

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 942 134**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6837 (2008.01)

C40B 30/04 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2019 PCT/US2019/051895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2020 WO20068548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2019 E 19867543 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2023 EP 3856927**

54 Título: **Composiciones, kits y métodos para ensayos multiplex para corregir la interferencia de biotina en mediciones de analitos diana**

30 Prioridad:

25.09.2018 US 201862735905 P

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

30.05.2023

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

WEI, TIE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 942 134 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

Composiciones, kits y métodos para ensayos multiplex para corregir la interferencia de biotina en mediciones de analitos diana

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas/declaración de incorporación por referencia

La solicitud en cuestión reclama el beneficio bajo la disposición 35 USC § 119(e) de la solicitud provisional de EE. UU. Núm. 62/735,905, presentada el 25 de septiembre de 2018.

Antecedentes de la invención

Los reactivos de los ensayos de diagnóstico a menudo incluyen conjugados de anticuerpos u otras moléculas pequeñas de fármacos con haptenos, como biotina y fluoresceína. La estrecha unión de estos haptenos a moléculas de proteína grandes (p. ej., avidina/estreptavidina para biotina y anti-FITC para fluoresceína) que están recubiertas en un soporte o superficie sólida proporciona una manera conveniente de inmovilizar el conjugado hapteno-anticuerpo o hapteno-fármaco en el soporte/superficie sólida.

La biotina es bien conocida en la técnica por su uso como complemento alimenticio; por ejemplo, la biotina se utiliza para promover el crecimiento saludable del cabello y las uñas y para tratar diversas enfermedades. Dado este uso, se pueden encontrar niveles significativos de biotina en muestras biológicas, como (pero no limitadas a) sangre. Dado que la biotina se usa en muchos ensayos de diagnóstico (por ejemplo, para recubrir soportes sólidos), los niveles altos de biotina en las muestras de prueba pueden interferir con las señales del ensayo en cualquier ensayo en el que se empleen componentes de ensayo biotinilados. Esto es particularmente cierto para ensayos como los que se encuentran en el sistema de inmunoensayo ADVIA CENTAUR® de Siemens, el sistema químico integrado DIMENSION EXL™ y el sistema DIMENSION VISTA® LOCI® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY), donde se espera que los componentes de ensayo biotinilados se unan a soportes sólidos recubiertos con estreptavidina.

Debido a que se observa interferencia en varios métodos de ensayo a diferentes concentraciones de biotina, los niveles de biotina presentes en las muestras de pacientes deben cuantificarse para determinar si las muestras son adecuadas para su uso en ensayos particulares. Sin embargo, la mayoría de los ensayos de biotina actualmente disponibles tienen rangos estrechos (es decir, 0-50 ng/ml) que no son adecuados para detectar el amplio rango dinámico de concentraciones de biotina que normalmente se encuentran en muestras de pacientes reales (es decir, 0-1500 ng/ml).

Usando la biotina como ejemplo, hay tres formas de mitigar el problema de la interferencia del hapteno. Uno es utilizar un reactivo preformado, es decir, un componente de ensayo biotinilado está "pre-enlazado" con el soporte sólido recubierto de estreptavidina durante la producción del reactivo. Debido a la estrecha unión y la lenta tasa de separación entre la estreptavidina y la biotina, la sustitución de la biotina ya unida de la estreptavidina por la biotina entrante en la muestra de un paciente no es un proceso predominante. La segunda forma es aumentar los sitios de unión de estreptavidina en el soporte sólido, de modo que haya sitios de unión adicionales disponibles para las moléculas de biotina de la muestra además de los componentes biotinilados del ensayo. La tercera forma es la combinación de las dos anteriores. Sin embargo, ninguna de estas tres estrategias resuelve realmente el problema de la interferencia de biotina a menos que se evite por completo el uso de biotina-estreptavidina como componentes activos del ensayo. Otro problema importante con todas las soluciones anteriores es que los componentes del ensayo están involucrados en la prevención de interferencias, y esto puede afectar fácilmente la magnitud de la señal del ensayo en sí.

La patente de EE.UU. Núm. 5.212.063 enseña el uso de partículas poliméricas con un núcleo de unión a biotina y una capa de cobertura de proteína, carbohidrato o copolímero con el fin de filtrar la biotina libre, pero no filtra biotina conjugada con moléculas grandes. Este enfoque puede ser efectivo para algunos formatos de ensayo, pero también introduce partículas que pueden generar absorbancia adicional que podría interferir con las señales del ensayo.

El campo del diagnóstico médico utiliza muchas formas diferentes de tecnologías de ensayo. Un ejemplo de un ensayo utilizado comercialmente es la tecnología de ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI®, por sus siglas en inglés). El ensayo de quimioluminiscencia avanzada LOCI® se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Núm. 5.340.716 (Ullman et al.). La tecnología LOCI® actualmente disponible tiene una alta sensibilidad y utiliza varios reactivos. En particular, el ensayo LOCI® requiere que dos de estos reactivos (denominados "sensibead" y "chemibead") estén retenidos por otros reactivos de ensayo de pareja de unión específicos de manera que la perla de sensibilidad o "sensibead" y la quimioperla o "chemibead" estén muy cerca uno del otro para lograr una señal. Tras la exposición a la luz a una longitud de onda determinada, sensibilbead libera oxígeno singlete y, si las dos perlas están muy próximas, el oxígeno singlete se transfiere a la quimioperla; esto provoca una reacción química que da como resultado que la quimioperla emita una luz que se puede medir en una longitud de onda diferente.

Sin embargo, no hay ensayos de biotina disponibles en el formato LOCI®, ni ningún método actualmente disponible que elimine la interferencia causada por la biotina en la muestra en el formato LOCI®.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de ensayos nuevos y mejorados para detectar y corregir la interferencia de

biotina que superen las desventajas y defectos de la técnica anterior. Es a dichos ensayos, así como a los kits y dispositivos de microfluidos que los contienen y los métodos para usarlos, a los que se dirige la presente descripción.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 representa esquemáticamente los componentes del ensayo multiplex utilizados en una realización no limitante de la presente descripción.

La FIG. 2 representa esquemáticamente complejos formados a partir de los componentes del ensayo multiplex de la FIG. 1, dependiendo de si la biotina y un analito diana están presentes o no en una muestra de prueba.

La FIG. 3 representa esquemáticamente dos realizaciones no limitantes de perlasceptoras que se pueden utilizar de acuerdo con la presente divulgación (panel superior) y un ensayo multiplex realizado de acuerdo con la presente divulgación (panel inferior).

La FIG. 4 representa una secuencia de ensayo para una realización no limitante del ensayo multiplex construido de acuerdo con la presente descripción, en el que se van a medir dos analitos, Proteína X (PrX) y biotina. S, muestra. S biotina, muestra de biotina. Ab1, primer anticuerpo contra PrX. Ab2, segundo anticuerpo contra PrX. CB, chemibead o quimioperla. SB, sensibead o perla de sensibilidad ":" representa el enlace.

La FIG. 5 representa gráficamente cómo la señal de biotina puede traducirse en una concentración ([biotina] ng/ml) mediante una calibración adecuada.

La FIG. 6 representa gráficamente varios escenarios relacionados con la interferencia de biotina con una señal de analito diana y la corrección de la misma en una realización no limitante del ensayo multiplex según la presente divulgación.

La FIG. 7 contiene una tabla que proporciona un escenario hipotético de datos obtenidos por el ensayo multiplex de acuerdo con la presente descripción y demuestra el porcentaje de interferencia por parte de la biotina de la muestra en la señal del analito diana.

La FIG. 8 contiene un método no limitante mediante el cual la señal del analito diana puede corregirse basándose en la señal o concentración de biotina de la muestra.

La FIG. 9 contiene otro método no limitante mediante el cual la señal del analito diana puede corregirse basándose en la señal o concentración de biotina de la muestra.

Descripción detallada de la invención

Antes de explicar en detalle al menos una realización de la presente descripción a modo de ejemplo de lenguaje y resultados, debe entenderse que la presente descripción no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición del conjunto de componentes como se muestran en la siguiente descripción. La presente divulgación es susceptible de otras realizaciones o de ser practicada o llevada a cabo de varias maneras. Como tal, se pretende que el lenguaje utilizado en este documento tenga el alcance y el significado más amplios posibles; y las realizaciones pretenden ser ejemplares, no exhaustivas. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen fines descriptivos y no deben considerarse como limitantes.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y médica descritas en este documento son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas y análisis químicos.

Todas las patentes, solicitudes de patentes publicadas y publicaciones que no son de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a la que se refiere la presente descripción.

Todos los artículos, composiciones, kits y/o métodos descritos en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Aunque los artículos, composiciones, kits y/o métodos se han descrito en términos de realizaciones particulares, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los artículos, composiciones, kits y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos de los métodos aquí descritos.

Tal como se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

El uso del término "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la descripción puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". Como tal, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" puede referirse a uno o más compuestos, dos o más compuestos, tres o más compuestos, cuatro o más compuestos o un mayor número de compuestos. El término

"pluralidad" se refiere a "dos o más".

El uso del término "al menos uno" se entenderá que incluye uno, así como cualquier cantidad más de uno, incluyendo pero no limitado a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" podrá extenderse hasta 100 o 1000 o más, según el término al que se adjunte; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" incluye X solo, Y solo y Z solo, así como cualquier combinación de X, Y y Z. El uso de la terminología de números ordinales (es decir, "primero", "segundo", "tercero", "cuarto", etc.) tiene el único propósito de diferenciar entre dos o más elementos y no implica ninguna secuencia, orden o importancia de un elemento sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar un "y/o" inclusivo a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas únicas o a menos que las alternativas sean mutuamente excluyentes. Por ejemplo, una condición "A o B" se cumple con cualquiera de los siguientes: A es verdadero (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es verdadero (o presente), y tanto A como B son verdaderos (o presentes).

Como se usa aquí, cualquier referencia a "una realización", "la realización", "algunas realizaciones", "un ejemplo", "por ejemplo" o "el ejemplo" significa que un elemento, característica, estructura, o la característica descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización. La aparición de la frase "en algunas realizaciones" o "un ejemplo" en varios lugares de la descripción no se refiere necesariamente a la misma realización, por ejemplo. Además, todas las referencias a una o más realizaciones o ejemplos deben interpretarse como no limitantes de las reivindicaciones.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para una composición/aparato/dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del ensayo. Por ejemplo, pero sin limitación, cuando se utiliza el término "aproximadamente", el valor designado puede variar en más o menos veinte por ciento, o quince por ciento, o doce por ciento, u once por ciento, o diez por ciento, o nueve por ciento, u ocho por ciento, o siete por ciento, o seis por ciento, o cinco por ciento, o cuatro por ciento, o tres por ciento, o dos por ciento, o uno por ciento del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados y según se entiende por personas con conocimientos ordinarios en la materia.

Como se usa en esta descripción y reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma del verbo comprender, como "comprendiendo" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma del verbo tener, como "teniendo" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma del verbo incluir, como "incluye" e "incluyen"), o "conteniendo" (y cualquier forma del verbo contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales no enumerados o pasos del método.

El término "o combinaciones de los mismos" como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contengan repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la materia entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto demuestre lo contrario.

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre completamente o que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre en gran medida o grado. Por ejemplo, cuando se asocia con un evento o circunstancia en particular, el término "sustancialmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre al menos el 80 % del tiempo, o al menos el 85 % del tiempo, o al menos el 90 % del tiempo, o al menos el 95 % del tiempo. El término "sustancialmente adyacente" puede significar que dos artículos son 100 % adyacentes entre sí, o que los dos artículos están muy cerca uno del otro, pero no 100 % adyacentes, o que una parte de uno de los dos artículos no está 100 % adyacente al otro elemento, pero está muy cerca del otro elemento.

Como se usa en el presente documento, las frases "asociado con" y "acoplado a" incluyen tanto la asociación/unión directa de dos restos entre sí como la asociación/unión indirecta de dos restos entre sí. Los ejemplos no limitantes de asociaciones/acoplamientos incluyen la unión covalente de un resto a otro resto ya sea por un enlace directo o a través de un grupo espaciador, la unión no covalente de un resto a otro resto ya sea directamente o por medio de un par de miembros de unión específica unidos a los restos, la incorporación de un resto en otro resto tal como disolviendo un resto en otro resto o mediante síntesis, y revistiendo un resto sobre otro resto, por ejemplo.

Los términos "análogo" y "derivado" se usan aquí indistintamente y se refieren a una sustancia que comprende el mismo esqueleto de carbono básico y la misma funcionalidad de carbono en su estructura que un compuesto dado, pero también puede contener una o más sustituciones. Se entenderá que el término "sustitución" como se usa en este documento se refiere al reemplazo de al menos un sustituyente en un compuesto con un resto R. En ciertas realizaciones no limitantes, R puede incluir H, hidroxilo, tiol, un halógeno seleccionado de fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro, un compuesto C1-C4

- seleccionado de uno de los siguientes: alquilo lineal, ramificado o cíclico, alquenilo opcionalmente sustituido y lineal ramificado o cíclico, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan de uno o más alquenilalquilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilalquilo, arilalquilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido donde los sustituyentes opcionales se seleccionan de uno o más de alquenilalquilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquenilalquilo, arilalquilo, alquilarilo, heteroarilalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquenilalquilo opcionalmente sustituido, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo, fenilo, ciano, hidroxilo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi, alquiltio, amino, -NH (alquilo), -NH(cicloalquil)₂, carboxi y -C(O)-alquilo.
- Se entenderá que el término "muestra", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tipo de muestra biológica que pueda utilizarse de acuerdo con la presente descripción. Los ejemplos de muestras biológicas fluidicas que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitadas a, sangre entera o cualquier porción de la misma (es decir, plasma o suero), orina, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), piel, líquido intestinal, líquido intraperitoneal, fluido quístico, sudor, fluido intersticial, fluido extracelular, lágrimas, moco, lavado de vejiga, semen, heces, fluido pleural, fluido nasofaríngeo, combinaciones de los mismos y similares.
- El término "pareja de unión específico", como se usa en particular (pero no de manera limitante) en el presente documento en los términos "pareja de unión específico de biotina" o "pareja de unión específico del analito diana", se entenderá que se refiere a cualquier molécula capaz de asociarse específicamente con la biotina o el analito diana, respectivamente. Por ejemplo, pero sin limitarse a ello, la pareja de unión puede ser un anticuerpo, un receptor, un ligando, aptámeros, polímeros impresos molecularmente (es decir, matrices inorgánicas), combinaciones o derivados de los mismos, así como cualquier otra molécula capaz de una unión específica a la biotina o al analito diana, respectivamente.
- El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio y se refiere, por ejemplo, a anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos y conjugados de los mismos que exhiben la actividad biológica deseada de unión al analito (como, pero sin limitarse a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, anticuerpos monocatenarios y otros fragmentos de anticuerpos y conjugados de los mismos que retienen al menos un porción de la región variable de un anticuerpo intacto), proteínas o péptidos sustitutos del anticuerpo (es decir, proteínas/péptidos de unión diseñados) y combinaciones o derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).
- El término "hapteno", como se usa en el presente documento, se refiere a un pequeño determinante antigénico proteico o no proteico (o "epítipo") que es capaz de ser reconocido por una pareja de unión específico del analito diana, tal como (pero no limitado a) un anticuerpo. Se entenderá que el término "polihapteno", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula sintética que contiene múltiples epítipos/determinantes antigénicos unidos a la misma.
- Un "analito" es una macromolécula que es capaz de ser reconocida por una pareja de unión específica del analito, tal como (pero no limitado a) un anticuerpo. Tanto los analitos como los haptenos comprenden al menos un determinante antigénico o "epítipo", que es la región del antígeno o hapteno que se une a la pareja de unión específica del analito (es decir, el anticuerpo). Por lo general, el epítipo de un hapteno es la molécula completa.
- Ciertas realizaciones no limitantes de la presente divulgación están dirigidas a ensayos multiplex para la detección tanto de biotina como de analitos diana en muestras, así como kits que los contienen y métodos de uso de los mismos. En algunas realizaciones del ensayo, los miembros del sistema productor de señales (sps) comprenden un sensibilizador como, por ejemplo, un fotosensibilizador, y dos o más composiciones de moléculas quimioluminiscentes-fluorescentes (donde una primera composición quimioluminiscente genera una señal relacionada con la presencia de biotina, mientras que al menos una segunda composición quimioluminiscente genera una señal relacionada con la presencia de un analito diana); en estas realizaciones de ensayo, la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la(s) composición(es) quimioluminiscente(s), generando así una señal detectable que se relaciona con la cantidad de analito diana unido y biotina unida que se detectan. Una realización ejemplar (pero no limitante) de una plataforma de ensayo en la que se puede basar la presente descripción es el ensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI®; Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). El ensayo LOCI® se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Núm. 5.340.716 (Ullman et al.).
- Cualquier analito diana capaz de detectarse a través de los formatos de ensayo descritos o contemplados de otro modo en el presente documento puede detectarse mediante los ensayos multiplex de la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de analitos diana incluyen: Procalcitonina (PCT), BNP, NT-proBNP, dímero D, CKMB, mioglobina, mieloperoxidasa, ST2, hCG, LH, FSH, iPTH, TSH, fT₄, T₄, PSA, fPSA y cPSA, y combinaciones de los mismos.
- Ciertas realizaciones no limitantes de la presente descripción se refieren a un kit para realizar ensayos multiplex que utilizan un sistema de detección quimioluminiscente para determinar la concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra. El kit incluye: (a) perlas (en lo sucesivo también denominadas como "primera quimioperla") que tienen biotina o un análogo de la misma unida directa o indirectamente, un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete, así como una primera molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado; (b) perlas (en lo sucesivo también abreviadas como "segunda quimioperla") que

tienen una primera pareja de unión específica del analito para un analito diana unido directa o indirectamente al mismo, y que contienen un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete, así como una segunda molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, en el que la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente a la de la molécula fluorescente de (a); (c) una segunda pareja de unión específica de analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítipo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica de analito de (b); y (d) perlas (en lo sucesivo también abreviadas como "perlas de sensibilidad") que comprenden un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tienen una pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente al mismo.

En ciertas realizaciones no limitantes, el kit incluye además (e) una composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo, así como una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, en donde la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y (f) una segunda pareja de unión específica de analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítipo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica de analito.

Un compuesto quimioluminiscente (quimioluminiscente) es un compuesto que es químicamente activado y, como resultado de dicha activación, emite luz a una cierta longitud de onda. Los ejemplos de quimioluminiscentes, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen: olefinas capaces de reaccionar con oxígeno singlete o un peróxido para formar hidroperóxidos o dioxetanos, que pueden descomponerse en cetonas o derivados de ácido carboxílico; dioxetanos estables que pueden descomponerse por acción de la luz; acetilenos que pueden reaccionar con el oxígeno singlete para formar dicetonas; hidrazonas o hidrazidas que pueden formar compuestos azo o carbonilos azo tales como (pero sin limitarse a) luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los quimioluminiscentes provocan directa o indirectamente la emisión de luz.

En ciertas realizaciones, el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete puede ser una sustancia que sufre una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión de luz simultánea o posterior. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente puede ser excitada directamente por el compuesto quimioluminiscente activado; alternatively, la composición puede comprender además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado.

Un sensibilizador es una molécula, normalmente un compuesto, que genera un intermedio reactivo tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, para la activación de un compuesto quimioluminiscente. En algunas realizaciones no limitantes, el sensibilizador es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores que pueden activarse químicamente (mediante, por ejemplo, enzimas y sales metálicas) incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o sin activación por una fuente de luz externa. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos compuestos catalizan la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno singlete y agua. Los ejemplos no limitantes de otras sustancias y composiciones sensibilizadoras incluyen: óxidos de metales alcalinotérreos Ca, Sr y Ba; derivados de elementos de los grupos 3A, 4A, 5A y 6A en configuración d⁰; óxidos de actínidos y lantánidos; y oxidantes ClO⁻, BrO⁻, Au³⁺, IO₃⁻ e IO₄⁻; y en particular, iones de molibdato, peroxomolibdato, tungstato y peroxotungstato, y acetronitrilo. Las siguientes referencias proporcionan una divulgación adicional con respecto a las sustancias y composiciones sensibilizantes que también caen dentro del alcance de la presente divulgación: Aubry, J. Am. Chem. Soc., 107:5844-5849 (1985); Aubry, J. Org. Chem., 54:726-728 (1989); Böhme and Brauer, Inorg. Chem., 31:3468-3471 (1992); Niu and Foote, Inorg. Chem., 31:3472-3476 (1992); Nardello et al., Inorg. Chem., 34:4950-4957 (1995); Aubry and Bouttemy, J. Am. Chem. Soc., 119:5286-5294 (1997); and Almeida et al., Anal. Chim. Acta, 482:99-104 (2003).

También se incluyen dentro del alcance de los fotosensibilizadores los compuestos que no son verdaderos sensibilizadores pero que al ser excitados por calor, luz, radiación ionizante o activación química liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros de esta clase de compuestos incluyen, por ejemplo (pero sin limitarse a), los endoperóxidos tales como endoperóxido de 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno; 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido; y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de la luz por parte de estos compuestos libera oxígeno singlete.

Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la activación de un compuesto fotoactivo, por ejemplo, mediante la generación de oxígeno singlete mediante excitación con luz. Los fotosensibilizadores son fotoactivables e incluyen, por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos, y normalmente son compuestos formados por átomos unidos covalentemente, normalmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. Los compuestos deben absorber luz en el rango de longitud de onda de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 1.100 nm, tal como (pero no limitado a) un rango de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 1.000 nm o un rango de aproximadamente 450 nm a 950 nm, con un coeficiente de extinción en su máxima absorbancia superior a 500 M⁻¹ cm⁻¹, o superior a 5.000 M⁻¹ cm⁻¹, o superior a 50.000 M⁻¹ cm⁻¹, a la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores deben ser relativamente fotoestables y es posible que no reaccionen de manera eficiente con el oxígeno singlete. Los ejemplos de fotosensibilizadores, a modo de

ilustración y no de limitación, incluyen: acetona; benzofenona; 9-tioxantona; eosina; 9,10-dibromoontraceno; azul de metileno; metalo-porfirinas tales como (pero no limitadas a) hematoporfirina; ftalocianinas; clorofilas; rosa de bengala; y buckminsterfullereno; así como derivados de estos compuestos.

- 5 Los ejemplos particulares no limitantes de compuestos quimioluminiscentes y fotosensibilizadores que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción se exponen en la patente de EE.UU. Núm. 5.340.716 (Ullman, et al.).

10 Cualquier pareja de unión específica del analito diana conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento puede utilizarse de acuerdo con la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de parejas de unión específicas de analitos para analitos diana incluyen un anticuerpo, un receptor, un ligando, un aptámero, un polímero impreso molecular (es decir, matriz inorgánica) y cualquier combinación o derivado de los mismos, así como cualquier otra molécula capaz de unirse específicamente al analito diana. En un ejemplo particular (pero no limitante), cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas de analito de (a) y (b) es un anticuerpo contra el analito diana. Asimismo, cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas de analito de (e) y (f), si están presentes, pueden ser un anticuerpo contra el segundo analito diana, en una realización particular (pero no limitante).

20 Cualquier pareja de unión específica de biotina conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento puede utilizarse de acuerdo con la presente descripción. En ciertas realizaciones no limitantes, la pareja de unión específica de biotina es un anticuerpo contra la biotina. En otras realizaciones no limitantes, la pareja de unión específica de biotina es avidina o un análogo de la misma.

25 Cualquier análogo de avidina conocido en la técnica o contemplado de otro modo en este documento puede utilizarse de acuerdo con la presente descripción, siempre que la avidina o el análogo de avidina sea: (1) capaz de asociarse con el sensibilizador; (2) capaz de unirse a la pareja de unión específica del analito biotinilada; y (3) capaz de unirse a la biotina que pueda estar presente en una muestra. Los ejemplos no limitantes de análogos de avidina que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción incluyen los descritos en Kang et al. (J Drug Target (1995) 3:159-65). Ejemplos particulares no limitantes de análogos de avidina incluyen avidina, estreptavidina, traptavidina, avidina neutra, avidina Neutralite, Neutravidina, Lite-avidina, avidina succinilada, otras formas de avidina modificada o manipulada genéticamente, ésteres, sales y/o derivados de cualquier de los anteriores, y similares.

30 En ciertas realizaciones no limitantes, el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente al mismo.

35 Cualquier molécula fluorescente conocida en la técnica que sea capaz de ser excitada por el compuesto quimioluminiscente activado y emita luz a una longitud de onda detectable particular puede utilizarse de acuerdo con la presente divulgación como las moléculas fluorescentes de (a) y (b) (así como (e), si está presente), siempre que las señales producidas por cada molécula fluorescente sean detectables a partir de las señales producidas por las otras moléculas fluorescentes utilizadas. Es decir, la molécula fluorescente de (a) debe emitir luz a una longitud de onda lo suficientemente diferente de la longitud de onda a la que la molécula fluorescente de (b) emite luz para que las dos señales puedan distinguirse cuando se detectan simultáneamente. En un ejemplo particular (pero no limitante), cada molécula fluorescente utilizada de acuerdo con la presente descripción se selecciona independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio. Por ejemplo (pero no como limitación), con respecto a la generación de dos o tres señales que pueden distinguirse entre sí cuando se detectan simultáneamente, el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm, el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm, y el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.

50 Los componentes/reactivos de ensayo de las composiciones/kits/dispositivos microfluídicos/métodos se pueden proporcionar en cualquier forma que les permita funcionar de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, pero sin limitarse a, cada uno de los reactivos puede proporcionarse en forma líquida y desecharse a granel y/o en forma de alícuota única dentro del kit. Alternativamente, en una realización particular (pero no limitante), uno o más de los reactivos pueden disponerse en el kit en forma de una sola alícuota de reactivo liofilizado. El uso de reactivos secos en dispositivos de microfluidos se describe en detalle en la Patente de EE.UU. Núm. 9.244.085 (Samproni).

55 Además de los componentes/reactivos del ensayo descritos arriba en detalle en el presente documento, los kits pueden contener además otro(s) reactivo(s) para realizar cualquiera de los ensayos particulares descritos o contemplados de otro modo en el presente documento. La naturaleza de este(estos) reactivo(s) adicional(es) dependerá(n) del formato de ensayo particular, y la identificación del mismo está bien dentro de la experiencia de un experto en la técnica; por lo tanto, no se considera necesaria una descripción adicional de los mismos. Además, los componentes/reactivos presentes en los kits pueden estar cada uno en recipientes/compartimentos separados, o varios componentes/reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes/compartimentos, según la reactividad cruzada y la estabilidad de los componentes/reactivos. Además, el kit puede incluir un dispositivo de microfluidos en el que se disponen los componentes/reactivos.

65 Las cantidades relativas de los diversos componentes/reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los componentes/reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante los métodos de ensayo y además optimicen sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas,

5 uno o más de los componentes/reactivos del kit se pueden proporcionar como un polvo seco, como un polvo liofilizado, y el kit puede incluir además excipiente(s) para la disolución de los reactivos secos; de esta manera, a partir de estos componentes se puede obtener una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con la presente divulgación. También se pueden incluir controles positivos y/o negativos con el kit. Además, el kit puede incluir además un conjunto de instrucciones escritas que explican cómo utilizar el kit. Un kit de esta naturaleza se puede usar en cualquiera de los métodos descritos o contemplados en este documento.

10 Ciertas realizaciones adicionales no limitantes de la presente divulgación están dirigidas a un dispositivo de microfluidos que incluye los componentes de cualquiera de los kits descritos anteriormente en el presente documento. En particular, ciertas realizaciones no limitantes incluyen un dispositivo de microfluidos para determinar la concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra. El dispositivo de microfluidos comprende (i) un canal de entrada a través del cual se aplica una muestra; y (ii) al menos un primer compartimento capaz de estar en comunicación fluidica con el canal de entrada. Los compartimentos de (ii) contienen: (a) una primera quimioperla que tiene al menos una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente, comprendiendo además la primera composición una molécula fluorescente que es excitada por el quimioluminiscente activado compuesto; (b) una segunda quimioperla que tiene al menos una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un analito diana unido directa o indirectamente al mismo, comprendiendo la segunda composición además una molécula fluorescente que se excita por el compuesto quimioluminiscente activado, donde la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente que la molécula fluorescente de (a); (c) una segunda pareja de unión específica de analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítipo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica de analito de (b); y (d) una perla de sensibilidad que comprende una composición que comprende un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene un pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente al mismo. En ciertas realizaciones particulares (pero no limitantes), el(los) compartimento(s) de (ii) contiene además al menos una tercera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y que tiene un segundo analito diana o un análogo del mismo unido directa o indirectamente al mismo, comprendiendo además la segunda composición una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, en donde la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b).

35 Cualquiera de los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete, sensibilizadores, moléculas fluorescentes, biotina o análogos de los mismos, analitos diana o análogos de los mismos y parejas de unión específicas del analito diana descritos arriba en detalle en el presente documento o contemplados de otro modo en el presente documento pueden utilizarse en los dispositivos de microfluidos de la presente divulgación.

40 Por ejemplo, en ciertas realizaciones particulares (pero no limitantes), los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete de (a) y (b) son sustancias que experimentan una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz.

En realizaciones particulares (pero no limitantes), el sensibilizador es un fotosensibilizador.

45 En realizaciones particulares (pero no limitantes), cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas de analito de (b) y (c) es un anticuerpo contra el analito diana.

En realizaciones particulares (pero no limitantes), la pareja de unión específica de biotina de (iii) es avidina o un análogo de la misma, o es un anticuerpo contra la biotina.

50 En realizaciones particulares (pero no limitantes), el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente al mismo.

55 En realizaciones particulares (pero no limitantes), las moléculas fluorescentes de (a) y (b) se seleccionan cada una independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio. Por ejemplo (pero no como limitación), el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm, el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm y el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.

60 En realizaciones particulares (pero no limitantes), los compartimentos de (ii) contienen además: (e) al menos una tercera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo, comprendiendo además la segunda composición una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, en el que la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y (f) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítipo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (e). En

una realización particular (pero no limitante), la molécula fluorescente de la tercera composición se selecciona del grupo formado por terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio.

En ciertas realizaciones no limitantes, todos los elementos (a)-(d) (y (e) y (f), cuando están presentes) de (ii) están presentes en el mismo compartimento. En realizaciones alternativas no limitantes, los elementos (a)-(d) (y (e) y (f), cuando están presentes) se dividen entre dos o más compartimentos.

El dispositivo puede estar provisto de cualquier disposición de los compartimentos y distribución de los diversos componentes entre ellos que permita que el dispositivo funcione de acuerdo con la presente descripción.

Cualquiera de los compartimentos del dispositivo de microfluidos puede sellarse para mantener los reactivos dispuestos en el mismo en un entorno sustancialmente hermético al aire hasta su uso; por ejemplo, los compartimentos que contienen reactivo(s) liofilizado(s) pueden sellarse para evitar cualquier reconstitución no intencional del reactivo. El canal de entrada y un compartimento, así como dos compartimentos, pueden describirse como "capaces de estar en comunicación fluidica" entre sí; esta frase indica que cada uno de los compartimentos aún puede estar sellado, pero que los dos compartimentos pueden tener un flujo de fluido entre ellos tras la perforación de un sello formado en ellos o entre ellos.

Los dispositivos de microfluidos de la presente descripción se pueden proporcionar con cualquier otra característica deseada conocida en la técnica o contemplada de otro modo en el presente documento. Por ejemplo, pero sin limitarse a, los dispositivos de microfluidos de la presente descripción pueden incluir además una cámara de lectura; la cámara de lectura puede ser cualquiera de los compartimentos que contienen los reactivos descritos anteriormente, o la cámara de lectura puede estar en comunicación fluidica con dicho compartimento. El dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos adicionales que contienen otras soluciones, tales como (pero no limitado a) soluciones de lavado, soluciones de dilución, excipientes, soluciones de interferencia, controles positivos, controles negativos, controles de calidad y similares. Estos compartimentos adicionales pueden estar en comunicación fluidica con uno o más de los otros compartimentos. Por ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos que contienen una solución de lavado, y estos compartimentos pueden ser capaces de estar en comunicación fluidica con cualquier otro compartimento del dispositivo. En otro ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimentos que contienen un excipiente para la disolución de uno o más reactivos secos, y los compartimentos pueden ser capaces de estar en comunicación fluidica con cualquier otro compartimento del dispositivo. En otro ejemplo más, el dispositivo de microfluidos puede incluir uno o más compartimentos que contienen una solución de dilución, y el compartimento o compartimentos pueden ser capaces de estar en comunicación fluidica con cualquier otro compartimento del dispositivo.

Además, cualquiera de los kits/dispositivos de microfluidos descritos o contemplados en este documento puede incluir más de un ensayo de analito diana multiplexado con el ensayo de biotina en un solo kit/dispositivo. Cuando están presentes múltiples ensayos de analitos diana, cada uno de los ensayos puede construirse y funcionar como se describe en el presente documento. Alternativamente, los ensayos de biotina y analito diana descritos en el presente documento pueden multiplexarse con cualquier otro ensayo de analito diana conocido en la técnica que pueda estar contenido en los kits/dispositivos de microfluidos de la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de otros ensayos que pueden multiplexarse con los ensayos divulgados y reivindicados en el presente incluyen BNP, NT-proBNP, dímero D, CKMB, Mioglobina, Mieloperoxidasa, ST2, PCT, hCG, LH, FSH, iPTH, TSH, fT4, T4, PSA, fPSA y cPSA, y combinaciones de los mismos.

Cuando múltiples ensayos de analitos diana están presentes en un solo dispositivo de microfluidos, se pueden conectar múltiples canales de entrada a la cámara de aplicación de la muestra. En determinadas realizaciones, una parte de la muestra puede pasar desde la cámara de aplicación de la muestra a los múltiples canales de entrada sin tener en cuenta el contenido de la misma. Alternativamente, la(s) estructura(s) pueden estar presentes en la cámara de aplicación de la muestra, los canales de entrada y/o la conexión entre ellos que permiten la separación de ciertos componentes de la muestra completa y la entrega de dichos componentes a los diferentes ensayos. Un ejemplo no limitante de un dispositivo de distribución de muestras que se puede utilizar de acuerdo con la presente descripción se describe en detalle en la Patente de EE.UU. Núm. 9.416.776 (Ledden, et al.).

Ciertas realizaciones no limitantes también se refieren a un método para detectar la presencia y/o concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra. El método comprende los siguientes pasos.

En el primer paso, una muestra sospechosa de contener biotina y al menos un analito diana adicional se combina, ya sea de forma simultánea o total o parcialmente secuencial, con: (a) una primera quimioperla que comprende al menos una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente a la misma, comprendiendo además la primera composición una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado; (b) una segunda quimioperla que comprende al menos una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito de un analito diana unido directa o indirectamente al mismo, comprendiendo la segunda composición además una molécula fluorescente que se excita por el compuesto quimioluminiscente activado, en el que la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente que la molécula fluorescente de (a); (c) una segunda pareja de unión específica de

analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítopo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica de analito de (b); y (d) un exceso de una composición que comprende un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene una pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente al mismo.

5

En el segundo paso, los componentes se incuban juntos para permitir la unión de (b) y (c) al analito diana presente en la muestra, así como la unión de (c) a (d), en donde la unión indirecta de (b) a (d) (a través de (c) y el analito diana) da como resultado la formación de un complejo de analito diana en el que el sensibilizador se acerca mucho al compuesto quimioluminiscente. Además, (a) se une a (d) en ausencia de biotina en la muestra y da como resultado la formación de un complejo de biotina en el que el sensibilizador se acerca mucho al compuesto quimioluminiscente.

10

En el tercer paso, el sensibilizador se activa para generar oxígeno singlete, en el que la activación de los sensibilizadores presentes en el complejo de biotina y en el complejo de analito diana provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en cada complejo.

15

En el cuarto paso, la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el complejo de biotina se determina midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (a), donde la cantidad de biotina en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de luz emitida.

20

En el quinto paso, la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el complejo de analito diana se determina midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (b) para determinar la cantidad de analito diana en la muestra.

En el sexto paso, los segundos quintos pasos pueden repetirse opcionalmente, si se desea.

25

En el séptimo paso, el resultado del paso (5) se corrige basándose en cualquier interferencia de biotina detectada en el paso (4). Alternativamente, el resultado del paso (5) se marca como no confiable si la concentración de biotina detectada en el paso (4) está por encima de un nivel de umbral máximo.

30

En ciertas realizaciones no limitantes del método, el paso (1) comprende además combinar con los elementos (a)-(d): (e) al menos una tercera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo, comprendiendo además la tercera composición una molécula fluorescente que es excitada por el quimioluminiscente activado compuesto, en el que la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y (f) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítopo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (e). En este caso, el método puede comprender además los pasos de: (8) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el segundo complejo de analito diana midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (e) para determinar la cantidad de analito diana en la muestra; y (9) corregir el resultado del paso (8) en función de cualquier interferencia de biotina detectada en el paso (4) y/o marcar el resultado del paso (8) como no confiable si la concentración de biotina detectada en el paso (4) está por encima de un nivel de umbral máximo.

35

40

45

Cualquiera de los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete, sensibilizadores, moléculas fluorescentes, biotina o análogos de los mismos, analitos diana o análogos de los mismos y parejas de unión específicas del analito diana descritos en detalle en el presente documento anteriormente o contemplados de otro modo en el presente documento pueden utilizarse en los métodos de la presente divulgación.

50

Por ejemplo, en ciertas realizaciones particulares (pero no limitantes), los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete de (a) y (b) (y (e), cuando están presentes) son sustancias que experimentan una reacción química con singlete oxígeno para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz.

55

En realizaciones particulares (pero no limitantes), el sensibilizador es un fotosensibilizador, y la activación del sensibilizador en el paso (3) comprende la irradiación con luz (tal como, pero sin limitación, irradiación a aproximadamente 680 nm).

60

En realizaciones particulares (pero no limitantes), cada uno de la primera y segunda parejas de unión específicas del analito de (b) y (c) (así como (e) y (f), si están presentes) es un anticuerpo contra el analito diana.

En realizaciones particulares (pero no limitantes), la pareja de unión específica de biotina de (d) es avidina o un análogo de la misma, o es un anticuerpo contra la biotina.

65

En realizaciones particulares (pero no limitantes), el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente al mismo.

En realizaciones particulares (pero no limitantes), las moléculas fluorescentes de (a) y (b) (y (e), si están presentes) se seleccionan cada una independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio. Por ejemplo (pero no como limitación), el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm, el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm y el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.

Cualquier muestra para la que se desee un ensayo de presencia de biotina se puede utilizar como muestra de acuerdo con los métodos de la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de muestras incluyen una muestra biológica tal como, pero sin limitarse a, sangre completa o cualquier porción de la misma (es decir, plasma o suero), orina, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (LCR), piel, líquido intestinal, líquido intraperitoneal, líquido quístico, sudor, líquido intersticial, líquido extracelular, lágrimas, moco, lavado de vejiga, semen, heces, líquido pleural, líquido nasofaríngeo y combinaciones de los mismos. Ejemplos particulares no limitantes incluyen glóbulos enteros lisados y glóbulos rojos lisados.

Como se mencionó anteriormente, los diversos componentes del método se proporcionan en combinación (ya sea simultáneamente o secuencialmente). Cuando los diversos componentes del método se agregan secuencialmente, el orden de adición de los componentes puede variar; una persona experta en la materia puede determinar el orden particular deseado de adición de los diferentes componentes al ensayo. El orden de suma más simple, por supuesto, es sumar todos los materiales simultáneamente y determinar las señales producidas a partir de ellos. Alternativamente, cada uno de los componentes, o grupos de componentes, puede combinarse secuencialmente. En determinadas realizaciones, puede estar implicada una etapa de incubación posterior a una o más adiciones.

En una realización alternativa (pero no limitante), el paso (1) del método incluye primero combinar la muestra con la pareja de unión específica del analito diana biotinilada y la composición que comprende el sensibilizador e incubarla antes de agregar las composiciones que comprenden los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete. Alternativamente, el paso (1) del método puede incluir combinar primero la muestra con las composiciones que comprenden los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete e incubarlos antes de añadir la composición que comprende el sensibilizador. En esta última realización, la pareja de unión específica del analito diana biotinilada puede añadirse antes o después de la etapa de incubación.

Si bien se describe que las realizaciones particulares de la presente divulgación tienen el formato de ensayo LOCI®, se debe entender que la presente divulgación también está dirigida a otros formatos de ensayo (y kits, dispositivos de microfluidos y métodos para realizarlos) para los cuales se desea eliminar la interferencia de la biotina de la muestra. Por ejemplo (pero no a modo de limitación), la presente divulgación también incluye formatos de ensayo en los que se pueden utilizar diferentes moléculas de señal como (pero sin limitarse a) diferentes anticuerpos unidos a diferentes enzimas que generan señales en diferentes longitudes de onda en lugar de las composiciones que contienen compuestos quimioluminiscentes descritas aquí anteriormente.

Ejemplos

A continuación, se proporcionan ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente divulgación no se limita en su aplicación a los procedimientos de laboratorio, resultados y experimentación específicos divulgados en el presente documento. Más bien, los Ejemplos se proporcionan simplemente como una de varias realizaciones y pretenden ser ejemplares, no exhaustivos.

Ejemplo 1

La Fig. 1 representa los componentes de ensayo presentes en los kits y dispositivos de microfluidos y utilizados en los métodos de ciertas realizaciones no limitantes de la presente descripción. Estos componentes incluyen (de izquierda a derecha):

- (i) una primera quimioperla que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente y que contiene una primera molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado presente en la quimioperla;
- (ii) una perla de sensibilidad capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene una pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente a la misma;
- (iii) una pareja de unión específica del analito diana biotinilada; y
- (iv) una segunda quimioperla que tiene el analito diana o un análogo del mismo unido directa o indirectamente al mismo y que contiene una segunda molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado presente en la quimioperla.

La primera y segunda moléculas fluorescentes son diferentes entre sí y emiten luz en diferentes longitudes de onda; de esta manera, los ensayos tanto para la biotina como para el analito diana se pueden realizar simultáneamente en la misma reacción, ya que los complejos que contienen (i) se detectan a una longitud de onda diferente de los complejos que contienen (iv).

Cuando la biotina no está presente en la muestra, se forma un complejo entre (i) y (ii), como se muestra en el lado izquierdo del panel superior de la FIG. 2, y se genera una señal tras la activación del sensibilizador. Sin embargo, cuando la biotina está presente en la muestra, compite con (i) por unirse a (ii), como se muestra en el lado izquierdo del panel inferior de la FIG. 2. Así, la presencia de biotina en la muestra se detecta como una disminución en la señal detectada en la primera longitud de onda utilizada para detectar la luz emitida por la primera molécula fluorescente.

Además, en la misma reacción, (iii) se une al analito diana presente en la muestra, y luego (iv) se une a (iii), como se muestra en el lado derecho del panel inferior de la FIG. 2. Como tal, la presencia del analito diana en la muestra se detecta como un aumento en la señal detectada en la segunda longitud de onda utilizada para detectar la luz emitida por la segunda molécula fluorescente. Por el contrario, cuando no hay presente ningún analito diana, solo (iii) puede unirse a (ii), pero (iv) no es capaz de unirse al mismo y, por lo tanto, no se genera una señal en ausencia del analito diana (lado izquierdo de la parte superior del panel de la FIG. 2).

Si se detecta biotina en la muestra, entonces el resultado obtenido del ensayo del analito diana puede corregirse en función de cualquier interferencia de biotina detectada usando la primera quimioperla y/o marcarse como no confiable si la concentración de biotina detectada está por encima de un nivel de umbral máximo.

Además, los ensayos multiplex de la presente divulgación pueden adaptarse para detectar simultáneamente más de un analito diana además de la detección de la interferencia de biotina. Para cada analito diana adicional a detectar, se agregan componentes adicionales como (iii) y (iv), donde la molécula fluorescente presente en el componente adicional como (iv) difiere de la primera y segunda moléculas fluorescentes en que emite luz a una longitud de onda diferente y detectable por separado que la primera y la segunda moléculas fluorescentes. De esta manera, se pueden detectar dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más analitos diana en una sola reacción, siempre que las quimioperlas utilizadas para detectar cada una contengan diferentes moléculas fluorescentes que cada una emite luz en longitudes de onda diferentes y detectables por separado; como tal, el factor limitante en la cantidad de analitos diana que se pueden detectar en una sola reacción es la cantidad de moléculas fluorescentes disponibles que funcionan como se describe en este documento.

Ejemplo 2

Este Ejemplo proporciona un ensayo multiplexado para biotina y procalcitonina (PCT). La biotina se conjuga covalentemente con quimioperlas teñidas con terbio (FIG. 3, lado izquierdo del panel superior), y el anticuerpo de captura para PCT se conjuga covalentemente con quimioperlas teñidas con europio (FIG. 3, lado derecho del panel superior). El método multiplexado se calibra con un calibrador multianalito que contiene al menos tanto biotina como PCT. Las mismas perlas de sensibilidad de estreptavidina se utilizan para detectar tanto biotina como PCT.

Como se muestra en el panel inferior de la FIG. 3, las perlas de sensibilidad se activan mediante luz de excitación a 680 nm para generar oxígeno singlete, y el oxígeno singlete se difunde en ambos tipos de quimioperlas. Cuando forman un complejo con biotina, las quimioperlas de biotina emiten luz a 545 nm, que se mide como una señal de biotina. Cuando forma un complejo con PCT, la quimioperla PCT emite luz a 612 nm, que se mide como una señal de PCT. A continuación, se generan dos curvas de calibración a partir de las mediciones multiplex: una para biotina y otra para PCT.

La concentración de biotina medida en una muestra que usa terbio como molécula fluorescente está relacionada con la señal LOCI® de biotina medida usando europio como molécula fluorescente. La señal LOCI® a concentraciones variables de biotina medidas por europio se obtiene experimentalmente. La señal LOCI® de biotina por europio a cierta concentración de biotina puede entonces predecirse (extrapolarse) y, si es necesario, restarse posteriormente (si se observa un impacto positivo en la señal) o sumarse (si se observa un impacto negativo en la señal) para corregir los resultados del analito diana.

De esta manera, los resultados del ensayo del analito diana pueden corregirse utilizando la señal de biotina deducida de la medición de biotina de forma multiplex. Alternativamente, el resultado puede marcarse como no confiable si la concentración de biotina detectada está por encima de un nivel de umbral máximo.

Ejemplo 3

La FIG. 4 representa una secuencia de ensayo para una realización no limitante del ensayo multiplex construido de acuerdo con la presente divulgación, en el que se van a medir dos analitos: el analito diana (denominado en este ejemplo Proteína X (PrX)) y biotina. El ensayo para el analito diana PrX es un ensayo sándwich que requiere el uso de dos anticuerpos; el primer anticuerpo (Ab1) se recubre en quimioperlas (Ab1-CBs), y el segundo anticuerpo (Ab2) se biotinila. El ensayo de biotina utiliza un formato competitivo y requiere el uso de microesferas recubiertas de biotina (o análogos de biotina) (biotina-CBs). Ab1-CBs y Biotina-CBs contienen cada uno un tinte diferente, por lo que los complejos que contienen las dos quimioperlas pueden detectarse por separado en una sola reacción. Además, ambos ensayos utilizan las mismas perlas de sensibilidad (SB) recubiertas de estreptavidina.

Mientras que la FIG. 4 representa una secuencia de adición para este ensayo multiplex, dicha secuencia no debe considerarse limitante de la presente divulgación; de hecho, los diversos componentes del ensayo se pueden añadir en

cualquier orden y los dos ensayos se pueden realizar en cualquier secuencia deseada. Por tanto, el orden de adición y la secuencia de los ensayos mostrados en la FIG. 4 no limita el alcance de la presente descripción.

Una señal de biotina obtenida del ensayo de biotina descrito anteriormente puede traducirse en una concentración de biotina de muestra ([biotina] ng/ml) mediante la calibración adecuada utilizando una curva estándar, como se muestra en la FIG. 5 (y descrito en detalle en la Solicitud de EE.UU. Núm. 62/711,694 (presentada el 30 de julio de 2018). En ciertas realizaciones no limitantes, esta concentración se puede obtener antes de analizar el analito diana. La concentración de biotina calculada se puede utilizar en una de cuatro formas diferentes:

(1) Si la señal de biotina o la concentración de biotina calculada está por debajo de un umbral por encima del cual se sabe que la biotina comienza a interferir con el ensayo del analito diana, informe el resultado del ensayo del analito diana como normal.

(2) Si la señal de biotina o la concentración de biotina calculada está por encima de un nivel de umbral (es decir, por encima del nivel en el que se sabe que la biotina comienza a interferir con el análisis del analito diana), el resultado del analito diana se marca como no confiable y no es informado.

(3) Si la señal de biotina o la concentración de biotina calculada está por encima del nivel de umbral, utilice la concentración de biotina o el valor de la señal para corregir el resultado del ensayo del analito diana.

(4) Esta opción utiliza una combinación de (1), (2) y (3) - es decir, corregir el resultado del ensayo del analito diana afectado cuando el nivel de biotina está por encima del nivel umbral para afectar el ensayo del analito diana, pero sin exceder abrumadoramente el nivel umbral. Si la señal de biotina/concentración calculada detectada es baja (es decir, por debajo de un nivel de umbral, de modo que la biotina no interfiere con los resultados del analito diana), el resultado del analito diana se notifica como normal. Si la señal de biotina/concentración calculada detectada es demasiado alta (es decir, por encima de un nivel de umbral máximo) y la corrección no es posible, se debe activar una alarma y el resultado del analito diana se marca como no confiable.

La FIG. 6 representa gráficamente estos diversos escenarios relacionados con la interferencia de biotina con una señal de analito diana y la posible corrección de la misma. La curva superior indica los valores de ensayo obtenidos cuando no hay biotina presente. En la curva inmediatamente debajo de la curva superior, está presente una baja concentración de biotina que tiene un impacto mínimo en la señal del analito diana; en este escenario, no se necesita ninguna corrección del resultado del analito diana. En la siguiente curva, la concentración/señal de biotina supera un valor umbral por encima del cual la biotina interfiere con el ensayo del analito diana; en este escenario, se requiere la corrección del resultado del analito diana en función de la cantidad de interferencia de biotina detectada. Es decir, la concentración de biotina o el valor de la señal se utiliza para corregir el resultado del ensayo del analito diana. En la curva más baja, la concentración de biotina o valor de señal está significativamente por encima del valor umbral y supera un valor umbral máximo por encima del cual la concentración de analito diana ya no puede corregirse; por lo tanto, la cantidad de interferencia de biotina presente hace que se dispare una bandera para indicar que el resultado del analito diana no es confiable.

Con respecto a los componentes del ensayo, cuando no hay presencia de biotina o es mínima en la muestra, todas las quimioperlas de biotina se unen a las perlas de sensibilidad en la "etapa 1 de Rxn" de la FIG. 4; en este caso, no hay interferencia de biotina de la señal del analito diana. Cuando la biotina de la muestra es lo suficientemente alta, parte de la biotina de la muestra y de las quimioperlas de biotina no se unen a las perlas de sensibilidad añadidas en la "etapa 1 de Rxn" de la FIG. 4 y, por lo tanto, continuar con la reacción de unión de las perlas de sensibilidad en la "etapa 2 de Rxn" de la FIG. 4. Una cantidad suficiente de biotina en la muestra y el derrame de quimioperlas de biotina afectará la formación del complejo perlasdesensibilidad/biotina-anticuerpo1/analitodiana/anticuerpo2-quimioperlas (representado en la FIG. 4 como "SB::biotin-Ab1::PrX::Ab2-CB") en la "etapa 2 de Rxn" de la FIG. 4, lo que da como resultado una señal de analito diana reducida, como se muestra en el gráfico de la FIG. 6.

El panel superior de la FIG. 7 representa un escenario hipotético de la señal del analito diana (PrX) (en kiloconteos) obtenida por el ensayo multiplex de acuerdo con la presente divulgación en ausencia y presencia de biotina en la muestra. Como puede verse, a la concentración de biotina de muestra mínima arbitraria (10 ng/ml), no se observa ningún efecto sobre la señal del analito diana en ninguna de las concentraciones de analito diana ensayadas. Una vez que se pasa un umbral de concentración de biotina (como en los valores arbitrarios de 100 ng/ml y 500 ng/ml), se puede observar el efecto de la concentración de biotina de la muestra en la señal de PrX, y el valor de PrX se puede corregir posteriormente en función de la cantidad de interferencia de biotina presente. Sin embargo, una vez que se alcanza un nivel de umbral máximo (como el valor arbitrario de 3000 ng/ml), el efecto de la interferencia de biotina en la señal de PrX es tan grande que ya no es posible corregir la interferencia de biotina y, por lo tanto, la señal de PrX debe marcarse como no confiable. Tenga en cuenta que la divulgación del valor arbitrario de 3000 ng/ml es únicamente con fines ilustrativos; el alcance de la presente divulgación incluye cualquier valor de umbral calculado como se describe o contempla de otro modo en este documento, e incluye valores de umbral muy inferiores a 3000 ng/ml, así como valores de umbral muy superiores a 3000 ng/ml.

Mientras que el panel superior de la FIG. 7 representa la señal del analito diana real detectada, el panel inferior de la FIG. 7 representa el porcentaje de interferencia de la biotina en la muestra en la señal de PrX (basado en los valores del panel superior). Como puede verse, se observa un porcentaje diferente de interferencia a diferentes concentraciones de PrX, incluso cuando la concentración de biotina de la muestra permanece constante.

Las FIG. 8 y 9 ilustran dos métodos mediante los cuales se puede corregir la señal del analito diana basándose en la señal/concentración de biotina de la muestra detectada. El método ilustrado en la FIG. 9 utiliza todos los datos presentes en la FIG. 7, mientras que el método ilustrado en la FIG. 8 utiliza un subconjunto de los datos de la FIG. 7. Sin embargo, debe entenderse que estos dos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y cualquier método mediante el cual la señal del analito diana pueda corregirse en función de la señal/concentración de biotina de la muestra que será evidente para una persona con conocimientos en la materia puede utilizarse de acuerdo con la presente divulgación.

En la FIG. 8, el rectángulo sombreado en el panel superior (que se reproduce simplemente de la FIG. 7) se utiliza para corregir la señal de PrX utilizando la señal/concentración de biotina de la muestra para proporcionar una corrección más localizada de la señal de PrX. Como se muestra en el panel inferior de la FIG. 8, los valores del rectángulo sombreado se reorganizan y luego se ingresan en un software estadístico que realiza una regresión para obtener una ecuación de corrección basada en los datos del rectángulo sombreado. La ecuación de corrección de regresión obtenida en este ejemplo se muestra en la parte inferior de la FIG. 8.

Este paso se puede completar durante la co-calibración (ya sea en la fabricación o mediante la calibración del cliente) con calibradores que contienen tanto PrX como biotina en diversas concentraciones conocidas. La co-calibración de dos analitos crea una ecuación de superficie separada de las calibraciones para biotina y PrX. La calibración de un solo analito de biotina o PrX se realiza en ausencia del otro analito. Pero esta co-calibración se realiza cuando ambos analitos están presentes en concentraciones variables. El propósito de la co-calibración es obtener una ecuación de superficie donde la concentración de PrX (o la señal de PrX a 0 ng/ml de biotina) sirve como una función de la señal de PrX en presencia de interferencia de biotina).

La razón para usar subconjuntos de datos en el método de la FIG. 8 es para garantizar una regresión más precisa para la corrección a un nivel más local. Entonces, si se conocen la señal de PrX y la señal/concentración de biotina (ng/ml), entonces se puede calcular una concentración de PrX precisa (ng/ml).

Alternativamente, la concentración de PrX corregida se puede calcular realizando una regresión similar que utiliza la tabla completa o los intervalos de ensayo completos (biotina y PrX) obtenidos, como se muestra en la FIG. 9. En el lado izquierdo de la FIG. 9, los datos de la FIG. 7 simplemente se han reorganizado en la tabla que se muestra. Luego se realiza un análisis de regresión como se describe aquí anteriormente para obtener una ecuación de regresión, como se muestra en el lado derecho de la FIG. 9.

Independientemente del método particular que se utilice, los métodos de las FIGS. 8 y 9 producen ecuaciones de regresión para predecir la concentración del analito diana (PrX) en presencia de interferencia de biotina.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para realizar un ensayo multiplex que utiliza un sistema de detección quimioluminiscente para determinar la concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra, el kit comprende:
 - (a) una primera quimioperla

que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente a la misma; y
que contiene un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y
una primera molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado;
 - (b) una segunda quimioperla

que tiene una primer pareja de unión específica del analito para un analito diana unido directa o indirectamente a la misma; y
que contiene un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y
una segunda molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado,
donde la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente que la molécula fluorescente de (a);
 - (c) una segunda pareja de unión específica de analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítipo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica de analito de (b); y
 - (d) una perla de sensibilidad que comprende un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene un pareja de unión específica de biotina unida directa o indirectamente a la misma.
2. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete es una sustancia que experimenta una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, en el que preferiblemente el compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente al mismo, y
donde las moléculas fluorescentes de (a) y (b) se seleccionan cada una independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio, y donde:

el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm;
el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm; y
el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.
3. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, donde cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas del analito de (b) y (c) es un anticuerpo contra el analito diana, y donde la pareja de unión específica de biotina de (d) es avidina o un análogo de la misma, o un anticuerpo contra la biotina.
4. El kit de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - (e) una composición que comprende:

un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo; y
una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, en donde la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y
 - (f) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítipo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (e), donde el la molécula fluorescente de (e) se selecciona del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio.
5. Un dispositivo de microfluidos para determinar la concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra, el dispositivo de microfluidos comprende:
 - (i) un canal de entrada a través del cual se aplica una muestra;
 - (ii) al menos un primer compartimento capaz de estar en comunicación fluídica con el canal de entrada y que contiene:
 - (a) una primera quimioperla que tiene al menos una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente a la misma, comprendiendo además la primera composición una molécula fluorescente que es excitada

por el compuesto quimioluminiscente activado;

(b) una segunda quimioperla que tiene al menos una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un analito diana unido directa o indirectamente a la misma, comprendiendo además la segunda composición una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, donde la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente que la molécula fluorescente de (a); y

(c) una segunda pareja de unión específica de analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica de analito se une a un epítipo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica de analito de (b); y

(d) una perla de sensibilidad que comprende una composición que comprende un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene una pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente a la misma.

6. El dispositivo de microfluidos de acuerdo con la reivindicación 5, donde (a)-(d) están presentes en el mismo compartimento, o donde (a)-(d) están divididos entre dos o más compartimentos.

7. El dispositivo de microfluidos de acuerdo con la reivindicación 5, donde los compuestos quimioluminiscentes activados por oxígeno singlete de (a) y (b) son sustancias que experimentan una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, donde preferiblemente el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente, y donde las moléculas fluorescentes de (a) y (b) se seleccionan cada una independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio, donde:

el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm;

el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm; y

el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.

8. El dispositivo de microfluidos de acuerdo con la reivindicación 5, donde cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas del analito de (b) y (c) es un anticuerpo contra el analito diana, y donde la pareja de unión específica de biotina de (iii) es avidina o un análogo de la misma, o donde la pareja de unión específica de biotina de (iii) es un anticuerpo contra la biotina.

9. El dispositivo de microfluidos de acuerdo con la reivindicación 5, donde (ii) contiene además:

(e) al menos una tercera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo, la composición comprende además una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, donde la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y

(f) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítipo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (e), donde la molécula fluorescente de la tercera composición se selecciona del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio.

10. Un método para detectar la presencia y/o concentración de biotina y al menos un analito diana adicional en una muestra, el método comprende los pasos de:

(1) combinar, ya sea de forma simultánea o total o parcialmente secuencial, una muestra sospechosa de contener biotina y al menos un analito diana adicional con:

(a) una primera quimioperla que comprende al menos una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene biotina o un análogo de la misma unido directa o indirectamente a la misma, comprendiendo además la primera composición una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado;

(b) una segunda quimioperla que comprende al menos una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado con oxígeno singlete y que tiene una primera pareja de unión específica del analito de un analito diana unido directa o indirectamente a la misma, comprendiendo la segunda composición además una molécula fluorescente que se excita por el compuesto quimioluminiscente activado, donde la molécula fluorescente es diferente de la molécula fluorescente de (a) y emite luz a una longitud de onda diferente que la molécula fluorescente de (a);

(c) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítipo diferente del analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (b); y

(d) un exceso de una composición que comprende un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado y que tiene una pareja de unión específica de biotina unido directa o indirectamente al mismo;

(2) permitir la unión de (b) y (c) al analito diana presente en la muestra, así como la unión de (c) a (d), en donde la unión

- indirecta de (b) a (d) (a través de (c) y el analito diana) da como resultado la formación de un complejo de analito diana en el que el sensibilizador se acerca mucho al compuesto quimioluminiscente, y donde (a) se une a (d) en la ausencia de biotina en la muestra y da como resultado la formación de un complejo de biotina en el que el sensibilizador se acerca mucho al compuesto quimioluminiscente, y
- 5 (3) activar el sensibilizador para generar oxígeno singlete, donde la activación de los sensibilizadores presentes en el complejo de biotina y en el complejo del analito diana provoca la activación del compuesto quimioluminiscente presente en cada complejo;
- (4) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el complejo de biotina midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (a), donde la cantidad de biotina en la
- 10 muestra es inversamente proporcional a la cantidad de luz emitida;
- (5) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el complejo de analito diana midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (b) para determinar la cantidad de analito diana en la muestra;
- (6) opcionalmente repetir los pasos (2)-(5); y
- 15 (7) corregir el resultado del paso (5) en función de cualquier interferencia de biotina detectada en el paso (4) o marcar el resultado del paso (5) como no confiable si la concentración de biotina detectada en el paso (4) está por encima de un nivel de umbral máximo.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete es una sustancia que sufre una reacción química con el oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, y donde el sensibilizador es un fotosensibilizador, y la activación del sensibilizador en el paso (3) comprende la irradiación con luz.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde la muestra es una muestra biológica, y donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre total o cualquier porción de la misma, orina, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, piel, líquido intestinal, líquido intraperitoneal, líquido quístico, sudor, líquido intersticial, líquido extracelular, lágrimas, moco, lavado de vejiga, semen, heces, líquido pleural, líquido nasofaríngeo y combinaciones de los mismos.
- 25 13. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde cada una de la primera y segunda parejas de unión específicas del analito de (b) y (c) es un anticuerpo contra el analito diana, y donde la pareja de unión específica de biotina de (d) es avidina o un análogo de la misma o un anticuerpo contra la biotina.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete de (a) y/o (b) tiene un hapteno unido directa o indirectamente al mismo, y en el que las moléculas fluorescentes de (a) y (b) se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio, donde:
- 40 el terbio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 545 nm;
- el uranio emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 612 nm; y
- el samario emite luz a una longitud de onda de aproximadamente 645 nm.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el paso (1) comprende además combinar con (a)-(d):
- 45 (e) al menos una tercera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activado por oxígeno singlete que tiene una primera pareja de unión específica del analito para un segundo analito diana unido directa o indirectamente al mismo, la composición comprende además una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, donde la molécula fluorescente es diferente de las moléculas fluorescentes de (a) y (b) y emite luz a una longitud de onda diferente que las moléculas fluorescentes de (a) y (b); y
- 50 (f) una segunda pareja de unión específica del analito biotinilada para el segundo analito diana, donde la segunda pareja de unión específica del analito se une a un epítipo diferente del segundo analito diana que la primera pareja de unión específica del analito de (e), donde el método comprende además los pasos de:
- (8) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por el compuesto quimioluminiscente activado en el segundo complejo de analito diana midiendo la cantidad de luz emitida por la molécula fluorescente de (e) para determinar la
- 55 cantidad de analito diana en la muestra; y
- (9) corregir el resultado del paso (8) en función de cualquier interferencia de biotina detectada en el paso (4) o marcar el resultado del paso (8) como no confiable si la concentración de biotina detectada en el paso (4) está por encima de un nivel de umbral máximo, y donde la molécula fluorescente de (e) se selecciona del grupo que consiste en terbio, uranio, samario, europio, gadolinio y disprosio.

Componentes del Ensayo

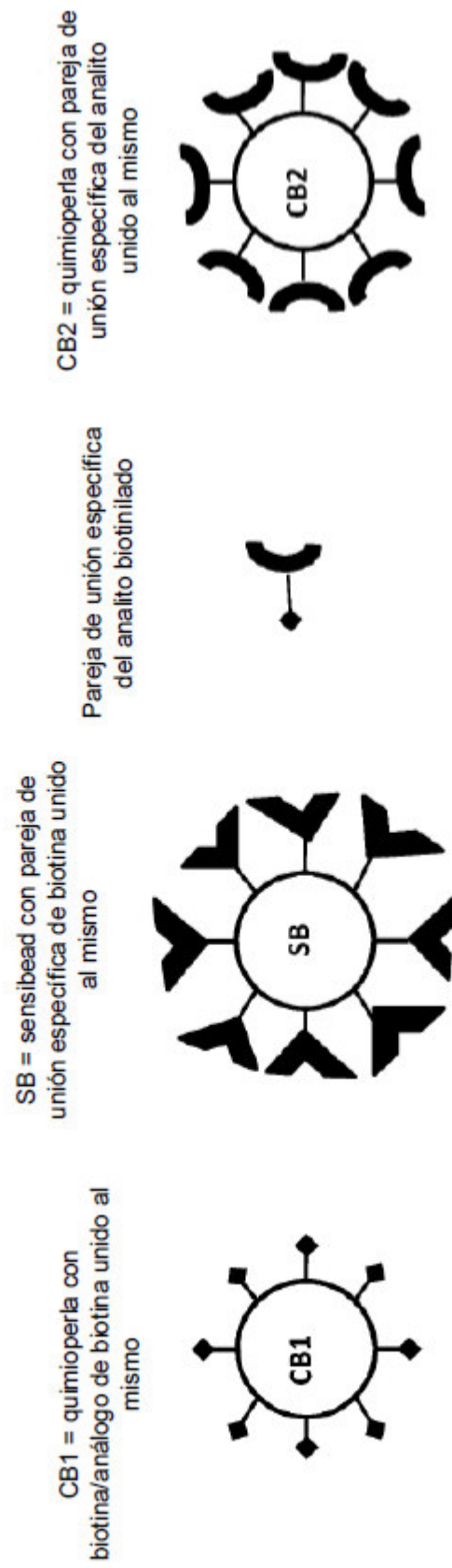


FIG. 1

Complejos formados cuando ni la biotina ni el analito diana están presentes en la muestra



Complejos formados cuando la biotina y el analito diana están presentes en la muestra

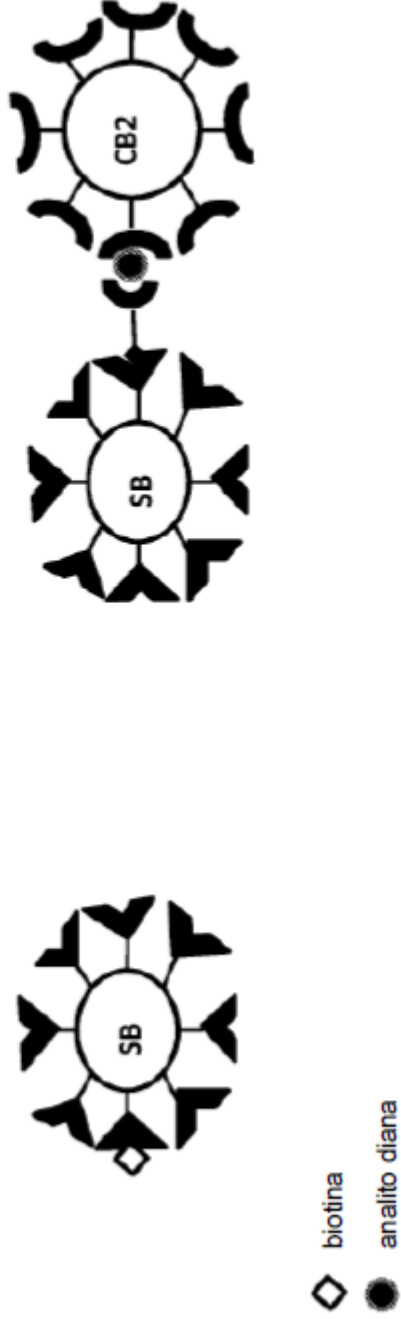


FIG. 2

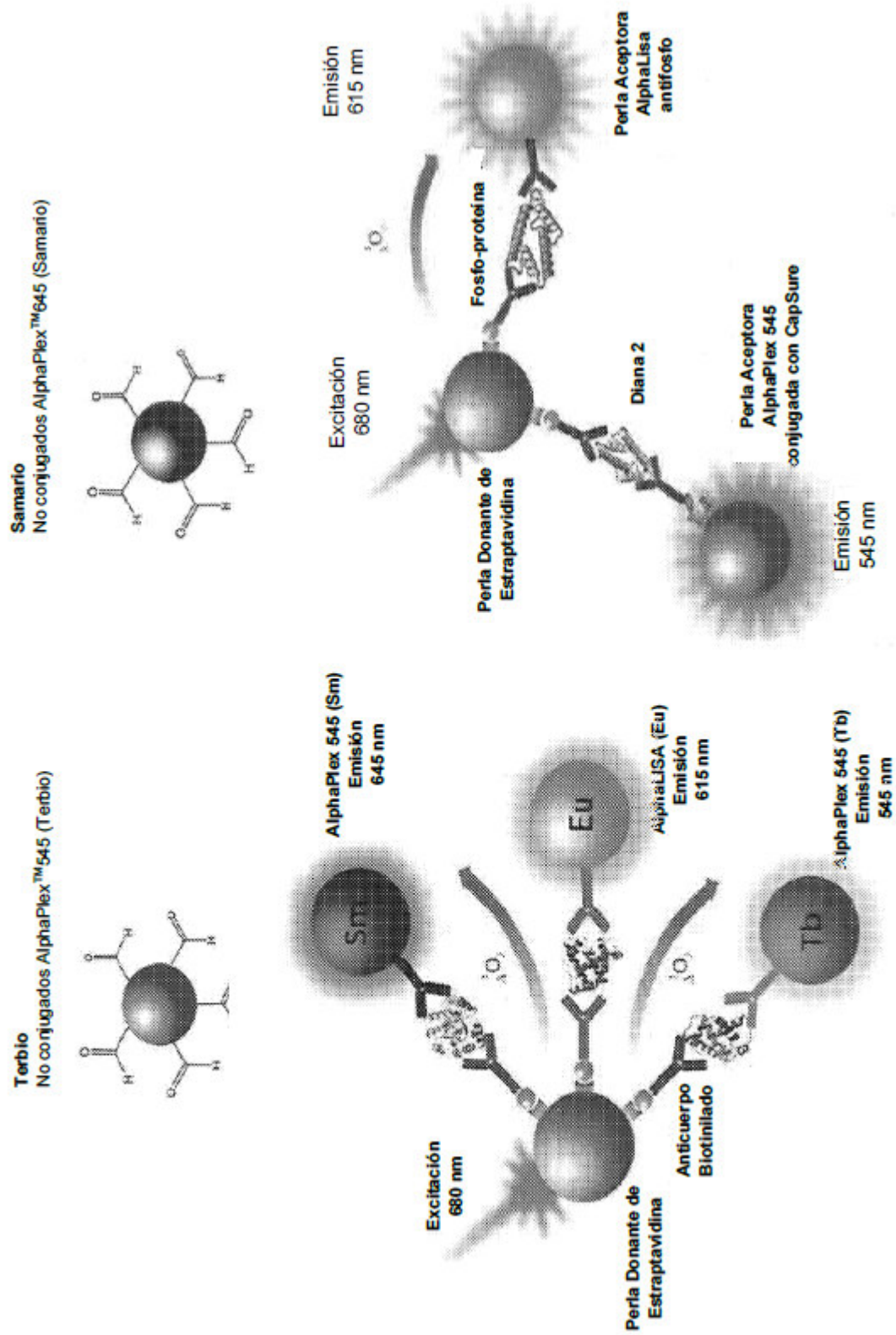


FIG. 3

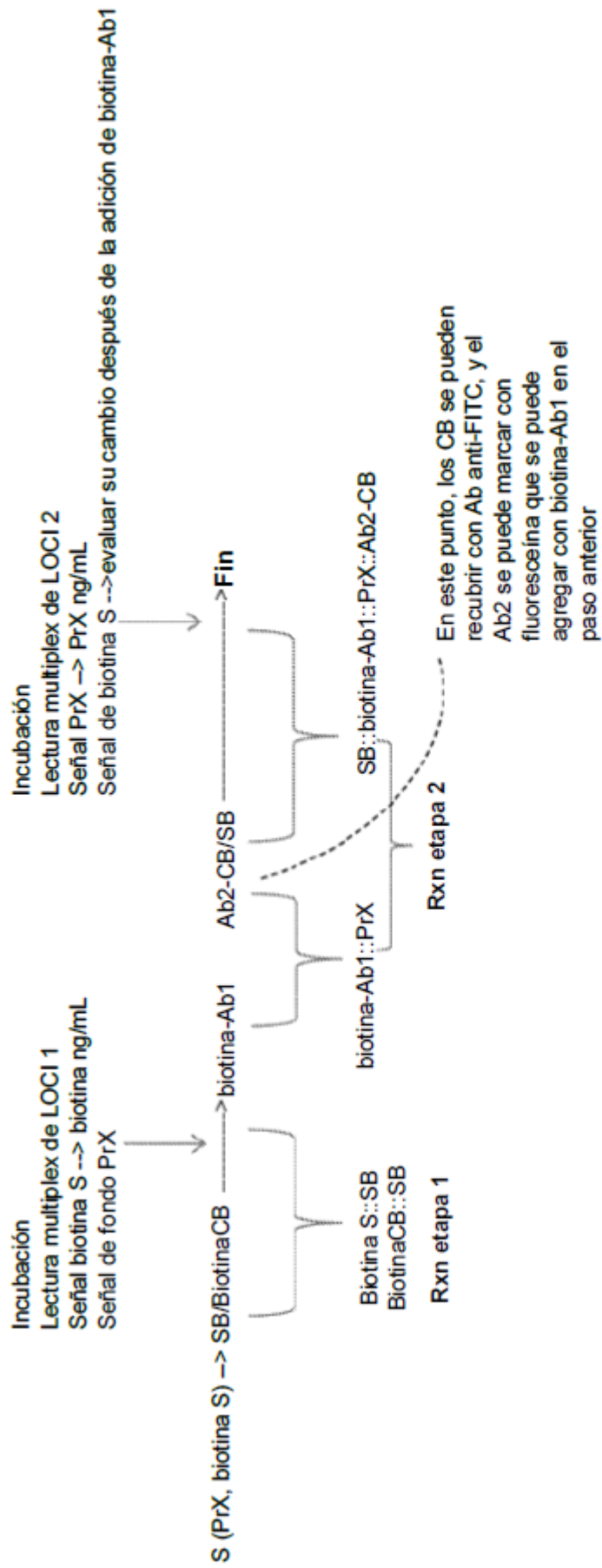


FIG. 4

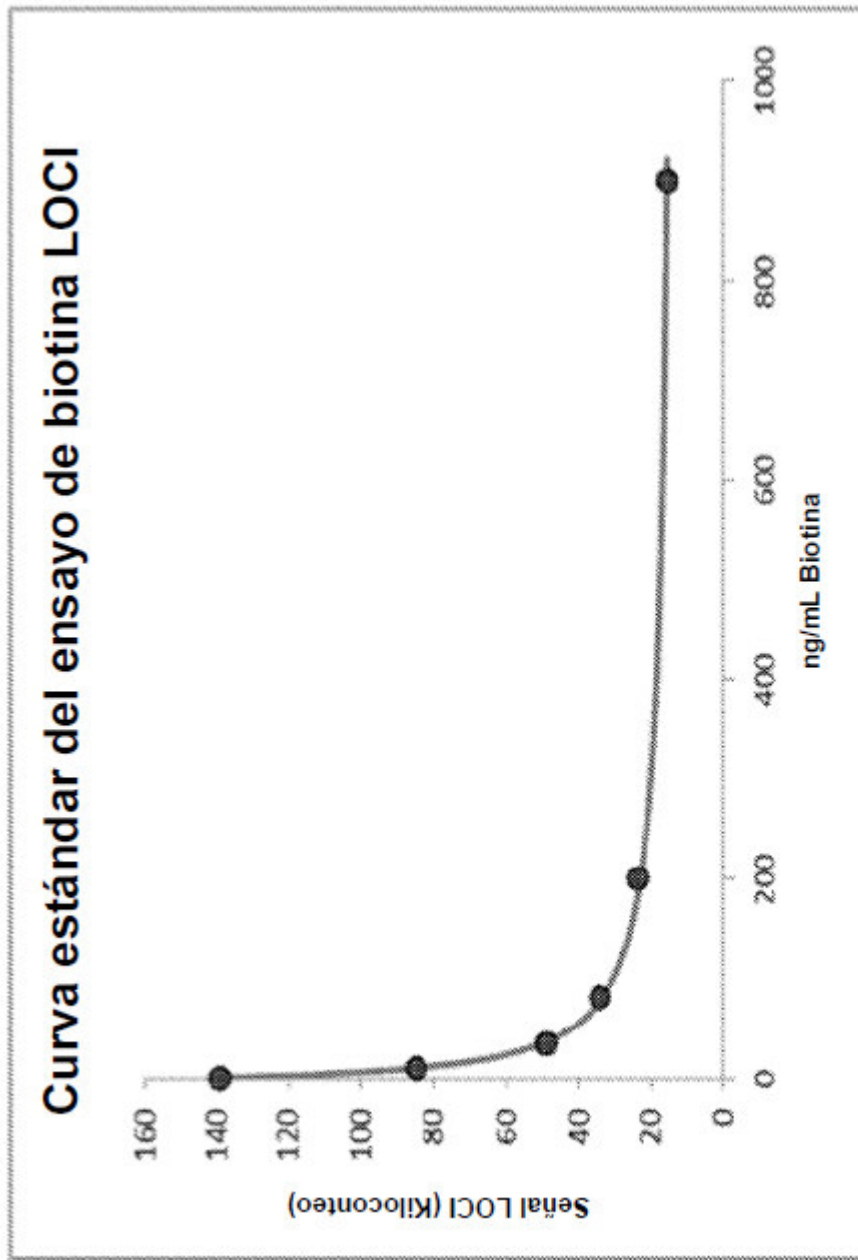


FIG. 5

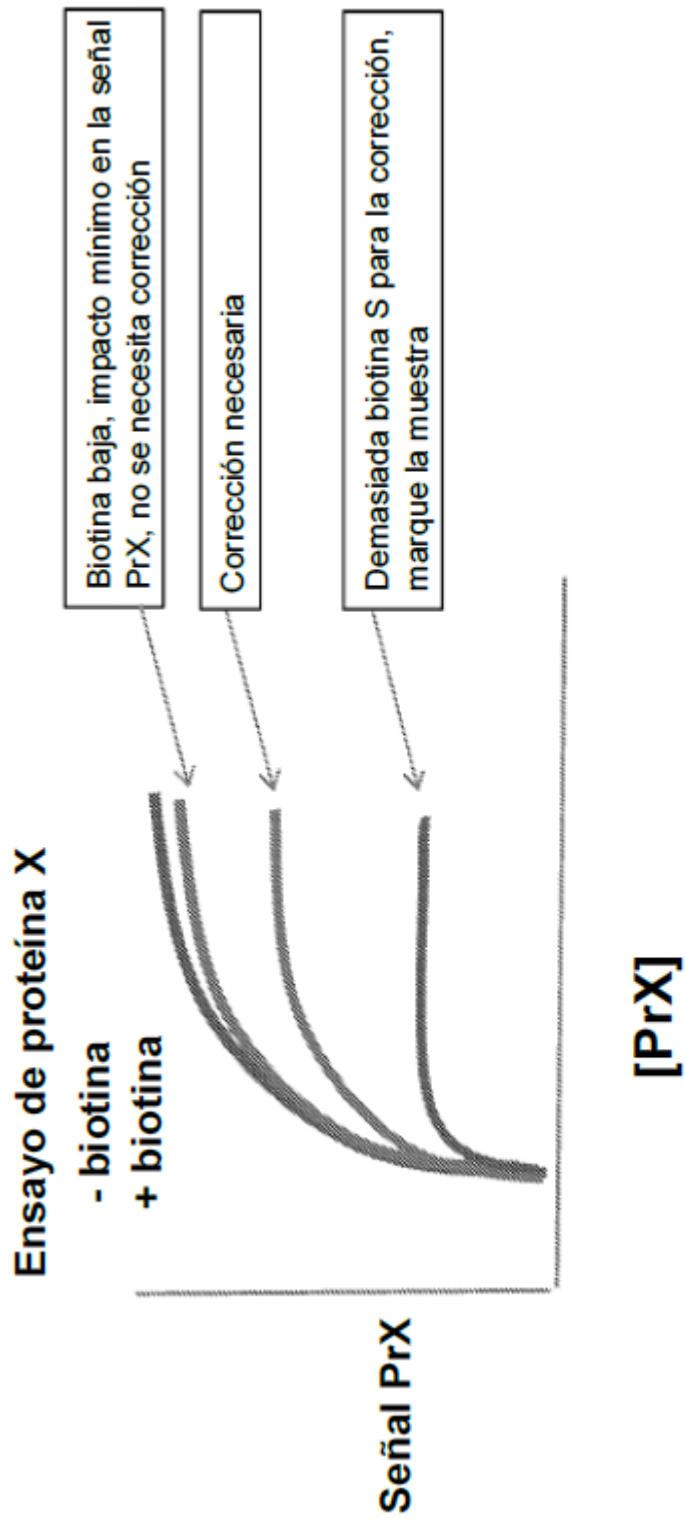


FIG. 6

Cómo la biotina de la muestra interfiere con la señal Prx en este ensayo dúplex

Escenario hipotético: Señal Prx en ausencia y presencia de cantidades variables de biotina S

[PrX] ng/mL / [biotina] ng/mL	0	10	100	500	3000
0	2	2	2	1	1
5	10	10	9	6	3
20	40	40	37	25	16
100	100	100	93	66	47
500	300	300	280	209	156

% de interferencia de la biotina S en la señal de PrX

[PrX] ng/mL / [biotina] ng/mL	0	10	100	500	3000
0	2	0%	-10%	-46%	-73%
5	10	0%	-9%	-41%	-66%
20	40	0%	-8%	-37%	-59%
100	100	0%	-7%	-34%	-53%
500	300	0%	-7%	-30%	-48%

FIG. 7

Un método para corregir la señal del analito diana utilizando la señal
(o concentración) de biotina de muestra:

[PrX] ng/mL / [biotina] ng/mL	0	10	100	500	3000
0	2	2	2	1	1
5	10	10	9	6	3
20	40	40	37	25	16
100	100	100	93	66	47
500	300	300	280	209	156

El rectángulo sombreado de arriba se puede reorganizar de la siguiente manera:

PrX	Biotina	Señal PrX
5	0	10
20	0	40
5	100	9
20	100	37
5	500	6
20	500	25

La regresión se lleva a cabo para obtener la ecuación de corrección basada en los datos anteriores (esto se puede hacer con software estadístico):

Ecuación de Regresión

PrX = -1,62 + 0,5668 Señal PrX + 0,01073 Biotina

FIG. 8

Cómo corregir la señal del analito diana utilizando la señal (o concentración) de biotina de muestra:

Análisis de regresión: PrX versus Biotina, PrX S

PrX	Biotina	PrX S
0	0	2
5	0	10
20	0	40
100	0	100
500	0	300
0	10	2
5	10	10
20	10	40
100	10	100
500	10	300
0	100	2
5	100	9
20	100	37
100	100	93
500	100	280
0	500	1
5	500	6
20	500	25
100	500	66
500	500	209
0	3000	1
5	3000	3
20	3000	16
100	3000	47
500	3000	156

Análisis de Varianza					
Fuente	DF	Aju SC	Aju CM	Valor-F	Valor-p
Regresión	2	846759	423380	143,87	0,000
Biotina	1	24361	24361	8,28	0,009
PrX S	1	846759	846759	267,74	0,000
Error	22	64741	1048		
Total	24	911500			

Resumen del Modelo

S	R-cuad	R-cuad(Aju)	R-cuad(pred)
54,2472	92,906%	92,25%	69,29%

Coefficientes

Term	Coef	Coef EE	Valor-T	Valor-p	VIF
Constante	-99,3	16,1	-2,45	0,023	
Biotina	0,02746	0,00954	2,88	0,009	1,03
PrX S	1,947	0,115	16,96	0,000	1,03

Ecuación de Regresión

$$\text{PrX} = -99,3 + 0,02746 \text{ Biotina} + 1,947 \text{ PrX S}$$

Ajustes y Diagnósticos para Observaciones Inusuales

Obs	PrX	Ajuste	Resid	Resid Est
20	500,0	383,1	117,9	2,32 R
25	500,0	347,3	152,7	3,26 R

R residual largo

Ecuación para la corrección del analito diana (PrX). Aquí, PrX puede ser una señal de PrX a 0 ng/mL de biotina. La columna PrX se puede reemplazar por PrX S a 0 ng/mL de biotina (donde los valores de PrX S son 2, 10, 40, 100 y 300). En ese caso, la señal PrX se corrige antes de convertirla en analito.

FIG. 9