para cada uno de los dos componentes de unión específica al analito con el analito.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el analito se selecciona de un grupo que consiste de proteínas, péptidos, segmentos de ácido nucleico, carbohidratos, lípidos, anticuerpos (monoclonales o policlonales), antígenos, oligonucleótidos, proteínas receptoras específicas, ligandos, moléculas, células, microorganismos, así como también productos fragmentados o combinaciones de estos y/o en donde la muestra comprende dos o más tipos diferentes de analitos.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los dos componentes de unión específica al analito se seleccionan de un grupo que consiste de ácidos nucleicos, preferentemente oligonucleótidos de ARN y/o ADN, anticuerpos, péptidos, proteínas, aptámeros, polímeros impresos molecularmente, células o combinaciones de estos y/o en donde se usan dos o más pares de diferentes tipos de componentes de unión específica al analito.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método bicomponente comprende emplear un ensayo basado en proximidad para producir la señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito, en donde el ensayo basado en proximidad usa dos componentes de unión específica al analito que producen una señal detectable en dependencia de su proximidad.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método bicomponente comprende emplear un ensayo de transferencia de energía de resonancia, preferentemente un ensayo de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) o un ensayo de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), un ensayo de complementación de proteínas (PCA), Alphascreen o un ensayo de proximidad marcado con ADN, preferentemente un ensayo de ligadura de proximidad (PLA) o un ensayo de extensión de proximidad (PEA).
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método de detección bicomponente comprende emplear un ensayo compartimentado para producir una señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito, en donde la señal refleja la presencia de dichos dos componentes de unión específica al analito en un solo compartimiento, en donde el ensayo compartimentado emplea preferentemente un método de gotita de emulsión, en donde cada gotita en la emulsión representa un compartimiento separado, con mayor preferencia en donde el ensayo compartimentado es un acoplamiento de emulsión.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se determinan múltiples analitos en paralelo.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método de detección bicomponente comprende emplear un método analítico basado en el recuento molecular absoluto y/o en donde el método de detección bicomponente comprende emplear un ensayo de PCR digital en gotitas.

- 5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método de detección bicomponente comprende el uso de componentes de unión específica al analito asociados con marcadores de ácido nucleico amplificables únicos y emplea un ensayo compartimentado, en donde se realiza una amplificación de ácido nucleico para cada compartimiento mediante el uso de productos de amplificación etiquetados con fluorescencia.
- 10 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método de detección bicomponente comprende el uso de múltiples componentes de unión específica al analito que comprenden códigos de barras de identificador molecular único - molécula de ácido nucleico - y emplea un ensayo compartimentado, en donde se realiza una amplificación de ácido nucleico para cada compartimiento que produce códigos de barras de ácido nucleico de identificador molecular único - molécula de ácido nucleico - enlazados, los compartimientos se reúnen en un grupo común y se usa una técnica de secuenciación de ácido nucleico paralela para producir la señal dependiente de la concentración de complejos bicomponente/analito.
- 15 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 11 o 12, en donde la técnica de secuenciación de ácido nucleico paralela es una técnica de secuenciación de próxima generación (NGS).
- 20 14. Un kit para determinar la concentración de un analito mediante el uso de un método de detección bicomponente:
- 25 a. dos o más componentes de unión específica al analito no inmovilizados a concentraciones conocidas para realizar un método de detección bicomponente que comprende poner dichos dos componentes de unión específica al analito en contacto con una solución que contiene dicho analito para producir una señal que depende de la concentración de complejos bicomponente/analito formados en dicha solución,
- 30 b. datos de referencia sobre una curva de referencia de concentración de analito no biyectiva para dicho método de detección bicomponente, que es una función matemática que refleja la dependencia de dicha señal de la concentración de analito, en donde la curva de referencia de concentración de analito no biyectiva presenta un segmento monótono creciente y uno decreciente,
- 35 c. opcionalmente instrucciones para preparar una o más diluciones de dicha muestra y aplicar el método de detección bicomponente a la muestra y las una o más diluciones,
- 40 d. un programa de computadora cuando se ejecuta en un ordenador configurado para realizar las etapas computacionales de comparación de señales detectadas en la muestra y en una o más diluciones con la curva de referencia de concentración del analito no biyectiva para determinar la concentración del analito en la muestra.

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

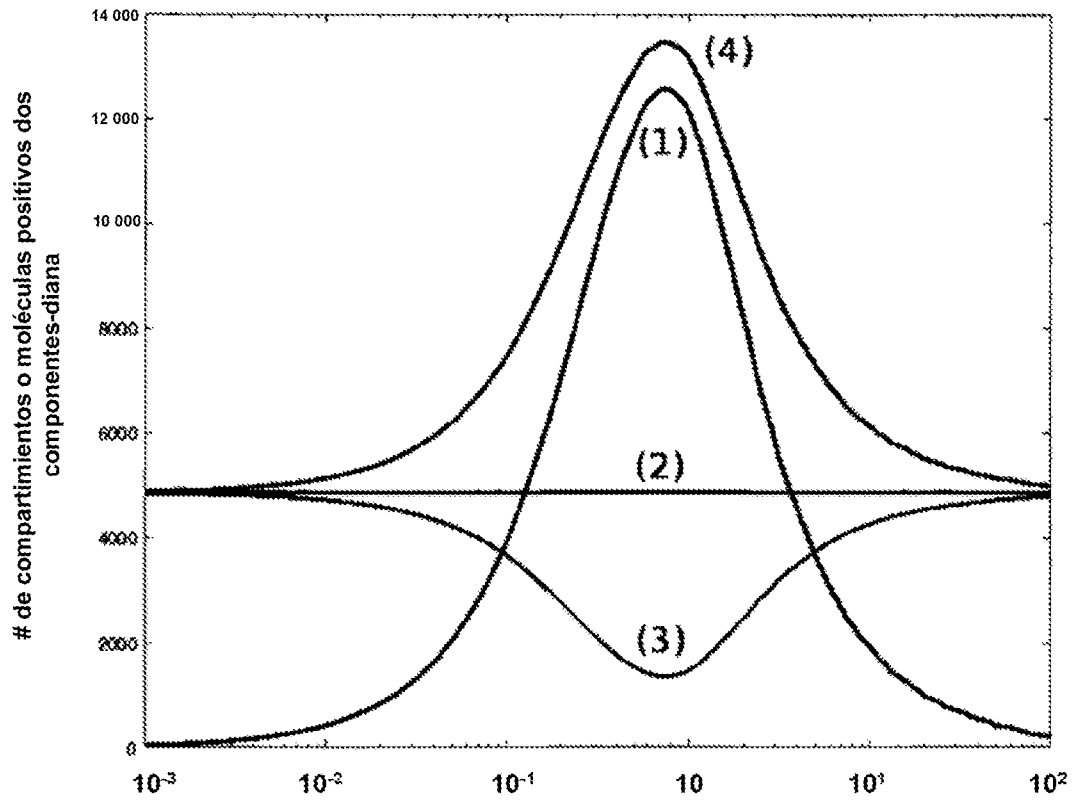


Figura 2

