

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 884 930**

(51) Int. Cl.:

**G01N 21/76** (2006.01)  
**G01N 33/542** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2015 E 18199087 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3483593**

---

(54) Título: **Inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente utilizando tres anticuerpos y métodos de producción y uso de los mismos**

(30) Prioridad:

**26.03.2014 US 201461970596 P**

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

**13.12.2021**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**LEDDEN, DAVID J.;**  
**LI, JAY J.;**  
**COWDEN, ERIC SCOTT y**  
**LU, DONGLAI**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 884 930 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**

Inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente utilizando tres anticuerpos y métodos de producción y uso de los mismos

**Antecedentes**

- 5 Las tecnologías de inmunoensayo son ampliamente utilizadas en el campo del diagnóstico médico. Un ejemplo de un inmunoensayo usado comercialmente es un inmunoensayo de luminiscencia inducida, como por ejemplo, pero no limitado a, la tecnología de inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente LOCI® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se divulga en la patente de Estados Unidos N° 5.340.716 (concedida a Ullman et al. el 23 de agosto de 1994). La tecnología LOCI® actualmente disponible implica un inmunoensayo que usa varios reactivos y requiere que dos de estos reactivos (denominados "Sensibead" y "Chemibead") se coloquen cerca uno del otro para lograr una señal. Cuando se expone a la luz a una cierta longitud de onda (como, por ejemplo, 680 nm), el Sensibead libera oxígeno singlete, y si las dos perlas están muy cerca, el oxígeno singlete se transfiere al Chemibead; esto causa una reacción química que hace que el Chemibead emita luz que se puede medir en una longitud de onda diferente (como, por ejemplo, 612 nm).
- 10 15 Sin embargo, existen obstáculos para esta tecnología. En particular, el inmunoensayo depende de la sensibilidad y el rango dinámico de uno o más anticuerpos que se utilizan como el mecanismo de detección de analitos. Por ejemplo, ciertos anticuerpos disponibles comercialmente que se utilizan actualmente en inmunoensayos (incluidos los inmunoensayos utilizados en un laboratorio central y/o en un punto de atención) tienen una sensibilidad limitada. Además, cuando la tecnología de inmunoensayo de luminiscencia inducida se aplica con un anticuerpo de sensibilidad limitada en el desarrollo de un ensayo en el punto de atención (POC) que utiliza un chip microfluídico, la sensibilidad del ensayo se ve comprometida aún más por el formato del ensayo, que utiliza un volumen de muestra más bajo. Por lo tanto, el ensayo en el POC puede no cumplir con un objetivo de sensibilidad requerido para el ensayo.
- 20 25 La sensibilidad de un inmunoensayo de detección de analito depende de la afinidad de uno o más anticuerpos anti-analito empleados en la arquitectura del ensayo: cuanto mayor sea la afinidad del anticuerpo, mayor será la sensibilidad del inmunoensayo. Por lo tanto, se desean anticuerpos anti-analito que tengan una alta sensibilidad para uso en el desarrollo de inmunoensayos de luminiscencia inducidos específicos de analito. Desafortunadamente, un anticuerpo que exhibe una sensibilidad sustancialmente mejorada sobre un anticuerpo existente también exhibe típicamente un rango de ensayo dinámico mucho más estrecho cuando se compara con el anticuerpo existente.
- 30 35 El documento US 5 585 241 A1 divulga un método para el ensayo de citometría de flujo de un analito usando partículas monodispersas que portan un compañero de unión específico. Este método utiliza un par de tipos de partículas diferentes que se distinguen entre sí mediante el citómetro de flujo y que, respectivamente, tienen compañeros de unión que tienen la misma especificidad pero una afinidad de unión diferente para el analito y que detectan de forma independiente pero simultánea los dos tipos de partículas marcadas que portan ligandos por el citómetro de flujo. El documento US 2009/170218 A divulga métodos y reactivos para determinar la presencia y/o la cantidad de ciclosporina A. Los métodos emplean al menos un anticuerpo que se une específicamente a CsA y no se une en grado significativo a entidades que no son ciclosporinas, de manera que el análisis para CsA se distorsionaría. El documento US 2012/045847 A divulga un ensayo para analitos que utilizan múltiples receptores, en el que cada receptor diferente se une a al menos dos sitios epítópicos diferentes. Uno de los sitios epítópicos es un sitio de unión común y uno de los sitios epítópicos es un sitio de unión no común, en el que los sitios epítópicos no comunes son diferentes para cada receptor diferente. Además, el documento WO 99/46597 A1 divulga un método para evaluar el estado de la hormona del crecimiento de un individuo mediante inmunoensayo para el complejo ternario del factor de crecimiento de tipo insulínico 150 KDa (IGF/IGFBP-3/ ALS). Este método implica capturar el complejo de IGFBP con un primer anticuerpo acoplado a una fase sólida y detectar el complejo con un segundo anticuerpo acoplado a una etiqueta. Además, el documento US 8.414.896 B2 divulga una composición de anticuerpo recombinante que comprende al menos tres anticuerpos anti-EGFR distintos, en la que los anticuerpos se unen al primer, segundo y tercer epítopos de EGFR.
- 40 45

En un ejemplo no limitante particular, un analito específico para el cual se desea la detección por un inmunoensayo de luminiscencia inducida (tal como, pero sin limitación, un inmunoensayo de luminiscencia inducida por POC) es la Troponina I cardíaca (cTnI). Las troponinas cardíacas se consideran los marcadores bioquímicos más sensibles y específicos para la detección de daño miocárdico. La redefinición de un infarto agudo de miocardio (AMI) por la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología (ESC/ACC) recomienda que un aumento del nivel de troponina cardíaca se defina como una medida por encima del valor del percentil 99 del grupo de referencia (Alpert, J. Am. Coll. Cardiol., 36: 959-69 (2000)). Además, la recomendación de ESC/ACC requiere que la imprecisión total en el límite de decisión del percentil 99 sea del 10% o menos (Tabla 1).

Tabla 1: Requerimientos de desempeño para un inmunoensayo cTnI	
Concentración mínima detectable	0,006 ng/mL
Percentil 99	0,04 ng/mL
10% de CV total	0,03 ng/mL

Estos nuevos estándares de desempeño para los ensayos de troponina cardíaca requieren nuevos enfoques para el diseño de inmunoensayos con el fin de lograr una medición cuantitativa y precisa de niveles extremadamente bajos de troponina que se encuentran en el daño miocárdico menor o temprano. Se han sugerido varias arquitecturas de inmunoensayos, anticuerpos y tecnologías de detección para lograr y superar estos nuevos estándares de desempeño.

La selección de anticuerpos es fundamental para cumplir los nuevos objetivos de desempeño descritos anteriormente. Los criterios de selección deben tener en cuenta no solo la especificidad de la unión a la troponina I cardíaca, sino también las afinidades de unión, que determinan los límites de detección y el tiempo de ensayo. Las reactividades cruzadas con otras troponinas cardíacas y esqueléticas, así como con otros biomarcadores cardiovasculares, deben ser insignificantes.

Además, es crítico medir la cantidad total de troponina I específica cardíaca en una muestra del paciente para obtener la máxima sensibilidad analítica. Dado que la troponina I cardíaca (cTnI) existe en forma libre y en forma de complejos con la troponina C cardíaca (cTnC) y, en menor medida, con la troponina T cardíaca (cTnT), es importante seleccionar los anticuerpos que se unen a los epítopos de cTnI que se expresan de manera independiente de la complejación con otras troponinas cardíacas. La capacidad de unirse a formas libres y complejadas de cTnI también es importante en situaciones en las que el tipo de muestra utilizada es el plasma con EDTA. La constante de asociación entre cTnI y cTnC es más fuerte en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El EDTA quela el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que resulta en un aumento en la proporción de cTnI libre en la muestra. Además, la proporción de cTnI libre y complejada se modula en cierta medida por el grado de proteólisis de cTnI y cTnC.

La selección cuidadosa de anticuerpos es esencial para asegurar la recuperación de cTnI después de la proteólisis tanto por las proteasas presentes en el miocardio necrótico como en el plasma del paciente. El grado de degradación varía entre pacientes individuales. La manifestación de la proteólisis de cTnI conduce a las diferencias aparentes en la estabilidad de la muestra entre los métodos de cTnI disponibles comercialmente y las diferencias de estabilidad entre las muestras. La estabilidad de la muestra para cTnI depende de los epítopos específicos reconocidos por los anticuerpos en el sistema de prueba de cTnI.

Las primeras generaciones de anticuerpos anti-cTnI disponibles comercialmente utilizados en inmunoensayos de luminiscencia inducidos por cTnI tenían una sensibilidad adecuada en el momento de su introducción; sin embargo, una vez que la definición de AMI cambió en 2000 (como se divulgó aquí anteriormente), los anticuerpos anti-cTnI disponibles comercialmente ahora exhibían una sensibilidad limitada a los mayores niveles de requisitos de desempeño para los ensayos de cTnI. Por lo tanto, estos anticuerpos de sensibilidad limitada no proporcionaron el objetivo de sensibilidad de ensayo requerido en el formato de inmunoensayo de luminiscencia inducida (incluidos los formatos de laboratorio central y/o de punto de atención). Además, los anticuerpos de sensibilidad limitada son obstáculos aún mayores para el desarrollo de un formato de ensayo del punto de atención (POC) que utiliza un chip microfluídico, ya que la sensibilidad del ensayo se ve comprometida aún más por el menor volumen de muestra utilizado en el formato de ensayo del POC.

Un anticuerpo recientemente identificado diseñado para el reemplazo del anticuerpo actual de sensibilidad limitada (es decir, un anticuerpo monoclonal de oveja de alta afinidad anti-cTnI) exhibió una sensibilidad sustancialmente mejorada sobre el anticuerpo existente; sin embargo, este nuevo anticuerpo tiene un rango de ensayo dinámico mucho más estrecho. La meseta de la señal se observó a concentraciones de cTnI por encima de 20 ng/mL, y el ensayo de cTnI mejorado que utiliza el nuevo anticuerpo de alta afinidad no tiene el rango dinámico requerido del ensayo de cTnI comercial actual.

Por lo tanto, se desean nuevos y mejorados inmunoensayos de luminiscencia inducida basados en anticuerpos y arquitecturas de ensayo que muestren una alta sensibilidad en un amplio rango dinámico. Es a tales ensayos, así como a las composiciones, kits, dispositivos y métodos relacionados con los mismos, a los que se dirigen los conceptos inventivos divulgados y reivindicados como se define en las reivindicaciones.

#### Descripción de las varias vistas de los dibujos

La Figura 1 compara gráficamente la sensibilidad y el rango dinámico de los inmunoensayos de Troponina I (cTnI) cardíaca conocidos en la técnica anterior con la sensibilidad y el rango dinámico de los inmunoensayos construidos de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 2 ilustra dos realizaciones de arquitecturas de inmunoensayo de luminiscencia inducida de la técnica anterior.

La Figura 3 ilustra una arquitectura de inmunoensayo de luminiscencia inducida construida de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 4 contiene un mapa de varias regiones de epítopo de cTnI.

La Figura 5 ilustra una primera realización de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 6 ilustra otra realización de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 7 ilustra otra realización de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 8 ilustra otra realización de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

5 La Figura 9 ilustra otra realización de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 10 ilustra otra realización más de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

10 La Figura 11 ilustra una realización adicional de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 12 ilustra una realización adicional más de una arquitectura básica para un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

La Figura 13 contiene imágenes fotográficas de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con la arquitectura básica del dispositivo que se muestra en la Figura 6.

15 La Figura 14 contiene imágenes fotográficas de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con la arquitectura básica del dispositivo que se muestra en la Figura 11.

La Figura 15 contiene un mapa de epítopos de cTnI que ilustra un primer ejemplo de epítopos reconocidos por un conjunto de tres anticuerpos utilizados en un inmunoensayo de cTnI construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

20 La Figura 16 contiene un mapa de epítopos de cTnI que ilustra un segundo ejemplo de epítopos reconocidos por un conjunto de tres anticuerpos utilizados en un inmunoensayo de cTnI construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El conjunto de tres anticuerpos reconoce tres epítopos: dos epítopos superpuestos reconocidos por dos anticuerpos de detección y un tercer epítopo reconocido por un anticuerpo de captura, en el que el tercer epítopo no se superpone con los otros dos epítopos.

25 La Figura 17 contiene un mapa de epítopos de cTnI que ilustra un tercer ejemplo de epítopos reconocidos por un conjunto de tres anticuerpos utilizados en un inmunoensayo de cTnI (no de acuerdo con las reivindicaciones).

La Figura 18 contiene un mapa de epítopos de BNP que ilustra un primer ejemplo de epítopos reconocidos por un conjunto de tres anticuerpos utilizados en un inmunoensayo de BNP (no de acuerdo con las presentes reivindicaciones).

### 30 Descripción detallada

Antes de explicar al menos una realización del concepto o conceptos de la invención en detalle a través de ejemplos de dibujos, experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio, debe entenderse que el concepto o conceptos de la invención no están limitados en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentación y/o resultados. El concepto o conceptos de la invención son capaces de otras realizaciones o de ser practicados o llevados a cabo de varias maneras. Como tal, el lenguaje utilizado en este documento está destinado a tener el mayor alcance y significado posibles; y las realizaciones están destinadas a servir como ejemplos, no exhaustivas. Además, debe entenderse que la expresiónología y la terminología empleadas en este documento son para fines de descripción y no deben considerarse limitativas.

40 A menos que se defina de otro modo en este documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados en el presente documento deben tener los significados que los expertos en la técnica entienden comúnmente. Además, a menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. 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 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 médica y farmacéutica descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

50 Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

El uso de la palabra "un" o "uno, una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". Las formas singulares "un", "uno, 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 1 o más,

- 2 o más, 3 o más, 4 o más o mayor número de compuestos. El término "plural" se refiere a "dos o más". El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando se utiliza el término "aproximadamente", el valor designado puede variar en  $\pm 20\%$  o  $\pm 10\%$ , o  $\pm 5\%$ , o  $\pm 1\%$ , o  $\pm 0,1\%$  del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos divulgados y tal como lo entienden las personas con experiencia ordinaria en la técnica. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye uno, así como cualquier cantidad mayor que uno, incluidos, entre otros, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al que se adjunta; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitativas, ya que los 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 terminología de números ordinales (es decir, "primero", "segundo", "tercero", "cuarto", etc.) tiene el único propósito de diferenciar entre dos o más elementos y no pretende implicar ninguna secuencia u orden o importancia para un ítem sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.
- Como se utiliza en esta memoria descriptiva y reivindicación o reivindicaciones, los términos "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye") o "conteniendo" (y cualquier forma de conteniendo, tal como "contiene") son inclusivas o abiertas y no excluyen etapas adicionales, elementos o métodos no mencionados.
- 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. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones contenido repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica entenderá que, por lo general, no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente a partir del contexto.
- Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" significa que el evento o circunstancia posteriormente descrito ocurre completamente o que el evento o circunstancia posteriormente descrito ocurre en gran medida o grado. Por ejemplo, el término "sustancialmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre al menos el 90% del tiempo, o al menos el 95% del tiempo, o al menos el 98% del tiempo.
- Como se usa en el presente documento, la expresión "asociado con" incluye tanto la asociación directa de dos fracciones entre sí como la asociación indirecta de dos fracciones entre sí. Los ejemplos no limitantes de asociaciones incluyen la unión covalente de una fracción a otra fracción mediante un enlace directo o mediante un grupo espaciador, la unión no covalente de un fracción a otra fracción directamente o por medio de miembros de pares de unión específicos unidos a los fracciones, incorporación de un fracción en otra fracción, tal como disolviendo un fracción en otra fracción o mediante síntesis, y recubriendo un fracción en otra fracción.
- El término "purificado", como se usa en este documento, significa que al menos un orden de magnitud de purificación se logra en comparación con el material de partida o el material natural, por ejemplo, pero no como limitación, dos, tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud de purificación del material de partida o del material natural. Por lo tanto, el término "purificado" tal como se utiliza en el presente documento no significa necesariamente que el material esté purificado al 100%, y por lo tanto dicho término no excluye la presencia de otros materiales presentes en la composición purificada.
- Los términos "análogo" y "derivado" se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a una sustancia que comprende la misma estructura básica de carbonos y la función carbono en su estructura tal como un compuesto dado, pero también puede contener una o más sustituciones de los mismos. El término "sustitución" como se usa en el presente documento se entenderá que se refiere al reemplazo de al menos un sustituyente en un compuesto con un residuo 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 cílico, opcionalmente sustituido, y alquenilo lineal ramificado o cílico, en el que los sustituyentes opcionales se seleccionan de uno o más de 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, arilcicloalquilo y arilheterocicloalquilo opcionalmente sustituidos, fenilo, ciano, hidroxilo, alquilo, arilo, cicloalquilo, ciano, alcoxi, alquiltio, amino, -NH(alquilo), -NH (cicloalquilo) , carboxi y -C(O)-alquilo.
- Se entenderá que el término "muestra", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier tipo de muestra biológica que pueda utilizarse de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente reivindicados. Los ejemplos de muestras biológicas que pueden utilizarse incluyen, entre otros, sangre entera o cualquier porción de la

misma (es decir, plasma o suero), saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo (CSF), piel, fluido intersticial, lágrimas, mucosidad, orina, frotis, combinaciones, y similares.

El término "compañero de unión" como se usa en el presente documento se entenderá que se refiere a cualquier molécula capaz de asociarse con otra molécula. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el compañero de unión puede ser un anticuerpo (incluidos los anticuerpos policlonales o monoclonales), fragmentos de anticuerpos (como, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una parte de la región variable de un anticuerpo intacto), un receptor, un ligando, aptámeros, proteínas o péptidos sustitutos de anticuerpos (es decir, proteínas/péptidos de unión modificados por ingeniería genética), polímeros de impresión molecular (es decir, matrices inorgánicas), combinaciones o derivados de los mismos, así como cualquier otra molécula capaz de unirse específicamente al analito.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Por lo tanto, los términos "Anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refieren a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, un anticuerpo intacto), o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica al antígeno. Los fragmentos de unión pueden producirse por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv ligado a disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (tales como, entre otros, NANOBODIES® (Ablynx, Zwijnaarde, Bélgica)), y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una parte de la región variable de un anticuerpo intacto. Véase, por ejemplo, Hudson et al. (Nature Med., 9: 129-134 (2003)).

El término "fragmento de unión a antígeno" o "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. La función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv ligado a disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (tales como, entre otros, NANOBODIES® (Ablynx, Zwijnaarde, Bélgica)), CDRH3 aislado y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una parte de la región variable de un anticuerpo intacto. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas recombinantes y/o enzimáticas convencionales y se analizan para determinar la unión a antígeno de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Los términos "CDR", y su plural, se refieren a una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que determina el carácter de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En la mayoría de los casos, tres CDR están presentes en una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres CDR están presentes en una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden andamios o regiones marco. Entre las diversas CDR, las secuencias de CDR3, y en particular CDRH3, son las más diversas y, por lo tanto, tienen la mayor contribución a la especificidad del anticuerpo. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Md. (1987)) y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia et al., Nature, 342: 877 (1989)).

El término "epítopo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína determinante capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. En ciertas realizaciones, un epítopo es una región de un antígeno que está unido específicamente por un anticuerpo. Los determinantes epitópicos suelen incluir grupos de moléculas químicamente activas en la superficie, tal como, por ejemplo, grupos de aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo y/o sulfonilo. En ciertas realizaciones, un epítopo puede tener características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

Se entenderá que el término "epítopo", como se usa en el presente documento, incluye tanto epítopos lineales como epítopos conformacionales. Los epítopos lineales están formados por una secuencia continua de aminoácidos de un antígeno y, por lo tanto, comprenden la estructura péptido/proteína primaria/lineal de un antígeno. Los epítopos conformacionales están formados por secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos de un antígeno y se basan en características de la superficie tridimensional y/o forma de la estructura terciaria de un antígeno.

Un epítopo se define como "igual" que otro epítopo si un anticuerpo particular se une específicamente a ambos epítopos. En ciertas realizaciones, los polipéptidos que tienen diferentes secuencias primarias de aminoácidos pueden comprender epítopos que son iguales. En ciertas realizaciones, los epítopos que son iguales pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos primarios. Se dice que diferentes anticuerpos se unen al mismo epítopo si compiten por la unión específica a ese epítopo.

Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno cuando reconoce preferentemente el antígeno en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un epítopo particular. En ciertas de tales realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a diferentes antígenos siempre que los diferentes antígenos comprendan ese epítopo particular o epítopos estrechamente relacionados. En ciertos casos, por ejemplo, las proteínas homólogas de diferentes especies pueden

comprender el mismo epítopo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno con una constante de disociación no superior a  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-12}$  M o  $10^{-13}$  M.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado y/o recuperado de un componente del entorno en el que se produjo. Los componentes contaminantes de su entorno de producción son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará en forma mensurable por al menos tres métodos diferentes: (1) en más del 50% en peso del anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, tal como más del 75% en peso, o más del 85% en peso, o más del 95% en peso, o más del 99% en peso; (2) en un grado suficiente para obtener al menos 10 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, tal como al menos 15 residuos de secuencia; o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que no estará presente al menos un componente del ambiente en el que se produce el anticuerpo. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación. Además, el "anticuerpo aislado" está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigenicas. Sin embargo, un anticuerpo aislado puede tener cierta reactividad cruzada con otros antígenos relacionados.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea que se unen específicamente al mismo epítopo, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presente en pequeñas cantidades (aunque puede haber variabilidad en los patrones de glicación de los anticuerpos individuales). En contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque en un método de producción pueden sintetizarse mediante un cultivo de hibridoma y, por lo tanto, no están contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos monoclonales producidos de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos divulgados en el presente documento pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein (*Nature*, 256: 495 (1975)).

Los anticuerpos monoclonales utilizados de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden producirse mediante cualquier metodología conocida en la técnica, que incluye, entre otros, un resultado de un protocolo de inmunización deliberado; un resultado de una respuesta inmune que resulta en la producción de anticuerpos naturalmente en el curso de una enfermedad o cáncer; anticuerpos derivados de fagos; y similares. Además del método de producción de hibridoma enumerado anteriormente, los anticuerpos monoclonales utilizados en el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados pueden producirse mediante otros diversos métodos, tales como, entre otros, métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567); aislamiento de fragmentos de anticuerpos de una biblioteca de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)); así como otras técnicas de producción de anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)).

Una vez que se han obtenido los anticuerpos, por ejemplo, una vez que se han identificado células B individuales y/o se han producido anticuerpos monoclonales, se pueden obtener las secuencias que codifican las regiones variables de estos anticuerpos. Las secuencias de la región variable se pueden obtener, por ejemplo, mediante la primera secuenciación de la proteína del anticuerpo producida por el hibridoma, células B o fago y determinando la secuencia de ácido nucleico codificante. En una realización, puede secuenciarse en su lugar el ADN o el ADNc de la región variable de inmunoglobulina (VH y VL). Cuando el anticuerpo se deriva de una línea celular de hibridoma o de células B aisladas, los ADNc que codifican las regiones variables pueden amplificarse utilizando la PCR mediante, por ejemplo, los métodos descritos en Babcock et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7843-7848 (1996)), y en la publicación PCT No. WO 92/02551.

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados se refieren a una nueva arquitectura de inmunoensayo de luminiscencia inducida que proporciona una sensibilidad mejorada frente a los inmunoensayos de luminiscencia inducida de la técnica anterior mientras aún se mantiene el rango dinámico del ensayo de la técnica anterior. Esta nueva arquitectura de inmunoensayo se puede utilizar en el desarrollo de nuevos inmunoensayos de luminiscencia inducida para cTnI y es adaptable para uso en laboratorios centrales y/o POC. En esta nueva arquitectura de ensayo, se utilizan dos anticuerpos de detección en el ensayo tipo sándwich para reemplazar el anticuerpo de detección único utilizado en la arquitectura del ensayo de cTnI actual. La combinación de un anticuerpo de mayor afinidad con otro anticuerpo que muestra menos sensibilidad pero mayor rango dinámico en comparación con el anticuerpo de mayor afinidad resuelve los problemas de sensibilidad y rango dinámico de la arquitectura de ensayo actual.

La Figura 1 demuestra el aumento de la sensibilidad y el rango dinámico del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados sobre la técnica anterior. En la Figura 1, las curvas de respuesta a la dosis se representan para dos inmunoensayos de la técnica anterior y se comparan con el ensayo de los conceptos inventivos actualmente descritos y reivindicados para un analito particular, cTnI. La curva de respuesta a la dosis representada

- por los puntos de datos circulares representa el ensayo de cTnI comercial actual, mientras que la curva de respuesta a la dosis representada por puntos de datos cuadrados representa el ensayo que utiliza el anticuerpo anti-cTnI de mayor sensibilidad. Como se puede observar, se observa una meseta en el rango dinámico superior para el ensayo que usa el anticuerpo anti-cTnI de alta sensibilidad, mientras que la sensibilidad se pierde en el rango dinámico más
- 5 bajo del ensayo de cTnI comercial actual. Por el contrario, la curva de respuesta a la dosis representada por los puntos de datos triangulares se deriva de la arquitectura del ensayo con cTnI actualmente divulgada y reivindicada que utiliza anticuerpos de detección dual. En comparación con las curvas de dosis-respuesta de las arquitecturas de ensayo de cTnI de la técnica anterior que utilizan anticuerpos de detección única, la nueva arquitectura de cTnI proporciona no solo la sensibilidad de ensayo de cTnI requerida sino también el rango dinámico de ensayo de cTnI requerido.
- 10 Las Figuras 2 y 3 proporcionan una comparación de la arquitectura de inmunoensayo de luminiscencia inducida del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados con las arquitecturas de ensayo de la técnica anterior. La Figura 2A ilustra una arquitectura de inmunoensayo de la técnica anterior que incluye un único anticuerpo de detección (mostrado como asociado a un Chemibead (CB) antes de la incubación con la muestra contenido el analito) y un único anticuerpo de captura (mostrado como capaz de asociarse con un Sensibead (SB) durante la etapa de incubación). En la Figura 2B, se representa otra arquitectura de inmunoensayo de la técnica anterior; en esta estructura, se utilizan anticuerpos de detección dual en lugar del anticuerpo de detección único en la Figura 2A (en el que ambos anticuerpos de detección son capaces de asociarse con un solo CB). Sin embargo, esta arquitectura de ensayo requiere que los tres anticuerpos (es decir, ambos anticuerpos de detección y el anticuerpo de captura único) deben unirse a un solo analito para la detección de los mismos.
- 15
- 20 Por el contrario, y como se muestra en la Figura 3, la estructura de ensayo del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados utiliza dos anticuerpos de detección (Ab1 y Ab2, ilustrados como asociados con CB1 y CB2, respectivamente) que compiten entre sí para unirse a un analito. Es decir, los dos anticuerpos de detección se unen a epítopos que se superponen al menos parcialmente, por lo que los dos anticuerpos de detección no pueden unirse a una única molécula de analito. Uno de los anticuerpos de detección (Ab1) puede poseer una alta
- 25 sensibilidad con un rango dinámico limitado, mientras que el otro anticuerpo de detección (Ab2) puede exhibir un nivel más bajo de sensibilidad con un mayor rango dinámico. El uso de estos dos anticuerpos de detección de esta manera resulta en un inmunoensayo que exhibe un nivel de sensibilidad deseado sobre un rango dinámico y un límite de detección suficientes, como se muestra en la Figura 1.
- 30 Volviendo ahora a las realizaciones particulares del concepto o conceptos inventivos actualmente reivindicados y divulgados, se divulan kits y dispositivos y métodos de uso de los mismos. Los miembros del sistema productor de señales (sps) comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente, donde la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. Un miembro de sps generalmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembros de sps enlazados y/o no enlazados, es decir, la cantidad de miembros de sps enlazados o no enlazados
- 35 al analito que se está detectando o a un agente que refleja la cantidad del analito a ser detectado. Un ejemplo de realización de una plataforma de ensayo en la que se basa el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados es el inmunoensayo de luminiscencia inducida (LOCI®). El inmunoensayo de luminiscencia inducida se divulga en la patente de Estados Unidos N° 5.340.716.
- 40 El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados incluye una composición conteniendo un sistema de detección quimioluminiscente. La composición incluye al menos tres componentes. El primer componente comprende una composición que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en el que el primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un primer epítopo del analito, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente al analito es decir la Troponina I cardíaca a través del primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo. El segundo componente comprende una composición que incluye un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en el que el segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un segundo epítopo del analito, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente
- 45 al analito a través del segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo, y en donde el primer y segundo epítopos se superponen al menos parcialmente de tal manera que el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión del mismo no pueden unirse a un molécula de analito único. El tercer componente comprende una composición que incluye un tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, siendo el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo un anticuerpo de captura que se une específicamente a un tercer epítopo del analito que no se superpone con el primer y segundo epítopos, por lo que una molécula de analito único puede unirse al tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo y uno del primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión del mismo, y en donde el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es capaz de asociarse con un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado, por lo que la asociación del tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo con el sensibilizador permite la unión indirecta del sensibilizador al analito.
- 50
- 55
- 60 Los epítopos primero, segundo y tercero son todos epítopos lineales como se define en las reivindicaciones y, por lo tanto, reconocen porciones lineales de la secuencia de aminoácidos del analito. En una realización alternativa, no reivindicada, el primero, segundo y tercer epítopos pueden ser todos epítopos conformacionales o una mezcla de epítopos lineales y conformacionales. Es decir, el primer epítopo puede ser un epítopo lineal, mientras que el segundo epítopo puede ser un epítopo conformacional (o viceversa); de esta manera, el primer y segundo

anticuerpos/fragmentos de unión pueden no necesariamente reconocer porciones superpuestas de la secuencia de aminoácidos lineal del analito; en su lugar, los dos anticuerpos/fragmentos de unión pueden reconocer porciones superpuestas de la estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos del analito.

El tercer componente incluye además el sensibilizador asociado con el tercer anticuerpo o fragmento de unión al mismo. Alternativamente, la composición puede incluir además un cuarto componente que incluye el sensibilizador.

Un sensibilizador es una molécula, generalmente un compuesto, para la generación de un compuesto intermedio reactivo tal como, por ejemplo, oxígeno singlete, para activación de un compuesto quimioluminiscente. En algunas realizaciones, el sensibilizador es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores que pueden ser activados químicamente (mediante, por ejemplo, enzimas y sales metálicas) incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, otras sustancias y composiciones que pueden producir oxígeno singlete con o, menos preferiblemente, 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 los metales alcalinotérreos Ca, Sr y Ba; derivados de elementos de los grupos 3A, 4A, 5A y 6A en la configuración d<sup>0</sup>; óxidos de actínidos y lantánidos; y los oxidantes ClO<sup>-</sup>, BrO<sup>-</sup>, Au<sup>3+</sup>, IO<sub>3</sub><sup>-</sup> y IO<sub>4</sub><sup>-</sup>; y, en particular, iones molibdato, peroxomolibdato, tungstato y peroxotungstato, y acetonitrilo. Las siguientes referencias proporcionan una descripción adicional con respecto a las sustancias y composiciones sensibilizadoras que también están dentro del alcance del concepto inventivo actualmente divulgado y reivindicado: Aubry, J. Am. Chem. Soc., 107: 5844-5849 (1985); Aubry, J. Org. Chem., 54: 726-728 (1989); Böhme y Brauer, Inorg. Chem., 31: 3468-3471 (1992); Niu y Foote, Inorg. Chem., 31: 3472-3476 (1992); Nardello et al., Inorg. Chem., 34: 4950-4957 (1995); Aubry y Bouttemy, J. Am. Chem. Soc., 119: 5286-5294 (1997); y 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, mediante excitación por calor, luz, radiación ionizante o activación química, liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros de esta clase de compuestos incluyen, por ejemplo, los endoperóxidos tales como el 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno endoperóxido, 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 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 por excitación con luz. Los fotosensibilizadores son fotoactivables e incluyen, por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos, y generalmente son compuestos que comprenden átomos unidos covalentemente, generalmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. Los compuestos deben absorber la luz en el rango de longitud de onda de 200 a 1.100 nm, o de 300 a 1.000 nm, o de 450 a 950 nm, con un coeficiente de extinción en su máximo de absorbancia superior a 500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, o mayor que 5.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, o mayor que 50.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, en la longitud de onda de excitación. Los fotosensibilizadores deben ser relativamente fotosensibles y, preferiblemente, no reaccionar eficientemente con el oxígeno singlete. Los ejemplos de fotosensibilizadores, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen acetona, benzofenona, 9-tioxantonina, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas, tales como hematoporfirina, ftalocianinas, clorofilas, rosa bengal y buckminsterfullerenos, por ejemplo, y derivados de estos compuestos.

Un compuesto quimioluminiscente (quimioluminiscente) es un compuesto que se puede activar químicamente 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 la 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 azoicos tal como luminol; y compuestos aromáticos que pueden formar endoperóxidos, por ejemplo. Como consecuencia de la reacción de activación, los quimioluminiscentes causan directa o indirectamente la emisión de luz.

En ciertas realizaciones, el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede ser una sustancia que experimenta una reacción química con oxígeno singlete para formar una especie intermedia metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete puede asociarse con el analito objetivo mediante cualquier método conocido en la técnica; por ejemplo, pero no a modo de limitación, la composición puede tener una segunda pareja de unión específica del analito asociada con el mismo que permite la asociación indirecta del compuesto quimioluminiscente al analito objetivo. La composición que comprende el compuesto quimioluminiscente puede ser excitada directamente por el compuesto quimioluminiscente activado; alternativamente, la composición puede comprender además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado. Los ejemplos particulares, no limitativos, de compuestos quimioluminiscentes y fotosensibilizadores que pueden utilizarse de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados se exponen en la patente de Estados Unidos Nº 5.340.716 (Ullman, et al.).

Los aspectos actualmente divulgados y reivindicados incluyen la presencia de dos composiciones quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete, y cualquiera de las composiciones activables por oxígeno singlete descritas anteriormente en este documento o contempladas de otro modo en el presente documento puede funcionar como la primera y segunda composiciones activables por oxígeno singlete. En ciertas realizaciones, puede ser deseable que las dos composiciones quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete sean la misma composición quimioluminiscente activable por oxígeno singlete. Por ejemplo, la misma composición quimioluminiscente activable

por oxígeno singlete se asoció con ambos anticuerpos de detección/fragmentos de unión en el ensayo representado gráficamente en la Figura 1, y por lo tanto la señal se detectó a una única longitud de onda. En otras realizaciones, puede ser deseable que las dos composiciones activables de oxígeno singlete sean diferentes entre sí. Cuando las composiciones difieren entre sí, la unión del primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión puede detectarse a diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, se podría utilizar una primera longitud de onda para detectar el extremo inferior de la curva, y una longitud de onda diferente para detectar el extremo superior de la curva.

Los sensibilizadores utilizados de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados pueden ser capaces de unirse indirectamente al analito objetivo mediante una asociación con estreptavidina. De esta forma, la biotina se asocia con un primer compañero de unión específico del analito, y la unión de la estreptavidina y la biotina, en combinación con la unión del primero compañero de unión específico del analito al analito objetivo, da como resultado la asociación indirecta del sensibilizador al analito objetivo. En un ejemplo no limitativo, el sensibilizador puede ser un fotosensibilizador, de manera que el sensibilizador se active por irradiación con luz.

En ciertas realizaciones, el primer anticuerpo/fragmento de unión y el segundo anticuerpo/fragmento de unión exhiben diferentes afinidades por el analito. Por ejemplo, uno de los dos anticuerpos/fragmentos de unión puede tener una menor afinidad por el analito, mientras que el otro anticuerpo/fragmento de unión tiene una mayor afinidad por el analito. En un ejemplo particular, no limitativo, el primer anticuerpo/fragmento de unión se puede considerar un anticuerpo de baja afinidad que se une específicamente al analito con una constante de disociación en un rango de  $10^{-6}$  M a  $10^{-10}$  M y el segundo anticuerpo/fragmento de unión se puede considerar un anticuerpo de alta afinidad que se une específicamente al analito con una constante de disociación en un rango de  $10^{-10}$  M a  $10^{-13}$  M.

Se puede utilizar cualquier relación de anticuerpo de alta afinidad/fragmento de unión a anticuerpo de baja afinidad/fragmento de unión, siempre que el ensayo sea capaz de funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados y proporcionar la linealidad deseada y rango dinámico. En realizaciones no limitativas particulares, el anticuerpo de alta afinidad/fragmento de unión puede estar presente como aproximadamente 5% a aproximadamente 20% de la combinación de los dos anticuerpos de detección/fragmentos de unión, mientras que el anticuerpo de baja afinidad/fragmento de unión puede estar presente como aproximadamente 80% a aproximadamente 95% del total de anticuerpos de detección presentes. Los ejemplos particulares no limitativos de relaciones de anticuerpo de alta afinidad/fragmento a anticuerpo de baja afinidad/fragmento que pueden utilizarse incluyen aproximadamente 5% (alta) a aproximadamente 95% (baja), aproximadamente 10% (alta) a aproximadamente 90% (baja), y aproximadamente 20% (alta) a aproximadamente 80% (baja).

El primer, segundo y tercer anticuerpo o fragmentos de unión de los mismos pueden proporcionarse en cualquier forma que permita que estos anticuerpos/fragmentos de unión funcionen de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Por ejemplo, cada uno del primero, segundo y tercer anticuerpos/fragmentos de unión puede ser un anticuerpo policlonal/fragmento de unión o un anticuerpo monoclonal/fragmento de unión. Además, cualquier combinación de diferentes tipos de anticuerpos/fragmentos de unión se puede utilizar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Por ejemplo, el primer y segundo anticuerpo/fragmentos de unión pueden ser anticuerpos monoclonales/fragmentos de unión, mientras que el tercer anticuerpo/fragmento de unión es un anticuerpo policlonal/fragmento de unión. Alternativamente, el primer y segundo anticuerpo/fragmentos de unión pueden ser anticuerpos policlonales/fragmentos de unión, mientras que el tercer anticuerpo/fragmento de unión es un anticuerpo monoclonal/fragmento de unión. En otra alternativa más, uno del primero y segundo anticuerpos/fragmentos de unión puede ser un anticuerpo policlonal/fragmento de unión, mientras que el otro es un anticuerpo monoclonal/fragmento de unión. En este ejemplo, el tercer anticuerpo/fragmento de unión puede ser policlonal o monoclonal.

Los anticuerpos son específicos para la troponina I cardíaca.

Como el analito a detectar es cTnI, los tres anticuerpos pueden reconocer cualquiera de los tres epítopos en la molécula de cTnI, siempre que los epítopos se coloquen como se describió anteriormente en este documento. Es decir, el primer y segundo epítopos deben solaparse al menos parcialmente entre sí de modo que el primer y segundo anticuerpos o sus fragmentos de unión no puedan unirse a una única molécula de analito; además, el tercer epítopo no debe solaparse con el primer epítopo ni con el segundo epítopo, por lo que el tercer anticuerpo o el fragmento de unión del mismo puede unirse a una molécula de analito a la que ya está unido el primer o segundo anticuerpo o el fragmento de unión del mismo. La secuencia completa de 210 aminoácidos de cTnI se ha asignado como la SEQ ID NO: 1 en este documento.

La Figura 4 contiene un mapa de varias regiones de epítopo en la secuencia de cTnI, que ilustra algunos de los diversos epítopos que se pueden utilizar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. En el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados, el analito a detectar es cTnI, y el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen específicamente a epítopos superpuestos dentro de una de las regiones A, B, C, D, E y F (es decir, las SEQ ID NOS: 2-7, respectivamente) de la Figura 4, mientras que el tercer anticuerpo/fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una región diferente. De acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados, el analito es Troponina I cardíaca y al menos una: (a) el primer y el segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región A (SEQ ID NO: 2), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de uno de las regiones BF (es decir, una de las SEQ ID NO: 3-7); (b) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región B (SEQ ID NO: 3), y el tercer

anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de una de las regiones A y CF (es decir, una de las SEQ ID NOS: 2 y 4-7); (c) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región C (SEQ ID NO: 4), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de una de las regiones AB y DF (es decir, una de las SEQ ID NOS: 2-3 y 5-7); (d) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región D (SEQ ID NO: 5), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de una de las regiones AC y EF (es decir, una de las SEQ ID NOS: 2-4 y 6-7); (e) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región E (SEQ ID NO: 6), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de una de las regiones AD y F (es decir, una de las SEQ ID NOS: 3-5 y 7); y (f) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región F (SEQ ID NO: 7), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de una de las regiones AE (es decir, una de las SEQ ID NOS: 2-6). En ejemplos no limitantes particulares, el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región A o la región B (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, respectivamente), y el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente a un epítopo dentro de la región C (SEQ ID NO: 4).

Ejemplos adicionales no limitantes de las combinaciones de epítopos/anticuerpo de cTnI utilizadas en inmunoensayos de cTnI de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente reivindicados incluyen los siguientes: (i) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a cualquiera de los epítopos de las SEQ ID NOS: 8, 9 y 11, mientras que el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo de SEQ ID NO: 10; (ii) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos de las SEQ ID NOS: 8 y 9, mientras que el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 10; (iii) el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos de las SEQ ID NOS: 12 y 13, mientras que el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 14. Combinaciones específicas de epítopos se ilustran en las Figuras 15-17 y se discutirán en detalle en los Ejemplos a continuación.

Cuando el analito a detectar (en una realización no reivindicada) es un péptido natriurético de tipo B (BNP), los tres anticuerpos pueden reconocer cualquiera de los tres epítopos en la molécula de BNP, siempre que los epítopos se posicionen tal como se describió anteriormente en este documento (es decir, el primer y segundo epítopos se superponen al menos parcialmente entre sí y el tercer epítopo no se superpone con el primero y el segundo epítopos). A una secuencia de 32 aminoácidos de BNP se le ha asignado la SEQ ID NO: 15 y se muestra en la Figura 18, junto con un ejemplo no limitativo de una combinación de epítopenos. En el ejemplo representado en la Figura 18 (y como se describe en detalle en la sección de Ejemplos más adelante), el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión de los mismos pueden unirse específicamente a los epítopos de las SEQ ID NOS: 16 y 17, mientras que el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 18.

Los reactivos de las composiciones/kits/métodos pueden proporcionarse en cualquier forma y/o formulación que les permita funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los componentes pueden estar en forma de una perla o formulación similar. Además, en ciertas realizaciones, puede ser deseable disponer los reactivos en forma de reactivos liofilizados de un solo uso. El uso de reactivos secos en dispositivos de microfluidos se describe en detalle en la publicación de la solicitud de patente WO 2013/078130 A1.

En ciertas realizaciones, múltiples componentes pueden estar dispuestos juntos en una única perla o formulación y/o liofilizados en una sola partícula. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, una sola perla puede incluir el primero y segundo componentes; es decir, una sola perla puede contener tanto al primer y el segundo anticuerpos/fragmentos de unión así como el compuesto o compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete asociados con los anticuerpos/fragmentos de unión. La perla única conteniendo ambos componentes puede ser liofilizada en una sola partícula o dispuesta en otra formulación.

Además, dos o más componentes que se disponen en perlas/formulaciones separadas pueden liofilizarse juntas. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los componentes primero y segundo (conteniendo el primer y el segundo anticuerpos/fragmentos de unión asociados con el compuesto o compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete) se pueden liofilizar juntas. En otro ejemplo no limitante, los componentes primero y segundo (conteniendo el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión asociados con el compuesto o compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete) y el tercer componente (conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión) se pueden liofilizar juntas como una sola partícula. Además, una sola partícula liofilizada puede contener combinaciones de múltiples tipos de perlas/formulaciones; es decir, una sola partícula liofilizada puede contener una mezcla de: (a) una única perla conteniendo ambos componentes primero y segundo; (b) una perla conteniendo solo el primer componente; y (c) una perla conteniendo solo el segundo componente.

Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente o contempladas de otro modo en el presente documento puede incluir además componentes adicionales, tales como, pero no limitados a, diluyentes, soluciones de lavado y/o excipientes (utilizados para la reconstitución de reactivos liofilizados). Además, cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento anteriormente o contempladas de otro modo en el presente documento también

pueden incluir un dispositivo de microfluidos en el que se desechan uno o más de los componentes descritos anteriormente.

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados incluyen además kits útiles para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito; en la invención el analito es Troponina I cardiaca y los componentes esenciales del kit se definen en las reivindicaciones. El kit puede contener adicionalmente cualquier combinación de los componentes/reactivos descritos anteriormente (incluyendo cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento anteriormente); además, el kit puede contener además otro reactivo o reactivos para realizar cualquiera de los ensayos particulares descritos o contemplados de otro modo en el presente documento. La naturaleza de estos reactivos adicionales dependerá del formato de ensayo particular, y su identificación está dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

Los componentes/reactivos pueden estar dispuestos cada uno en contenedores/compartimientos separados, o varios componentes/reactivos pueden combinarse en uno o más contenedores/compartimientos, dependiendo de la naturaleza competitiva de las constantes/eficiencias de unión al anticuerpo y/o la estabilidad de los componentes/reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo, tal como miembros sbp adicionales, miembros sps y reactivos auxiliares, por ejemplo. Además, el kit puede incluir un dispositivo de microfluidos en el que se disponen los componentes/reactivos.

Las cantidades relativas de los diversos componentes/reactivos en los kits pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los componentes/reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que deben ocurrir durante los métodos de ensayo y además optimizan sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los componentes/reactivos en el kit pueden proporcionarse en forma seca, tal como una partícula liofilizada (que incluye, entre otros, esferas, microtabletas, polvos, micropuntos, etc.), y el kit puede incluir además excipiente o excipientes para la disolución de los reactivos secos; de esta manera, se puede obtener una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados a partir de estos componentes. Se pueden incluir controles positivos y/o negativos con el kit. El kit puede incluir además un conjunto de instrucciones escritas que explican cómo usar el kit. Un kit de esta naturaleza se puede usar en cualquiera de los métodos descritos o contemplados en este documento.

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados se dirige adicionalmente a un dispositivo de microfluidos en el que se disponen las composiciones descritas anteriormente en este documento. El dispositivo de microfluidos puede tener una o más funciones manuales asociadas con él (es decir, donde se requiere pipetejar para agregar uno o más reactivos y/o movimiento de una mezcla entre dos compartimientos); alternativamente, el dispositivo de microfluidos puede ser un sistema completamente automático y cerrado en el que los reactivos necesarios se disponen en varios compartimientos durante la construcción del dispositivo de microfluidos (en donde los diversos compartimientos están en comunicación fluida continua (o pueden estar en comunicación fluida continua)), y por lo tanto, no se requiere manipulación manual de la muestra y/o reactivos para realizar el ensayo después de agregar la muestra al dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos comprende uno o más compartimientos conteniendo los tres o cuatro componentes descritos anteriormente en el presente documento (es decir, las tres composiciones conteniendo anticuerpos con o sin el sensibilizador; cuando el sensibilizador está presente, puede proporcionarse solo o puede estar asociado con la tercera composición conteniendo anticuerpos). El dispositivo puede estar provisto de cualquier número de compartimientos, cualquier disposición de compartimientos y cualquier distribución de los tres o cuatro componentes entre ellos, siempre que el dispositivo pueda funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados; En las Figuras se proporcionan ejemplos no limitativos de la estructura del dispositivo con fines ilustrativos únicamente. Cuando están provistos de múltiples compartimientos, los compartimientos pueden estar completamente separados entre sí, o uno o más compartimientos pueden ser capaces de estar en comunicación fluida entre sí.

El dispositivo de microfluidos puede incluir además una cámara de aplicación de muestra y/o un canal de entrada en el que se puede aplicar/disponer una muestra. La cámara de aplicación de muestra/canal de entrada puede estar en comunicación fluida con uno o más compartimientos del dispositivo de microfluidos. Además, cuando el dispositivo de microfluidos está provisto tanto con una cámara de aplicación de muestras y un canal de entrada, la cámara de aplicación de muestra puede estar en comunicación fluida con el canal de entrada, mientras que el canal de entrada puede estar en comunicación fluida con los uno o más compartimientos en los que se disponen los reactivos.

Se puede aplicar una muestra directamente en el compartimiento contenido los reactivos del ensayo, o la muestra puede pasar a través de la cámara de aplicación de muestra/canal de entrada antes de entrar en el compartimiento o compartimientos contenido el reactivo o reactivos del ensayo. Cuando la muestra pasa a través de uno o más componentes antes de alcanzar el compartimiento o compartimientos del ensayo, sustancialmente toda la muestra puede pasar y, por lo tanto, permanece sustancialmente intacta al alcanzar el compartimiento o compartimientos del ensayo. Alternativamente, solo partes de la muestra pueden alcanzar el compartimiento de ensayo. En una realización, esto puede ocurrir simplemente debido a restricciones de tamaño, peso y/o volumen en los compartimientos más adelante del compartimiento o compartimientos del ensayo; en otra realización, el dispositivo de microfluidos puede contener una o más estructuras presentes en la cámara de aplicación de muestras, el canal de entrada, un compartimiento más adelante del compartimiento o compartimientos del ensayo y/o cualquier conexión entre ellos que permita la separación de ciertos componentes de una muestra de la muestra total y/o el suministro de dichos componentes al compartimiento o compartimientos del ensayo.

En una realización, los tres o cuatro reactivos se disponen en un solo compartimiento del dispositivo de microfluidos. En otra realización, el dispositivo de microfluidos puede contener al menos dos compartimientos; el primer compartimiento puede contener las primeras tres composiciones (es decir, primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión asociados con composiciones activables por oxígeno singlete y el tercer anticuerpo/fragmento de unión),

5 mientras que el segundo compartimiento contiene el sensibilizador. Además, este dispositivo de microfluidos que comprende dos compartimientos puede comprender además un canal de entrada a través del cual se puede aplicar la muestra; en esta configuración, el primer compartimiento puede estar en comunicación fluida con el canal de entrada, y el segundo compartimiento puede de estar en comunicación fluida con al menos uno de los canales de entrada y el primer compartimiento. En otra realización, el dispositivo de microfluidos puede contener al menos tres  
10 compartimientos; el primero, segundo y tercero compartimientos pueden contener el primero, segundo y tercero componentes, respectivamente. Además, el primer anticuerpo/fragmento de unión (presente en el primer componente) se une con alta afinidad con el analito objetivo, mientras que el segundo anticuerpo/fragmento de unión (presente en el segundo componente) se une con baja afinidad con el analito objetivo. De esta manera, el anticuerpo de mayor  
15 afinidad/fragmento de unión entra en contacto con el analito antes que el anticuerpo de menor afinidad/fragmento de unión.

Cualquiera de los compartimientos del dispositivo de microfluidos puede sellarse para mantener el reactivo o los reactivos dispuestos en el mismo en un ambiente sustancialmente hermético hasta su uso; por ejemplo, los compartimientos conteniendo reactivo o reactivos liofilizados se pueden sellar para evitar cualquier reconstitución involuntaria del reactivo o reactivos. El canal de entrada y un compartimiento, así como dos compartimientos, pueden describirse como "capaces de estar en comunicación fluida" entre sí; esta expresión indica que el compartimiento o  
20 compartimientos todavía pueden estar sellados, pero los dos compartimientos son capaces de tener un flujo de fluido entre ellos cuando se perfora un sello formado allí o entre ellos.

Los dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados pueden proporcionarse con cualquier otra característica deseada conocida en la técnica o bien contemplada en este  
25 documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados pueden incluir además una cámara de lectura; la cámara de lectura puede ser un compartimiento conteniendo uno o más de los componentes del ensayo, o la cámara de lectura puede estar en comunicación fluida con uno o más compartimientos conteniendo el reactivo o reactivos del ensayo. El dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimientos que contengan otras soluciones, tales  
30 como, entre otras, soluciones de lavado, diluyentes, excipientes, soluciones de interferencia, controles positivos, controles negativos, controles de calidad, cualquier combinación de los mismos y similares. Por ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir uno o más compartimientos conteniendo un diluyente, y este compartimiento o  
35 compartimientos pueden estar en comunicación fluida con cualquier otro compartimiento o compartimientos del dispositivo. En otro ejemplo, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimientos conteniendo al menos un excipiente para la reconstitución de uno o más reactivos liofilizados, y el compartimiento o  
40 compartimientos pueden estar en comunicación fluida con cualquier otro compartimiento o compartimientos del dispositivo (tal como el compartimiento conteniendo el reactivo liofilizado). Además, el dispositivo de microfluidos puede incluir además uno o más compartimientos que contengan una solución de lavado, y el compartimiento o  
45 compartimientos pueden estar en comunicación fluida con cualquier otro compartimiento o compartimientos del dispositivo.

Además, cualquiera de los kits/dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en este documento pueden incluir múltiples ensayos multiplexados en un solo kit/dispositivo. Cuando están presentes múltiples ensayos, ambos  
50 pueden construirse y funcionar como se divulga en este documento. Alternativamente, un ensayo como se divulga en este documento se puede multiplexar con cualquier otro tipo de inmunoensayo de luminiscencia inducida conocido en la técnica (tal como, entre otros, la tecnología de inmunoensayo LOCI® descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.340.716 y en las solicitudes provisionales de Estados Unidos Nos. 61/787.735; 61/788.194; y 61/788.692; todas presentadas el 15 de marzo de 2013, que pueden estar contenidos dentro de los kits/dispositivos de microfluidos del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Cuando hay múltiples ensayos presentes en un solo kit/dispositivo de microfluidos, se pueden realizar dos o más ensayos de forma simultánea y/o secuencial (incluso total o parcialmente secuencialmente). Cuando se realizan dos o más ensayos a la vez, se puede desear utilizar dos compuestos quimioluminiscentes diferentes activables por oxígeno singlete. Cuando se realizan dos o más  
55 ensayos en paralelo (ya sea total o parcialmente secuencial), el mismo compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete se puede utilizar en ambos ensayos, y los dos ensayos se leen en diferentes puntos de tiempo.

Cuando están presentes múltiples ensayos en un único dispositivo de microfluidos, se pueden conectar múltiples canales de entrada a la cámara de aplicación de muestras. En ciertas realizaciones, una parte de la muestra puede pasarse 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 estructura o estructuras pueden estar presentes en la cámara de aplicación de la muestra, los canales de entrada y/o la conexión entre ellos que permite la separación de ciertos componentes de la muestra completa y el suministro de dichos componentes a los diferentes ensayos. Un ejemplo no limitativo de un dispositivo de distribución de muestra que puede ser utilizado de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados se describe en detalle en la solicitud provisional No. 61/790.580, presentada el 15 de marzo de 2013, titulada "Microfluidic Distributing Device".

El concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados se refiere adicionalmente a un método para detectar la presencia y/o concentración de un analito objetivo, en donde el analito es Tropinona I cardiaca en una

muestra (tal como, entre otros, sangre entera, células sanguíneas completas lisadas, o glóbulos rojos). En una realización, el método incluye las etapas de combinar, ya sea simultánea o total o parcialmente secuencialmente: una muestra sospechosa de contener el analito específico; las dos composiciones que comprenden compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete asociados con el primer y segundo anticuerpos/fragmentos de unión; la composición conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión, y el sensibilizador. La mezcla se incuba en condiciones que permiten que los tres anticuerpos/fragmentos de unión se unan al analito dentro de la muestra; esto da como resultado la formación de dos complejos en sándwich: un primer complejo en sándwich que comprende una molécula de analito que tiene la composición conteniendo el primer anticuerpo/fragmento de unión y la composición conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión que se une a la misma, y un segundo complejo en sándwich que comprende otra molécula de analito que tiene la composición conteniendo el segundo anticuerpo/fragmento de unión y la composición conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión unida a la misma. Si el sensibilizador no está ya asociado con la composición conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión, la incubación de la mezcla también da como resultado la asociación del sensibilizador con el primer y el segundo complejos en sándwich a través de la composición conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión presente en los complejos en sándwich, poniendo así al sensibilizador cerca de los compuestos quimioluminiscentes de las composiciones conteniendo el primero y segundo anticuerpo/fragmento de unión.

El sensibilizador se activa luego para generar un oxígeno singlete, en el que la activación del sensibilizador presente en el primer y segundo complejos en sándwich provoca la activación de los compuestos quimioluminiscentes presentes en el primer y segundo complejos en sándwich. Luego se determina la cantidad de quimioluminiscencia generada por los compuestos quimioluminiscentes activados presentes en el primer y segundo complejos en sándwich. Las etapas de unión/incubación, activación y/o determinación se pueden repetir opcionalmente durante un número deseado de veces. La presencia y/o concentración del analito se detecta analizando la cantidad de quimioluminiscencia producida de este modo, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

Como se mencionó anteriormente, la muestra y varios componentes del método se proporcionan en combinación (simultánea o secuencialmente). Cuando la muestra y los diversos componentes del método se agregan secuencialmente, el orden de adición de la muestra/componentes puede variar; una persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica puede determinar el orden particular deseado de adición de la muestra/diferentes componentes al ensayo. El orden de adición más simple, por supuesto, es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar la señal producida a partir de ellos. Alternativamente, la muestra y cada uno de los componentes, o grupos de componentes, pueden combinarse secuencialmente. En ciertas realizaciones, una etapa de incubación puede estar implicada después de la adición de la muestra y/o cada componente.

Cuando el sensibilizador es un fotosensibilizador, la etapa de activación puede definirse adicionalmente como la activación del fotosensibilizador a través de la irradiación con luz. Cuando al menos una de las composiciones primera y segunda comprende además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado, el método puede comprender además una etapa de medición de la cantidad de luz emitida por las moléculas fluorescentes para determinar la cantidad de analito en la muestra.

La muestra puede exponerse a una etapa de separación antes de la combinación con cualquiera de los reactivos de ensayo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede ser deseable separar el plasma, el suero o un tipo de célula específico (tal como, entre otros, los glóbulos rojos) de la muestra de sangre completa antes de comenzar el ensayo, de modo que los componentes presentes en la muestra de sangre completa no afecten la sensibilidad, el rango dinámico y/o el límite de detección del ensayo.

Se puede desear diluir la mezcla formada a partir de la etapa de incubación/unión antes de la activación del sensor, y así el método puede incluir además la etapa de agregar un diluyente a la mezcla incubada de muestra y reactivos. Existen múltiples factores que pueden contribuir a la señal de fondo, tal como, entre otros, los siguientes: (1) la unión no específica de dos composiciones de ensayo entre sí, y (2) la presencia de dos composiciones de ensayo no unidas que están simplemente muy cerca entre sí. Por estas razones, puede ser deseable diluir la mezcla de reacción final antes de la exposición a la luz para disociar las composiciones unidas no específicamente y aumentar la distancia media de partículas entre las composiciones no unidas.

Volviendo ahora a las realizaciones particulares mostradas en los Dibujos, las Figuras 5 y 6 representan dispositivos de microfluidos de "sistema abierto", donde se requieren una o más funciones manuales para la realización del ensayo (es decir, se requiere pipeteo para la adición de uno o más reactivos y/o movimiento de una mezcla entre dos compartimientos).

La Figura 5 representa un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el numeral 10 de referencia general e incluye una carcasa 12 que incluye un compartimiento 14. El compartimiento 14 contiene una cantidad predeterminada de cada una de la primera composición 16 (conteniendo un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete asociado con el primer anticuerpo/fragmento de unión), la segunda composición 18 (conteniendo un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete asociado con el segundo anticuerpo/fragmento de unión) y la tercera composición 20 (conteniendo el tercer anticuerpo/fragmento de unión). La tercera composición 20 puede incluir además un sensibilizador que está asociado con el tercer anticuerpo/fragmento de unión, o el compartimiento 14 puede contener además una cantidad predeterminada de sensibilizador 22 que está separada de

la tercera composición 20. Además, mientras que las cuatro composiciones 16, 18, 20 y 22 se representan como componentes separados, dos o más de estos componentes separados pueden liofilizarse juntos en una sola partícula.

Cuando se usa el dispositivo 10 de microfluidos de la Figura 5, una muestra se aplica manualmente (es decir, se pipeta) directamente en el compartimiento 14. Si se utiliza un diluyente, el diluyente también se puede aplicar manualmente (es decir, se pipeteó) en el compartimiento 14, tal como pero sin limitarse a, después de la adición de la muestra y/o la incubación de la mezcla de reacción. El compartimiento 14 puede funcionar tanto como una cámara de mezcla/incubación como una cámara de lectura, por lo que el sensibilizador se activa en el compartimiento 14 y la quimioluminiscencia así generada se mide directamente desde el compartimiento 14. Alternativamente, el compartimiento 14 puede funcionar simplemente como una cámara de mezcla y/o incubación, y la mezcla de reacción pueden retirarse del compartimiento 14 y agregarse a otro dispositivo en el que se realicen las etapas de activación y/o lectura. Es decir, el ensayo puede requerir el uso de dos dispositivos (chips): el dispositivo 10 así como un dispositivo separado sin conexión al dispositivo 10. De esta manera, la mezcla de reacción se incuba fuera del compartimiento 14 del dispositivo 10 y se transfiere al dispositivo separado.

La Figura 6 representa un dispositivo 10a de microfluidos que es similar al dispositivo de microfluidos 10 de la Figura 5, excepto como se divulga a continuación. El dispositivo 10a de microfluidos incluye una carcasa 12a que incluye un primer compartimiento 14a; sin embargo, la carcasa 12a comprende además un segundo compartimiento 24 y un tercero compartimiento 26. La primera composición 16a, la segunda composición 18a, la tercera composición 20a y el sensibilizador 22a se pueden dispersar entre los tres compartimientos 14a, 24 y 26. Solo con fines ilustrativos, las composiciones primera y segunda 16a y 18a se representan como si estuvieran dispuestas en el primer compartimiento 14a, mientras que la tercera composición 20a está dispuesta en el segundo compartimiento 24, y el sensibilizador 22a está dispuesto en el tercer compartimiento 26. Sin embargo, debe entenderse que cualquier orden de dispersión de las composiciones 16a, 18a, 20a y 22a (o 16a, 18a y 20a, cuando el sensibilizador 22a está incluido en la tercera composición 20a) entre los compartimientos 14a, 24, y 26 puede utilizarse, siempre que el ensayo pueda funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Además, mientras que las cuatro composiciones 16a, 18a, 20a y 22a se representan como componentes separados, dos o más de los componentes separados se pueden liofilizar juntos en una sola partícula.

Cuando se usa el dispositivo 10a de microfluidos de la Figura 6, una muestra se aplica manualmente (es decir, se pipeta) directamente en el compartimiento 14a y se deja incubar con las composiciones 16a y 18a dispuestas en el mismo. La mezcla de reacción del compartimiento 14a se retira luego del compartimiento 14a y se aplica directamente al compartimiento 24 y se deja incubar con la composición 20a. La mezcla de reacción del compartimiento 24 se retira luego del compartimiento 24 y se aplica directamente al compartimiento 26 y se deja incubar con el sensibilizador 22a. La mezcla de reacción del compartimiento 26 se retira luego del compartimiento 26 y se aplica directamente a la cámara 28 de lectura, en la que el sensibilizador 22a se activa en la cámara 28 de lectura y la quimioluminiscencia así generada se mide directamente desde la cámara 28 de lectura.

Se entenderá que el número de compartimientos de incubación/mezcla y el orden de disposición de los reactivos de ensayo dentro de los dispositivos de microfluidos de sistema abierto representados en las Figuras 5 y 6 son solo para fines de ilustración, y no deben interpretarse como limitantes. Mientras que las Figuras 5 y 6 representan dispositivos de microfluidos conteniendo uno o tres compartimientos de incubación/mezcla en los que se disponen los reactivos de ensayo, se entenderá que los dispositivos conteniendo uno, dos, tres o cuatro compartimientos de incubación/mezcla en los que se disponen los reactivos de ensayo están completamente contemplados dentro del alcance de los conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Además, cuando el dispositivo contiene dos o más compartimientos de incubación/mezcla, los reactivos de ensayo pueden dispersarse entre los dos o más compartimientos de incubación/mezcla en cualquier orden deseado, siempre que el ensayo pueda funcionar como se describe en este documento. Además, independientemente del número de compartimientos de incubación/mezcla presentes, el compartimiento de incubación/mezcla final también puede ser una cámara de lectura; alternativamente, una cámara de lectura también puede estar presente en el dispositivo de microfluidos además de las uno, dos, tres o cuatro cámaras de incubación/mezcla. También, el dispositivo de microfluidos puede contener además una o más estructuras adicionales, tales como, pero sin limitarse a, un compartimiento adicional en el que se puede disponer un excipiente y/o diluyente antes de la adición a uno o más de los compartimientos.

Las Figuras 7-12 representan dispositivos de microfluidos de "sistema cerrado" en los que los reactivos de ensayo necesarios se disponen en diversos compartimientos de los dispositivos de microfluidos durante la construcción de los mismos. Estos dispositivos de microfluidos comprenden un sistema totalmente automático y cerrado en el que no se requieren funciones manuales para realizar el ensayo después de agregar la muestra al dispositivo de microfluidos.

La Figura 7 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo 40 de microfluidos incluye una carcasa 42 que incluye un compartimiento 44 contenido la primera composición 46, la segunda composición 48 y la tercera composición 50. La tercera composición 50 puede incluir el sensibilizador asociado con el tercer anticuerpo/fragmento de unión, o el compartimiento 44 puede contener además una cantidad predeterminada de sensibilizador 52 separado de la tercera composición 50. Además, mientras que las cuatro composiciones 46, 48, 50 y 52 se representan como componentes separados, cualquiera de los componentes separados se puede liofilizar juntos en una partícula única.

La carcasa 42 incluye además una cámara 54 de aplicación de muestras y un canal 56 de entrada que conecta la cámara 44 de aplicación de muestras con el compartimiento 44. Una muestra (tal como, entre otras, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 54 de aplicación de muestras, que está (o puede estar en) comunicación fluida

con el canal 56 de entrada. El canal 56 de entrada está (o puede estar en) comunicación fluida con el compartimiento 44. El compartimiento 44 puede funcionar como cámara de mezcla/incubación y como cámara de lectura.

El canal 56 de entrada puede simplemente transferir una porción de la muestra al compartimiento 44, o el canal 56 de entrada puede contener una o más estructuras que permitan la separación de ciertos componentes de toda la muestra (es decir, filtro o filtros de separación que permiten la separación de plasma, suero o glóbulos rojos de una muestra de sangre completa aplicada a la cámara 54 de aplicación de la muestra) y/o la detección de degradación (tal como, por ejemplo, hemólisis) en la muestra.

Cualquiera de los dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en el presente documento pueden contar con compartimientos adicionales contenido otros reactivos/soluciones. Por ejemplo, la Figura 8 muestra un dispositivo 40a de microfluidos que es similar al dispositivo 40 de microfluidos de la Figura 7, excepto que el dispositivo 40a de microfluidos incluye además un segundo compartimiento 58 que está (o es capaz de estar en) comunicación fluida con la entrada canal 56a y/o el primer compartimiento 44a; el segundo compartimiento 58 contiene una cantidad predeterminada de al menos un reactivo 60, como un excipiente, diluyente, solución de lavado, etc. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, cuando las composiciones 50a, 52a, 54a y/o 56a están en la forma de reactivo o reactivos secos, la propia muestra puede utilizarse para reconstituir el reactivo o reactivos secos; alternativamente, el dispositivo de microfluidos puede contar con uno o más compartimientos contenido excipientes que pueden estar (o pueden estar en) comunicación fluida con el compartimiento o compartimientos contenido dicho reactivo o reactivos.

Cualquiera de los compartimientos de cualquiera de los dispositivos microfluidos descritos o bien contemplados en este documento puede estar sellados para mantener el reactivo o reactivos dispuestos en él en un entorno sustancialmente hermético al aire y/o sustancialmente hermético a la luz hasta su uso; por ejemplo, los compartimientos contenido reactivo o reactivos liofilizados se pueden sellar para evitar cualquier reconstitución involuntaria del reactivo y/o exposición de cualquiera de los reactivos a la luz. El canal de entrada y un primer compartimiento, así como dos compartimientos, pueden describirse como "capaces de comunicación fluida" entre sí; esta expresión indica que el compartimiento o compartimientos todavía pueden estar sellados, pero son capaces de tener un flujo de fluido entre ellos cuando se perfora un sello formado en el mismo.

Además, debe entenderse que cualquiera de los dispositivos de microfluidos descritos o bien contemplados en el presente documento pueden contar además con cámaras adicionales y/u otros circuitos de fluidos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cualquiera de los dispositivos de microfluidos puede contener adicionalmente una cámara o cámaras) de mezcla y/o un circuito o circuitos de fluidos que están dispuestos entre dos cámaras de reactivo.

La Figura 9 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el numeral general de referencia 80 y es similar a los dispositivos de microfluidos 10, 10a, 40 y 40a de las Figuras 5-8, excepto que el dispositivo 80 de microfluidos contiene dos compartimientos, y los reactivos de ensayo pueden estar divididos entre estos dos compartimientos

El dispositivo 80 de microfluidos incluye una carcasa 82 que incluye una cámara 84 de aplicación de muestras, un canal 86 de entrada, un primer compartimiento 88 y un segundo compartimiento 90. Una muestra (como, por ejemplo, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 84 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el canal 86 de entrada. El canal 86 de entrada está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el primer compartimiento 88. El primer compartimiento 88 se ilustra como contenido una cantidad predeterminada de cada una de la primera composición 92 y la segunda composición 94, y también puede contener una cantidad predeterminada de la tercera composición 96. El segundo compartimiento 90 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el primer compartimiento 88; el segundo compartimiento 90 se ilustra como contenido una cantidad predeterminada de sensibilizador 98. Aunque la tercera composición 96 se representa en la Figura 9 estando dispuesta en el primer compartimiento 88, debe entenderse que la tercera composición 96 puede estar dispuesta alternativamente en el segundo compartimiento 90. Además, mientras que la tercera composición 96 y el sensibilizador 98 se representan en la Figura 9 como dos componentes separados, se entenderá que una única composición puede estar presente en el segundo compartimiento 90 contenido tanto la tercera composición 96 como al sensibilizador 98.

El orden de disposición de los reactivos 92, 94, 96 y 98 en los compartimientos 88 y 90 es solo a modo de ejemplo y no debe considerarse limitativo. Los reactivos 92, 94, 96 y 98 pueden estar dispuestos en los compartimientos 88 y 90 en cualquier orden deseado. Además, mientras que las cuatro composiciones 92, 94, 96 y 98 se representan como componentes separados, cualquiera de los componentes separados puede liofilizarse juntos en una sola partícula y disponerse en cualquiera de los compartimientos 88 y 90.

El dispositivo 80 de microfluidos puede además estar provisto de uno o más compartimientos adicionales contenido reactivos adicionales (tales como, entre otros, diluyentes, excipientes, soluciones de lavado, etc.). Cuando se proporcionan uno o más compartimientos adicionales, los compartimientos pueden estar en (o pueden ser capaces de estar en) comunicación fluida con el primer compartimiento 88 y/o el segundo compartimiento 90.

En ciertas realizaciones, el compartimiento de un dispositivo de microfluidos contenido el sensibilizador (tal como el segundo compartimiento 90 del dispositivo 80 de microfluidos de la Figura 9) puede funcionar como una cámara de lectura. Alternativamente, puede estar presente un compartimiento adicional que esté en (o pueda estar en) comunicación fluida con el compartimiento contenido el sensibilizador, y este compartimiento adicional actúa como

una cámara de lectura. Por ejemplo, la Figura 10 ilustra un dispositivo 110 de microfluidos que comprende una carcasa 112 que incluye una cámara 114 de aplicación de muestras, un canal 116 de entrada, un primer compartimiento 118, un segundo compartimiento 120, una cámara 122 de lectura y un compartimiento 132 adicional. Una muestra (como, pero no limitada a, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 114 de aplicación de muestra, que está en

5 (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el canal 116 de entrada. El primer compartimiento 118 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el canal 116 de entrada, mientras que el segundo compartimiento 120 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el primer compartimiento 118. El primer y segundo compartimientos 118 y 120 se ilustran como conteniendo las composiciones 124, 126, 128 y 130 del ensayo, como se divulga con mayor detalle más adelante en el presente documento. La cámara 122 de lectura está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el segundo compartimiento 120. El compartimiento 132 adicional está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con uno o más del canal 116 de entrada, el primero compartimiento 118, el segundo compartimiento 120 y/o la cámara 122 de lectura. El compartimiento 132 adicional contiene una cantidad predeterminada de al menos un reactivo 134, tal como un excipiente, un diluyente, una solución de lavado, etc.

10 Solo a modo de ejemplo, el primer compartimiento 118 se ilustra como conteniendo una cantidad predeterminada de cada una de la primera composición 124, la segunda composición 126, y la tercera composición 128, y el segundo compartimiento 120 se ilustra como conteniendo una cantidad de sensibilizador 130. Sin embargo, debe entenderse que las cuatro composiciones 124, 126, 128 y 130 pueden disponerse en cualquier orden dentro del dispositivo 110 de microfluidos, siempre que el dispositivo 110 de microfluidos es capaz de funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la tercera composición 128 puede disponerse alternativamente en el segundo compartimiento 120. Además, mientras que la tercera composición 128 y el sensibilizador 130 se representan como dos componentes separados, se entenderá que la tercera la composición 128 y el sensibilizador 130 pueden asociarse entre sí antes de su disposición dentro del dispositivo 110 de microfluidos. Además, mientras que las cuatro composiciones 124, 126, 128 y 130 se representan como componentes separados, dos o más de los componentes separados pueden ser liofilizados juntos en una sola partícula y dispuestos en cualquiera de los compartimientos 118 o 120.

15 Los dispositivos 40, 40a y 80 de microfluidos de las Figuras 7-9 ilustran la disposición de las cuatro composiciones del ensayo dentro de un solo compartimiento, mientras que el dispositivo 110 de microfluidos de la Figura 10 ilustra la dispersión de las cuatro composiciones de ensayo entre dos compartimientos; sin embargo, debe entenderse que las cuatro composiciones de ensayo pueden estar dispersas entre tres o más compartimientos. Por ejemplo, la Figura 11 ilustra un dispositivo 110<sup>a</sup> de microfluidos que es similar al dispositivo 110 de microfluidos de la Figura 10, excepto como se describe en el presente documento a continuación. El dispositivo 110a de microfluidos comprende una carcasa 112a que incluye una cámara 114a de aplicación de muestras, un canal 116a de entrada, un primer compartimiento 118a, un segundo compartimiento 120a, un tercer compartimiento 136, una cámara 122a de lectura y un compartimiento 132a adicional. El primer, segundo y tercer compartimientos 118a, 120a y 136 están en (o son capaces de estar en) comunicación fluida entre sí como se ilustra en la Figura, y los compartimientos 118a, 120a y 136 se ilustran como conteniendo las composiciones 124a, 126a, 128a y 130a del ensayo, como se describe con mayor detalle en el presente documento a continuación. El tercer compartimiento 136 está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con la cámara 122a de lectura. El compartimiento 132a adicional está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con uno o más de los canales 116a de entrada, los compartimientos 118a, 120a y 136, y/o la cámara 122a de lectura. El compartimiento 132a adicional contiene una cantidad predeterminada de al menos un reactivo 134a, como un excipiente, diluyente, solución de lavado, etc.

20 Solo a modo de ejemplo, el primer compartimiento 118a se ilustra como conteniendo una cantidad predeterminada de cada una de las composiciones primera y segunda 124a y 126a, el segundo compartimiento 120a se ilustra como conteniendo una cantidad predeterminada de la tercera composición 128a, y el tercer compartimiento 136 se ilustra como conteniendo una cantidad predeterminada de sensibilizador 130a. Sin embargo, debe entenderse que las cuatro composiciones 124a, 126a, 128a y 130a pueden disponerse en cualquier orden dentro del dispositivo 110a de microfluidos, siempre que el dispositivo 110a de microfluidos sea capaz de funcionar de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. Además, mientras que la tercera composición 128a y el sensibilizador 130a se representan como dos componentes separados, se entenderá que la tercera composición 128a y el sensibilizador 130a pueden asociarse entre sí antes de la disposición dentro del dispositivo 110a de microfluidos. Además, mientras que las cuatro composiciones 124a, 126a, 128a y 130a se representan como componentes separados, dos o más de los componentes separados pueden liofilizarse juntos en una sola partícula y disponerse en cualquiera de los compartimientos 118a, 120a o 36.

25 Como se indica en el presente documento anteriormente, cualquiera de las estructuras de ensayo descritas en el presente documento anteriormente se puede multiplexar con un ensayo o ensayos adicionales en un solo dispositivo de microfluidos individual. La Figura 12 representa otra realización de un dispositivo de microfluidos construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos está indicado por el numeral general de referencia 200 y es similar a los dispositivos 10, 10a, 40, 40a, 80, 110 y 110a de microfluidos de las Figuras 5-11, excepto que el dispositivo 200 de microfluidos contiene múltiples compartimientos que proporcionan un formato de ensayo multiplexado. El dispositivo 200 de microfluidos incluye una carcasa 202 que incluye una cámara 204 de aplicación de muestras, un primer canal 206 de entrada, un segundo canal 208 de entrada, un primer compartimiento 210 y un segundo compartimiento 212. Una muestra (tal como, entre otros, una muestra de sangre) se puede aplicar a la cámara 204 de aplicación de muestras, que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con los canales 206 y 208 de entrada. El primer canal 206 de entrada está en (o es capaz de estar en) fluídico comunicación con el primer compartimiento 210. El primer canal 206 de entrada y el primer compartimiento

210 representan la estructura del ensayo descrita en forma detallada en el presente documento anteriormente, y la Figura 12 ilustra la realización más sencilla del mismo (es decir, en la que el primer compartimiento 210 contiene la primera, segunda y tercera composiciones 214, 216 y 218, y un sensibilizador 220). Si bien esta estructura de ensayo representada es similar a la representada en la Figura 7, debe entenderse que cualquiera de las otras estructuras de ensayo descritas en el presente documento anteriormente o bien contempladas en el presente documento pueden utilizarse en el dispositivo de microfluidos del ensayo multiplexado.

El dispositivo 200 de microfluidos también está provisto de un segundo canal 208 de entrada que está en (o es capaz de estar en) comunicación fluida con el segundo compartimiento 212. El segundo 208 canal de entrada y el segundo compartimiento 212 se representan simplemente para ilustrar la presencia de una segunda estructura de ensayo; debe entenderse que cualquier estructura/arquitectura del ensayo se puede multiplexar con cualquiera de los ensayos descritos o bien contemplados allí, y por lo tanto, pueden estar presentes múltiples compartimientos según sea necesario para proporcionar la estructura requerida asociada con el segundo ensayo. Además, también debe entenderse que el segundo compartimiento 212 puede estar provisto de reactivos similares a los presentes en el primer compartimiento 210, de modo que múltiples ensayos que detectan diferentes analitos por el mismo mecanismo de ensayo estén presentes en el mismo dispositivo de microfluidos. Alternativamente, el segundo compartimiento 212 puede representar un formato de ensayo completamente diferente; el único requisito es que este segundo formato de ensayo pueda ser multiplexado con uno de los ensayos descritos en este documento.

### **Ejemplos**

Se proporcionan ejemplos a continuación. Sin embargo, se debe entender que el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados no están limitado en su aplicación a la experimentación específica, resultados y procedimientos de laboratorio. Más bien, los ejemplos se proporcionan simplemente como una de varias realizaciones y pretenden ser ejemplos, no exhaustivos.

#### **Ejemplo 1**

La Figura 13 contiene fotografías de una realización de un dispositivo de microfluidos de sistema abierto construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos que se muestra en la Figura 13 contiene una arquitectura básica similar a aquella del dispositivo 10a de microfluidos que se muestra en la Figura 6. El compartimiento etiquetado como "celda óptica" en la Figura 13 representa la cámara 28 de lectura del dispositivo 10a de microfluidos, mientras que los "pozos de reacción conteniendo reactivos liofilizados" representan el primer, segundo y tercer compartimientos 14a, 24 y 26 del dispositivo 10a de microfluidos.

La muestra se agrega manualmente a un primer pozo de reacción y se incuba con el componente o componentes de ensayo contenidos allí, y luego la mezcla de reacción/incubación resultante se transfiere manualmente a otro pozo para la incubación con el componente o componentes de ensayo contenidos allí. La mezcla final de reacción/incubación se transfiere manualmente a la célula óptica para la activación del sensibilizador. Un diluyente se puede agregar manualmente a la mezcla de reacción/incubación en cualquier punto (o puntos múltiples); es decir, se puede agregar un diluyente a cualquier pozo o pozos de reacción y/o a la celda óptica.

#### **Ejemplo 2**

La Figura 14 contiene fotografías de una realización de un dispositivo de microfluidos de sistema cerrado construido de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. El dispositivo de microfluidos que se muestra en la Figura 14 contiene una arquitectura básica similar a la del dispositivo 110a de microfluidos que se muestra en la Figura 11. El compartimiento etiquetado como "celda óptica" en la Figura 14 representa la cámara 122a de lectura del dispositivo 110a de microfluidos, mientras que las "esferas de reactivo liofilizadas empacadas en los pozos de reacción" representan las composiciones 124a, 126a, 128a y 130a dispuestas en el primero, segundo y tercer compartimientos 118a, 120a y 136 del dispositivo 110a de microfluidos. Además, el compartimiento etiquetado como "diluyente" representa el compartimiento 132a adicional que contiene el reactivo 134a.

Además, la Figura 14 ilustra la presencia de estructuras adicionales que se colocan más adelante de los reactivos del ensayo y que permiten la separación de ciertos componentes de una muestra a partir de una muestra entera y/o el suministro de dichos componentes al compartimiento o compartimentos del ensayo. Estos componentes incluyen una cámara de separación de plasma (que se puede incluir como parte de la cámara 114a de aplicación de muestra en la Figura 11) y un canal de medición (que se puede incluir como parte del canal 116a de entrada en la Figura 11).

#### **Ejemplo 3**

Este ejemplo proporciona una combinación de epítopenos para uso en inmunoensayos de cTnI que utilizan tres anticuerpos/fragmentos de unión, de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados reivindicados. En ciertas realizaciones, se desea que los tres epítopenos estén localizados dentro del interior (sección central) de la secuencia de cTnI, ya que el extremo N y el extremo C de la molécula de cTnI están sujetos a proteólisis tanto por proteasas presentes en el miocardio necrótico como en el plasma del paciente.

En el inmunoensayo de cTnI ilustrado en la Figura 15, el primer y segundo anticuerpo/fragmentos de unión se unen a epítopenos superpuestos dentro de la región B de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 3), mientras que el tercer

anticuerpo/fragmento de unión se une a una epítopo dentro de la región C de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 4). En particular, el primer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 8, y el segundo anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 9. Los epítopos de las SEQ ID NOS: 8 y 9 son ambos epítopos lineales que están formados por una secuencia de aminoácidos continua de cTnI. Las SEQ ID NOS: 8 y 9 se superponen entre sí desde un punto de vista lineal, y un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 9 no pueden unirse a cTnI cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce específicamente la SEQ ID NO: 8 se une a la misma; igualmente, y un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 8 no puede unirse a cTnI cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce específicamente la SEQ ID NO: 9 se une a la misma. El tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo lineal de la SEQ ID NO: 10. La SEQ ID NO: 10 no se superpone con ninguna de las SEQ ID NO: 8 o 9, por lo que un anticuerpo/fragmento de unión unido al epítopo de la SEQ ID NO: 8 o 9 no interfiere con la unión de otro anticuerpo/fragmento de unión al epítopo de la SEQ ID NO: 10; por lo tanto, el tercer anticuerpo/fragmento de unión y uno del primero y segundo anticuerpos/fragmentos de unión pueden unirse ambos a una única molécula de cTnI.

#### **15 Ejemplo 4**

Este ejemplo proporciona otra combinación de epítopos para uso en inmunoensayos de cTnI que utilizan tres anticuerpos/fragmentos de unión, de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados reivindicados. En el inmunoensayo de cTnI ilustrado en la Figura 16, el primer y segundo anticuerpo/fragmentos de unión se unen a epítopos superpuestos dentro de la región B de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 3), mientras que el tercer anticuerpo/fragmento de unión se une a un epítopo dentro de la región C de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 4). En particular, el primer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 9, y el segundo anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 11. Los epítopos de las SEQ ID NO: 9 y 11 son ambos epítopos de aminoácidos lineales que están formados cada uno por una secuencia continua de aminoácidos de cTnI. Las SEQ ID NOS: 9 y 11 se superponen entre sí desde un punto de vista lineal, y un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 11 no puede unirse a cTnI cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce específicamente la SEQ ID NO: 9 se une a la misma; del mismo modo, un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 9 no puede unirse a cTnI cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce específicamente la SEQ ID NO: 11 está unido a la misma. El tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo lineal de la SEQ ID NO: 10. La SEQ ID NO: 10 no se superpone con ninguna de las SEQ ID NO: 9 u 11, de modo que un anticuerpo/fragmento de unión unido al epítopo de la SEQ ID NO: 9 u 11 no interfiere con la unión de otro anticuerpo/fragmento de unión al epítopo de la SEQ ID NO: 10; por lo tanto, el tercer anticuerpo/fragmento de unión y uno del primero y segundo anticuerpo/fragmentos de unión pueden ambos unirse a una única molécula de cTnI.

#### **Ejemplo 5 (no de acuerdo con las reivindicaciones)**

Este ejemplo proporciona aún otra combinación de epítopo para uso en inmunoensayos de cTnI que utilizan tres anticuerpos/fragmentos de unión. En el inmunoensayo de cTnI ilustrado en la Figura 17, el primer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 12 en la región A del epítopo de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 2), el segundo anticuerpo/fragmento de unión específicamente se une al epítopo de la SEQ ID NO: 13 en la región F del epítopo de la Figura 4 (es decir, la SEQ ID NO: 7), y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 14 en la región B del epítopo de la Figura 4 (es decir, SEQ ID NO: 3). Mientras que los epítopos de las SEQ ID NOS: 12 y 13 no pueden superponerse desde una perspectiva estructural lineal, estos dos epítopos pueden solaparse en la estructura conformacional tridimensional de la molécula de cTnI.

Esta combinación de epítopos proporciona una forma alternativa de obtener una mayor sensibilidad para el inmunoensayo de cTnI. En este caso, un anticuerpo de captura/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 12, que se encuentra en la sección N-terminal procesada inestable de la molécula de cTnI, mientras que el otro anticuerpo de captura/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 13, que se encuentra en la sección C-terminal procesada e inestable de la molécula de cTnI. Sin embargo, el anticuerpo detector/fragmento de unión se une al epítopo de la SEQ ID NO: 14, que se encuentra en la sección central estable de la molécula.

#### **Ejemplo 6 (no de acuerdo con las reivindicaciones)**

Este ejemplo proporciona una combinación de epítopos para su uso en inmunoensayos de BNP que utilizan tres anticuerpos/fragmentos de unión, de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados. La Figura 18 representa la secuencia de 32 aminoácidos de BNP (asignada a la SEQ ID NO: 15) y los tres epítopos de este ejemplo no limitativo.

En particular, el primer anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 16, y el segundo anticuerpo/fragmento de unión se une específicamente al epítopo de la SEQ ID NO: 17. Los epítopos de las SEQ ID NOS: 16 y 17 son ambos epítopos lineales que están formados por una secuencia de aminoácidos continua de BNP. Las SEQ ID NOS: 16 y 17 se superponen entre sí, y un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 17 no se puede unir a BNP cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce específicamente a la SEQ ID NO: 16 está unida a la misma; igualmente, un anticuerpo/fragmento de unión que se une específicamente a la SEQ ID NO: 16 no puede unirse a BNP cuando un anticuerpo/fragmento de unión que reconoce

específicamente la SEQ ID NO: 17 está unido a la misma. El tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente al epítopo lineal de la SEQ ID NO: 18. La SEQ ID NO: 18 no se superpone con ninguna de las SEQ ID NOS: 16 o 17, por lo que un anticuerpo/fragmento de unión unido al epítopo de la SEQ ID NO: 16 o 17 no interfiere con la unión de otro anticuerpo/fragmento de unión al epítopo de SEQ ID NO: 18. Por lo tanto, el tercer anticuerpo/fragmento de unión y uno del primero y segundo anticuerpo/fragmentos de unión pueden ambos unirse a una única molécula de BNP.

Por lo tanto, de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados, se han proporcionado composiciones que comprenden un sistema quimioluminiscente, en kits y dispositivos de microfluidos que contienen los mismos y sus métodos de uso, que satisfacen plenamente los objetivos y las ventajas expuestas en este documento anteriormente.

## Listado de secuencias

&lt;110&gt; Li, Jay J.

Ledden, David J

Cowden, Eric Scott

15 Lu, Donglai

## &lt;120&gt; INMUNOENSAYO DE CANALIZACIÓN DE OXÍGENO LUMINISCENTE UTILIZANDO TRES ANTICUERPOS Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LOS MISMOS

&lt;130&gt; 2014P07114WO

&lt;150&gt; US61/970596

20 &lt;151&gt; 2014-03-26

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; BiSSAP 1.3.6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 210

25 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

```

Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
1           5          10          15
Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
20          25          30
Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
35          40          45
Leu Lys Thr Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu
50          55          60
Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys
65          70          75          80
Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu
85          90          95
Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr
100         105         110
Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu
115         120         125
Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu
130         135         140
Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly
145         150         155         160
Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val
165         170         175
Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg
180         185         190
Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe
195         200         205
Glu Ser
210

```

ES 2 884 930 T3

<210> 2  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 2  
Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr  
1 5 10 15  
Arg Ala  
<210> 3  
<211> 14  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 3  
Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser  
1 5 10  
<210> 4  
15 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 4  
Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln  
1 5 10 15  
20 <210> 5  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 5  
Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp  
25 1 5 10  
<210> 6  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
30 <400> 6  
Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu  
1 5 10 15  
Asn Arg Glu Val  
20  
<210> 7  
<211> 8  
<212> PRT  
35 <213> Homo sapiens

ES 2 884 930 T3

<400> 7  
Gly Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp  
1 5  
<210> 8  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 8  
Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu  
1 5  
<210> 9  
10 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 9  
Ala Thr Glu Pro His  
1 5  
15 <210> 10  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 10  
Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln Leu Lys Thr Leu Leu Gln  
20 1 5 10 15  
<210> 11  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 11  
Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser  
1 5 10  
<210> 12  
<211> 13  
<212> PRT  
30 <213> Homo sapiens  
<400> 12  
Arg Ala Tyr Ala Thr Glu Pro His Ala Lys Lys Lys Ser  
1 5 10  
<210> 13  
<211> 9  
35 <212> PRT

ES 2 884 930 T3

<213> Homo sapiens  
<400> 13  
Val Gly Asp Trp Arg Lys Asn Ile Asp  
1 5  
<210> 14  
5 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 14  
Glu Pro Arg Pro Ala Pro Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr  
10 1 5 10 15  
<210> 15  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15 <400> 15  
Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1 5 10 15  
Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
20 25 30  
<210> 16  
<211> 6  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 16  
Lys Val Leu Arg Arg His  
1 5  
<210> 17  
<211> 7  
25 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 17  
Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
1 5  
<210> 18  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 18  
Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un kit que contiene un sistema de detección quimioluminiscente para un analito específico, comprendiendo el kit:

(a) una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en el que el primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un primer epítopo del analito, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente al analito a través del primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo;

(b) una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un segundo epítopo del analito, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente al analito a través del segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo, y en donde el primer y segundo epítopos se superponen al menos parcialmente de tal manera que el primer y segundo anticuerpo o fragmentos de unión del mismo no pueden unirse a una sola molécula del analito; y

(c) una tercera composición que comprende un tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, siendo el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo un anticuerpo de captura que se une específicamente a un tercer epítopo del analito que no se superpone con el primer y segundo epítopos, por lo que una única molécula de analito puede unirse al tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo y uno del primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión del mismo, y en donde el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es capaz de asociarse con un sensibilizador capaz de generar oxígeno singlete en su estado excitado, por lo que la asociación del tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo con el sensibilizador permite la unión indirecta del sensibilizador al analito,

y comprendiendo además el sensibilizador,

en el que el primer anticuerpo o fragmento de unión y el segundo anticuerpo o fragmento de unión exhiben diferentes afinidades por el analito, uno de los dos anticuerpos o fragmento de unión tiene una afinidad más baja por el analito, mientras que el otro anticuerpo o fragmento de unión tiene una mayor afinidad por el analito,

donde el analito es troponina I cardíaca y donde al menos uno de:

(I) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 2, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 3-7;

(II) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 3, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2 y 4-7;

(III) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 4, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-3 y 5- 7;

(IV) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 5, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-4 y 6- 7;

(V) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 6, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-5 y 7; y

(VI) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 7, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-6.

2. El kit de la reivindicación 1, en el que la tercera composición comprende además el sensibilizador asociado con el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo.

3. El kit de las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos una de las composiciones primera y segunda comprende además al menos una molécula fluorescente que es excitada por el compuesto quimioluminiscente activado.

4. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de (a) - (c) se define además como estando en la forma de un reactivo liofilizado.

5. El kit de la reivindicación 4, que comprende además un excipiente para la reconstitución del reactivo liofilizado.

6. Un dispositivo de microfluidos, que comprende:

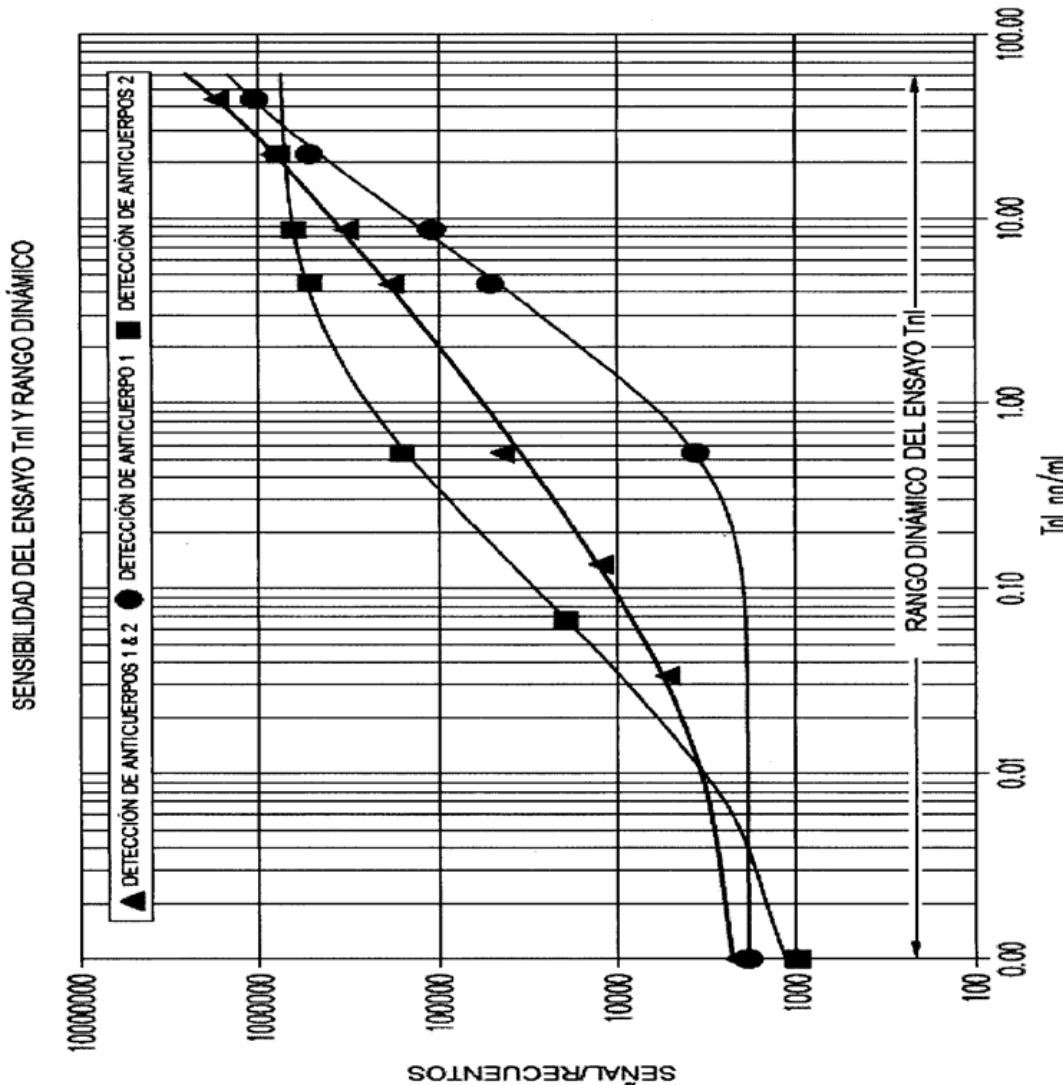
al menos un compartimiento que contiene:

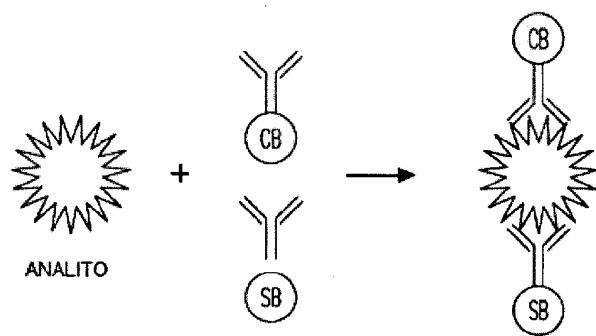
- (i) una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un primer epítopo de un analito específico, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente al analito a través del primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo;
- (ii) una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con él, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un segundo epítopo del analito, por lo que el compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete es capaz de unirse indirectamente al analito a través del segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo, y en donde el primer y segundo epítopos se superponen al menos parcialmente de tal manera que el primer y segundo anticuerpo o fragmentos de unión del mismo no pueden unirse a una sola molécula de analito; y
- (iii) una tercera composición que comprende un tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de captura que se une específicamente a un tercer epítopo del analito que no se superpone con el primer y segundo epítopos, por lo que una única molécula de analito puede unirse al tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo y uno de los primeros y segundos anticuerpos o fragmentos de unión del mismo; y
- (iv) un sensibilizador capaz de asociarse con el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, pudiendo el sensibilizador generar oxígeno singlete en su estado excitado, y en el que la asociación del tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo con el sensibilizador permite la unión indirecta del sensibilizador con el analito,
- en donde el primer anticuerpo o fragmento de unión y el segundo anticuerpo o fragmento de unión exhiben diferentes afinidades por el analito, uno de los dos anticuerpos o fragmento de unión tiene una afinidad más baja por el analito, mientras que el otro anticuerpo o fragmento de unión tiene una mayor afinidad por el analito,
- donde el analito es troponina I cardíaca y donde al menos uno de:
- (a) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 2, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 3-7;
- (b) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 3, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2 y 4-7;
- (c) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 4, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-3 y 5- 7;
- (d) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 5, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-4 y 6- 7;
- (e) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 6, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-5 y 7; y
- (f) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 7, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-6.
7. El dispositivo de microfluidos de la reivindicación 6, que comprende además un canal de entrada a través del cual se puede disponer una muestra, en el que al menos un compartimiento es capaz de estar en comunicación fluida con el canal de entrada.
8. El dispositivo de microfluidos de la reivindicación 7, definido además como que comprende al menos dos compartimientos, en el que un primer compartimiento contiene (i), (ii), y (iii), y en el que un segundo compartimiento contiene (iv).
9. El dispositivo de microfluidos de la reivindicación 8, que comprende además un canal de entrada a través del cual se puede disponer una muestra, en el que el primer compartimiento puede estar en comunicación fluida con el canal de entrada, y en el que el segundo compartimiento puede estar en comunicación fluida con al menos uno de los canales de entrada y el primer compartimiento.
10. El dispositivo de microfluidos de cualquiera de las reivindicaciones 6-9, que comprende además al menos un compartimiento adicional capaz de estar en comunicación fluida con al menos uno de los canales de entrada y al menos un compartimiento, y en el que al menos un compartimiento adicional contiene un diluyente.

11. Un método para detectar la presencia y/o concentración de un analito específico en una muestra, que comprende las etapas de:
- (a) combinar, ya sea simultánea o total o parcialmente secuencialmente:
    - (i) una muestra sospechosa de contener el analito específico;
    - 5 (ii) una primera composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con el mismo, en el que el primer anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un primer epítopo de un analito específico;
    - 10 (iii) una segunda composición que comprende un compuesto quimioluminiscente activable por oxígeno singlete y un segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo asociado con él, en donde el segundo anticuerpo o fragmento de unión del mismo es un anticuerpo de detección que se une específicamente a un segundo epítopo del analito, y en donde el primer y segundo epítopos se superponen, al menos parcialmente, de manera que el primer y segundo anticuerpo o fragmentos de unión de los mismos no pueden unirse a una única molécula de analito;
    - 15 (iv) una tercera composición que comprende un tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, siendo el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo un anticuerpo de captura que se une específicamente a un tercer epítopo del analito que no se superpone con el primer y segundo epítopos, por lo que una única molécula del analito puede unirse al tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo y uno del primero y segundo anticuerpos o fragmentos de unión del mismo; y
    - 20 (v) un sensibilizador capaz de asociarse con el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo, pudiendo el sensibilizador generar oxígeno singlete en su estado excitado;
  - (b) permitir la unión de (ii), (iii) y/o (iv) al analito dentro de la muestra, en donde se forma un primer complejo en sándwich que comprende una molécula de analito y (ii) y (iv), y se forma un segundo complejo en sándwich que comprende otra molécula de analito y (iii) y (iv), y en donde (v) se asocia con (iv) en el primer y segundo complejo en sándwich, lo que hace que el sensibilizador se acerque mucho a los compuestos quimioluminiscentes de (ii) y (iii);
  - 25 (c) activar el sensibilizador para generar oxígeno singlete, en el que la activación del sensibilizador presente en el primer y segundo complejos en sándwich provoca la activación de los compuestos quimioluminiscentes presentes en el primer y segundo complejos en sándwich;
  - (d) determinar la cantidad de quimioluminiscencia generada por los compuestos quimioluminiscentes activados presentes en el primero y segundo complejos en sándwich;
  - 30 y
    - (e) detectar la presencia y/o concentración del analito analizando la cantidad de quimioluminiscencia así producida, en donde la cantidad de quimioluminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra, en el que el primer anticuerpo o fragmento de unión y el segundo anticuerpo o el fragmento de unión exhiben diferentes afinidades por el analito, uno de los dos anticuerpos o fragmentos de unión tienen una menor afinidad por el analito, mientras que el otro anticuerpo o fragmento de unión tiene una mayor afinidad por el analito,
    - 35 donde el analito es troponina I cardíaca y donde al menos uno de:
      - (I) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 2, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 3-7; o
      - 40 (II) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 3, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2 y 4-7; o
      - (III) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 4, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-3 y 5- 7; o
      - 45 (IV) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 5, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-4 y 6- 7; o
      - (V) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 6, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-5 y 7; o

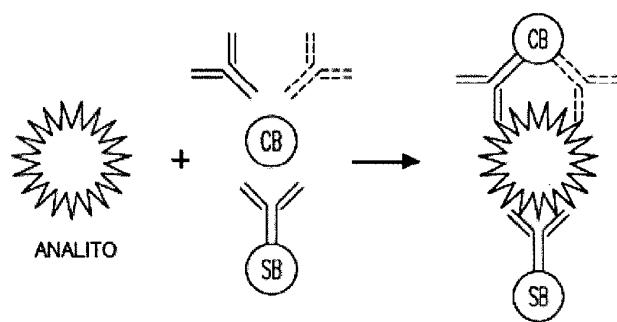
(VI) el primer y segundo anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos se unen específicamente a los epítopos superpuestos dentro de la SEQ ID NO: 7, y el tercer anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une específicamente a un epítopo dentro de una de las SEQ ID NOS: 2-6.

- 5      12. El método de la reivindicación 11, en el que el sensibilizador es un fotosensibilizador, y en el que la etapa (c) se define adicionalmente como la activación del fotosensibilizador a través de la irradiación con luz.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende además una etapa para exponer la muestra a una etapa de separación antes de combinarla con cualquiera de (ii) - (v).
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que los compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete de la primera y segunda composiciones son iguales.
- 10     15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que los compuestos quimioluminiscentes activables por oxígeno singlete de la primera y segunda composiciones son diferentes.
16. El método de la reivindicación 11, en el que se repiten las etapas (b) - (d).

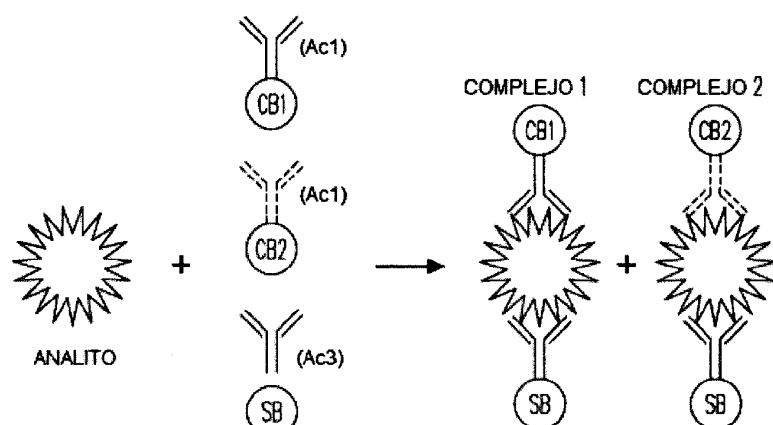
**FIG. 1**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 3**

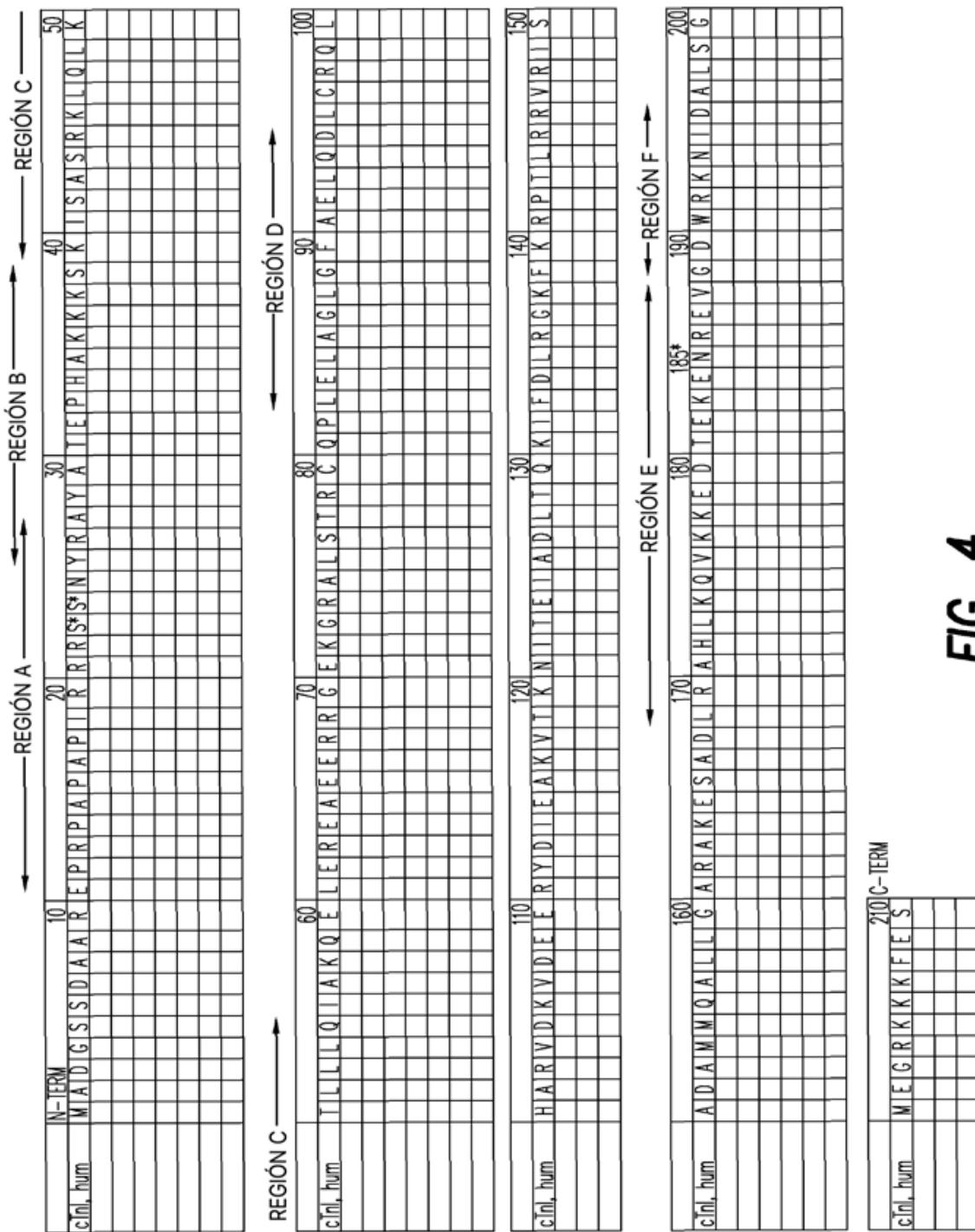
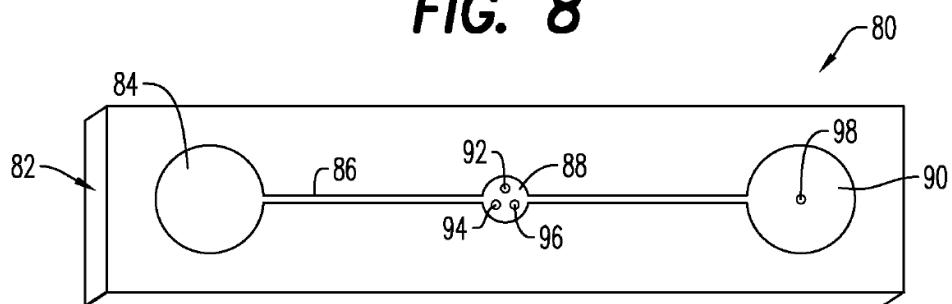
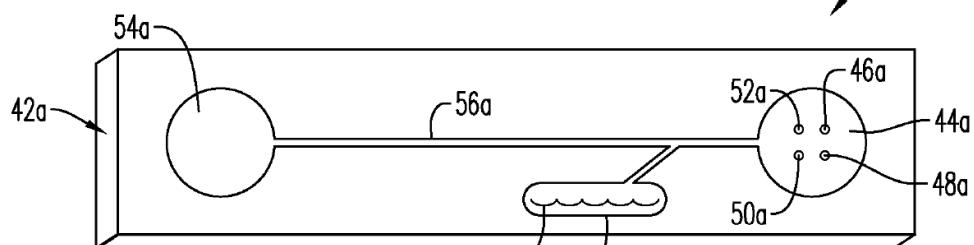
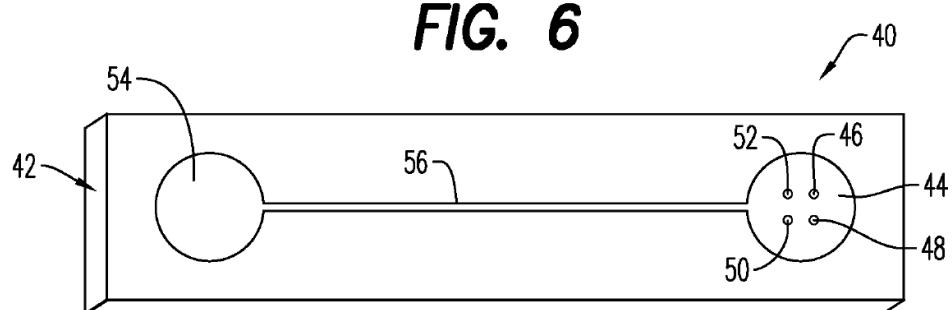
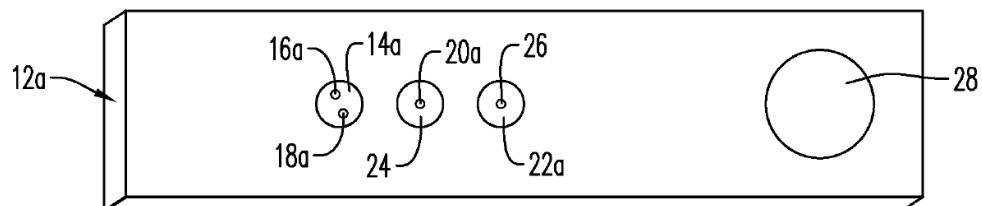
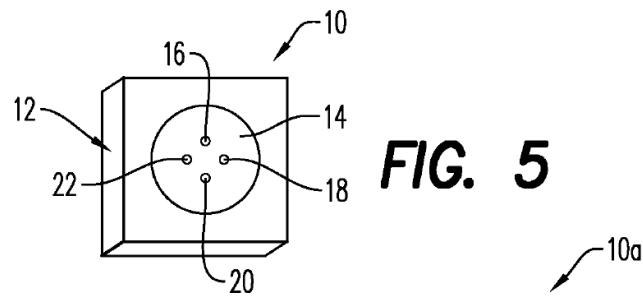
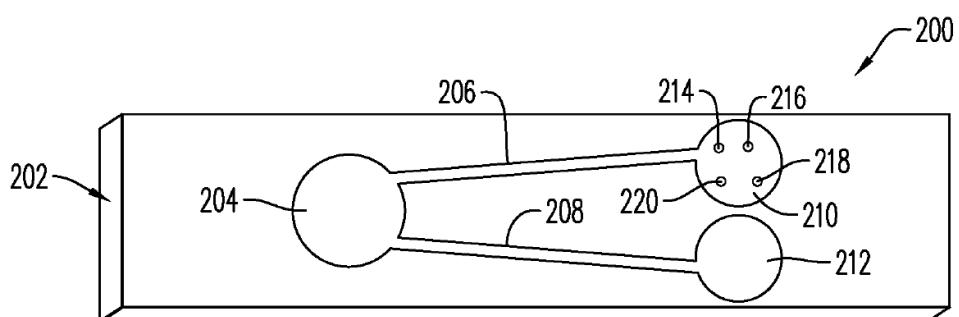
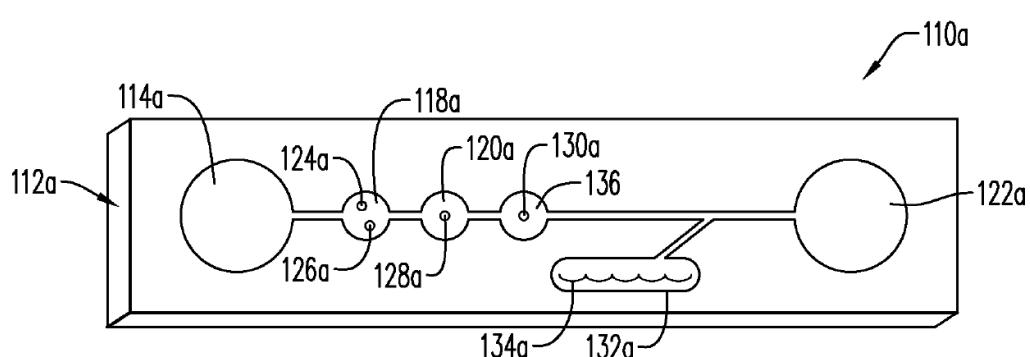
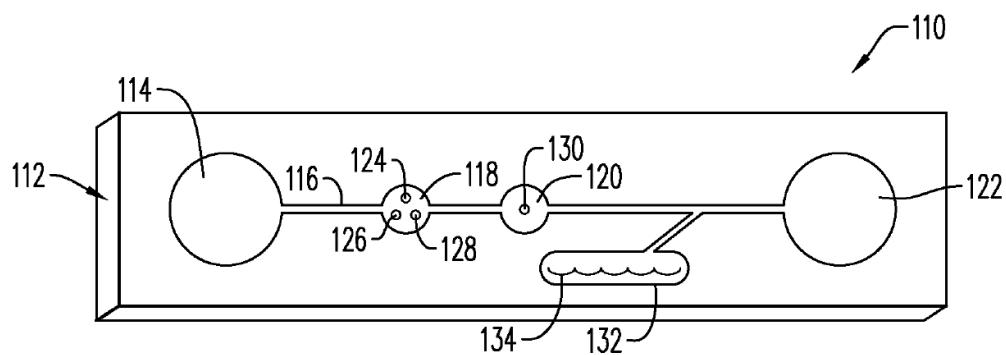
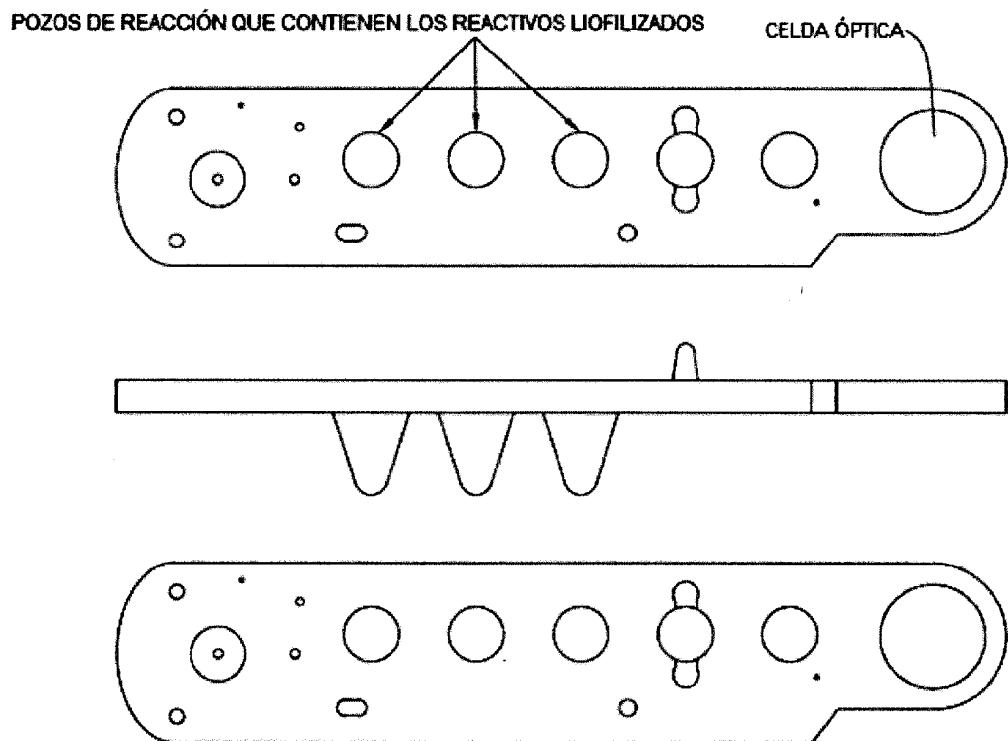


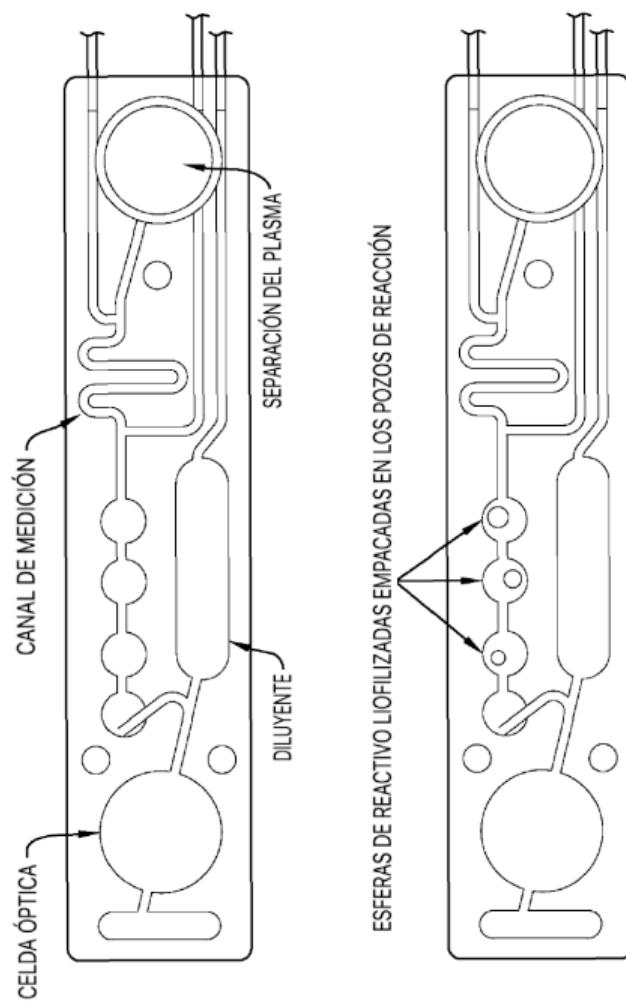
FIG. 4







**FIG. 13**



**FIG. 14**

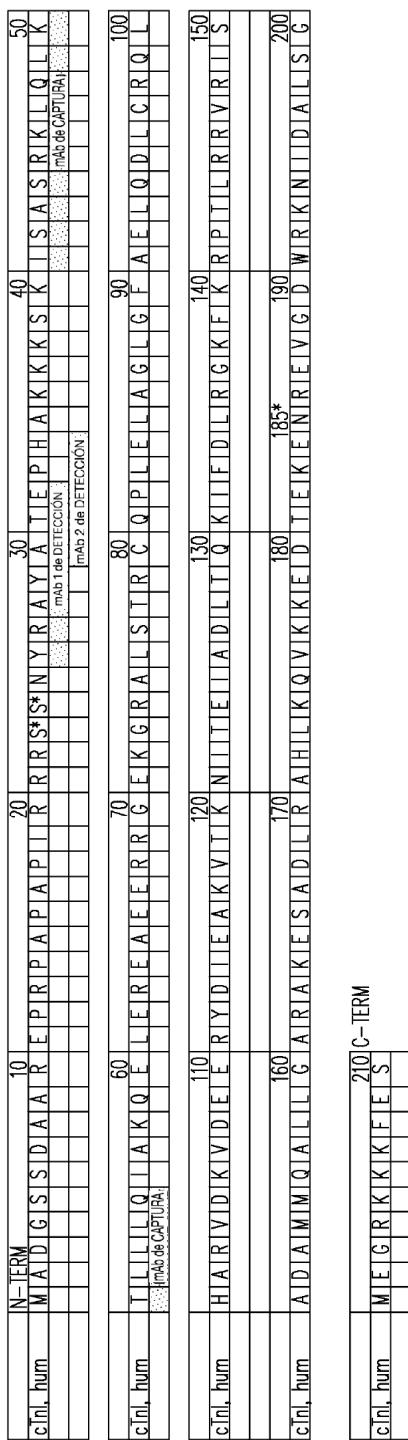
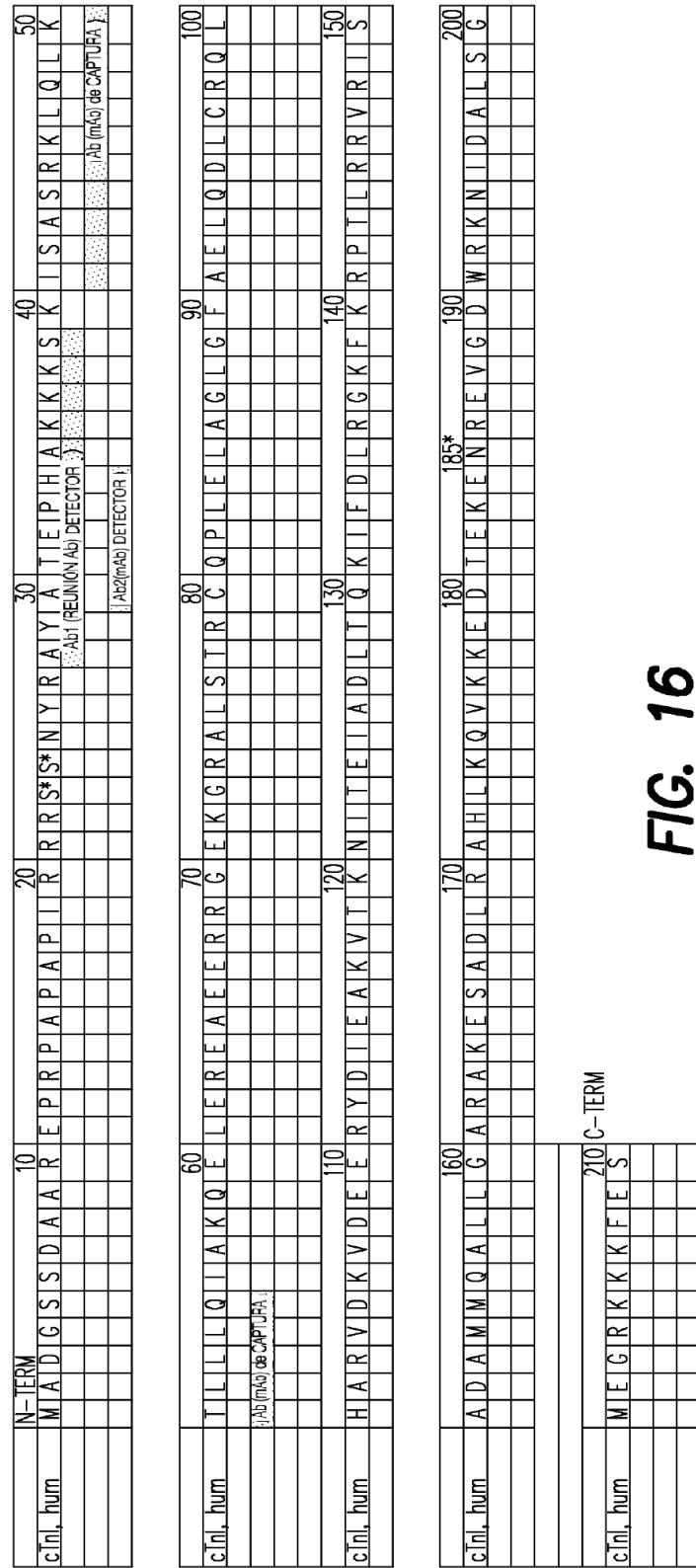


FIG. 15

**FIG. 16**

cTnI, hum	N-TERM	M A D G S S S D A A R	10	P R P A P A P I R	20	R R S* S* N Y R A Y	30	P H A K K K S K	40	S A S R K L Q L K	50
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
cTnI, hum	60	T I L L Q T A K Q E L I E R E A E E R R I G	70	E K G R A I L S T R C	80	Q P P L E L L A G L G F	90	A E T L Q D D L C R Q L	100		
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
cTnI, hum	110	H A R V D K V D E E R Y D I I E A K V T I K	120	N I I T E I A D L I T Q	130	K I F D I L R G K F K	140	R P T I L R R V R T S	150		
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
cTnI, hum	160	A D A M M Q A T I L L G A T R A K E S A D I L L R A H I L K Q V K K E D	170	T T E K E N R E V G D	180	185*	190		200		
		.....		.....		.....		.....		.....	
		.....		.....		.....		.....		.....	
cTnI, hum	210	M I E G R K K K F E E S	220	C-TERM							

FIG. 17

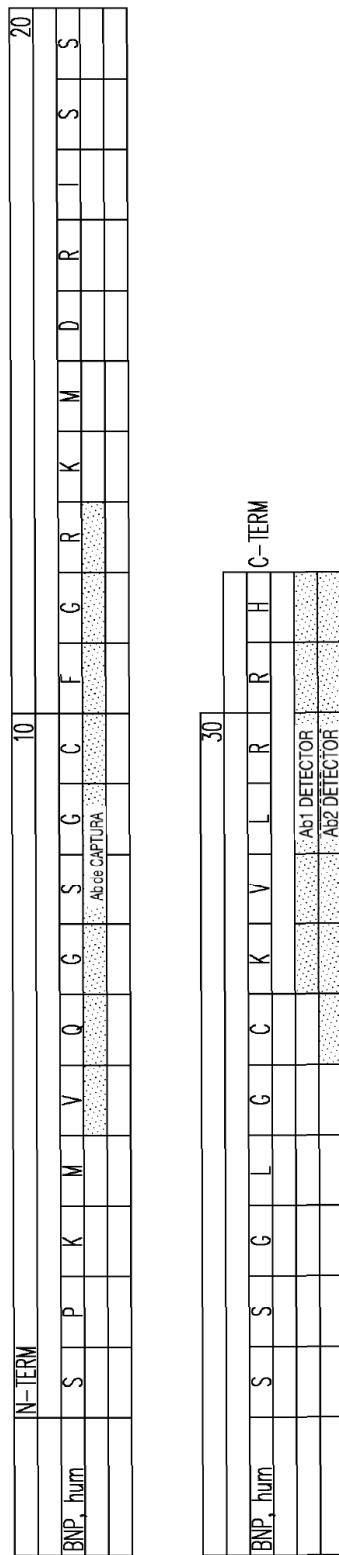


FIG. 18