

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 180**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2016 PCT/IB2016/052131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2016 E 16720906 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3283888**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico in vitro de la alergia y dispositivo relacionado**

30 Prioridad:

15.04.2015 IT FI20150110

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

26.03.2021

73 Titular/es:

**AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA
MEYER (33.3%)**

**Viale Pieraccini, 24
50139 Firenze, IT;**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE (33.3%) y
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**PUCCI, NERI;
ROSSI, MARIA ELISABETTA;
MORI, FRANCESCA;
MUGNAINI, MARCO;
VIGNOLI, VALERIO;
FORT, ADA y
NOVEMBRE, ELIO**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 814 180 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

Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de la alergia y dispositivo relacionado

5 Sector de la invención

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para la detección y cuantificación de inmunoglobulinas E específicas (IgE) para un alérgeno de interés en una muestra de suero de un paciente y a un dispositivo para desarrollar este procedimiento.

10

Estado de la técnica anterior

Las inmunoglobulinas son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Se pueden separar funcionalmente en dominios variables que se unen a antígenos y dominios constantes que especifican funciones efectoras, tales como la activación del complemento o la unión a receptores Fc. Cada dominio variable se puede dividir en tres regiones de variabilidad en la secuencia denominadas Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR, en inglés) y cuatro regiones que tienen una secuencia relativamente constante denominadas regiones estructurales.

15

20

La unión entre el antígeno y el dominio variable del anticuerpo es débil y esencialmente no covalente. Se sabe que las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno, las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrófobas están involucradas dependiendo de los sitios de interacción (Absolom D.R. et al., 1986 CRC Critical Reviews in Immunology 6 (1): 1-46). Hay cinco clases principales de dominios constantes de cadena pesada. Cada clase define los isotipos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A su vez, el isotipo IgG se puede dividir en cuatro subclases, que son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, cada una de las cuales tiene sus propias propiedades biológicas. De manera similar, el isotipo IgA se puede dividir en IgA1 e IgA2 (Schroeder I. et al. J. Allergy Clin. Immunol. Febrero de 2010; 125 (2 Supl. 2): S41-52).

25

30

La IgE es una inmunoglobulina muy potente, aunque está presente en la concentración más baja en suero y tiene la vida media más corta. La IgE se asocia con hipersensibilidad y reacciones alérgicas, así como con la respuesta a infecciones parasitarias por gusanos. La IgE se une con una afinidad extremadamente elevada al receptor conocido como FcεRI, el receptor de alta afinidad por la región Fc de la inmunoglobulina E, que se expresa en mastocitos, basófilos, células de Langerhans y eosinófilos. La IgE circulante regula positivamente la expresión de FcεR en estas células. La combinación de una unión fuerte y una regulación positiva de la expresión de FcεR contribuye a la potencia notable de esta inmunoglobulina. La IgE se identificó inicialmente en 1967 como la reagina que media la hipersensibilidad de tipo I (véase, por ejemplo, Ishizaka K. et al. J. Allergy 37 (1967), páginas 169-172).

35

40

En 1972, se desarrolló el primer ensayo comercial para la IgE específica de alérgenos llamado la RAST = Prueba de radioalergoabsorbencia (del inglés, Radio Allergic Sorbent Test) (Wide L. et al. Lancet 2 (1967) páginas 1.105-1.109). La prueba RAST original se configuró como una prueba llevada a cabo sobre un disco de papel alergosorbente al que se acoplaron covalentemente muchos alérgenos diferentes de diferentes especificidades. El suero se incubó con este alérgeno en fase sólida, lo que permitió que anticuerpos de todos los isotipos se unieran al mismo. Después de un lavado con tampón para eliminar las proteínas no unidas, se detectó el anticuerpo IgE unido con IgE antihumana policlonal radioyodada. Después de esta segunda incubación y un segundo lavado con tampón, se cuantificó la radiactividad unida en un contador gamma. Toda la prueba requirió tres días. La cantidad de recuentos por minuto unidos fue proporcional a la cantidad de anticuerpo IgE unido específicamente al alérgeno inmovilizado.

45

50

En los últimos años, las mejoras de la tecnología en el componente en fase sólida ha conducido al desarrollo del sistema ImmunoCAP® (Pharmacia Diagnostics) para las pruebas *in vitro*. Esta prueba utiliza una fase sólida de celulosa tridimensional como reemplazo de los discos de papel bidimensionales de la RAST modificada. Como resultado, los tiempos de incubación requeridos son más cortos. Estos ensayos con anticuerpos IgE más nuevos utilizan una mayor cantidad de extractos de alérgenos, también de mayor calidad, para preparar los alergosorbentes relacionados. Los nuevos materiales de matriz, tales como la esponja de celulosa utilizada en el sistema ImmunoCAP®, han mejorado la capacidad de unión, a la vez que reducen las propiedades de unión inespecíficas de los alergosorbentes. Varias combinaciones de anticuerpos de detección anti-IgE policlonales y monoclonales aseguran la máxima sensibilidad y especificidad del ensayo para la IgE humana. Las etiquetas no isotópicas han aumentado la vida útil de los reactivos y han hecho que los ensayos sean más fáciles de utilizar y más seguros de realizar. Además, la automatización ha mejorado la precisión y la reproducibilidad de los ensayos hasta el nivel en el que algunos ensayos con anticuerpos IgE en autoanalizadores solo requieren mediciones individuales para asegurar resultados precisos. Los sistemas de calibración utilizados en los ensayos de anticuerpos IgE de segunda generación han utilizado una estrategia común en la que se utiliza una curva de IgE sérica total heteróloga para convertir los datos de respuesta del ensayo de IgE específica de alérgenos en estimaciones de dosis cuantitativas de anticuerpo IgE. La prueba completa tarda aproximadamente seis horas en completarse.

55

60

65

Se han desarrollado dos ensayos de diagnóstico adicionales para la determinación en el laboratorio de IgE sérica específica. Uno se llama sistema Immulite® (Siemens, Alemania) y utiliza un alérgeno biotinilado que está unido a una fase sólida de avidina. El otro es el sistema HyTech-288 (Hycor/Agilent Technologies, California, Estados Unidos) que utiliza una oblea de celulosa sobre la que el alérgeno se acopla covalentemente.

Los tres sistemas mencionados anteriormente se realizan todos en autoanalizadores para maximizar la precisión y reducir al mínimo el tiempo de respuesta. Todos utilizan la IgE antihumana marcada no isotópicamente y se calibran mediante la interpolación de los datos de respuesta a partir de una curva de calibración de IgE sérica total heteróloga que se ha referenciado al patrón sérico de IgE total de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (consulte "Analytical performance characteristics and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E antibodies of defined allergen specificities", Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, Pa (2009) Directrices aprobadas I/LA20).

Estos ensayos serológicos han evolucionado desde mediciones cualitativas dicotómicas del anticuerpo IgE (por ejemplo, positivo frente a negativo) hasta un estado más cuantitativo. De hecho, la investigación clínica ha demostrado que, en ciertos casos, el nivel de anticuerpo IgE específico de alérgeno podría predecir una prueba de estimulación con alérgenos positiva, tal como la relacionada con la alergia alimentaria, y la presencia de una enfermedad más grave (por ejemplo, sibilancias) en niños con asma (véase Eckman J. et al. Allergy Asthma Clin. Immunol., 5 (2009), páginas 2-8; y Simpson A. et al. J. Allergy Clin. Immunol., 116 (2005), páginas 744-749). Sin embargo, las concentraciones séricas de IgE no predicen con precisión la gravedad de la reacción alérgica, pero reflejan la probabilidad de una reacción alérgica de intensidad variable.

Características de la invención

El objetivo de la presente divulgación es, por lo tanto, un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad alérgica y un dispositivo para lograr este procedimiento, que resuelvan los problemas técnicos señalados anteriormente para las pruebas conocidas, permitiendo optimizar los tiempos requeridos para la realización de la prueba y también reducir los costes con respecto a reactivos e instrumentos necesarios.

Un objetivo adicional de la presente divulgación es dar a conocer un procedimiento y un dispositivo relacionado para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad alérgica, que permite realizar, de una manera muy precisa, las mediciones cuantitativas de las inmunoglobulinas E (IgE) específicas para los alérgenos de interés.

Estos y otros objetivos se consiguen mediante el procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad alérgica y el dispositivo relacionado, según la presente invención, cuyas características esenciales se definen en las reivindicaciones independientes adjuntas en el presente documento. Otras características importantes del procedimiento y dispositivo, según la presente invención, se definen en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de las figuras

Las características y ventajas del procedimiento y dispositivo para el diagnóstico de alergias, según la presente invención, se ilustrarán claramente en la siguiente descripción de ejemplo y no limitativa de sus realizaciones, también con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- Las figuras 1 y 2 muestran, respectivamente, una vista en perspectiva y en sección transversal de una realización preferente del dispositivo, según la presente invención;
- las figuras 3a), 3b), 3c), 4, 5a), 5b), 5c), 6a), 6b) y 6c) muestran las curvas de impedancia obtenidas utilizando el dispositivo de la presente invención midiendo los valores de impedancia de los sueros de varios pacientes, tal como se describe en los siguientes ejemplos 1 a 4.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha dicho anteriormente, la inmunoglobulina E (IgE) es una inmunoglobulina presente en el suero humano y está asociada con la hipersensibilidad y reacciones alérgicas, de manera que las pruebas de alergia se basan, en general, en la dosificación de IgE en la muestra de sangre de un paciente en respuesta a un cierto alérgeno. El objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento alternativo y más eficaz para el diagnóstico de enfermedades alérgicas midiendo los valores de impedancia de una muestra de suero de un paciente antes y después de su contacto con un alérgeno de interés.

La interacción entre la inmunoglobulina E y el alérgeno se produce a través de un mecanismo de unión, como para cualquier otra interacción anticuerpo/antígeno. Después de esta interacción, algunos de los protones/electrones libres de la estructura de la inmunoglobulina se acercan a la estructura del alérgeno, aumentando o reduciendo así, respectivamente, el valor de la impedancia del suero bajo análisis. En otras palabras, cuanto mayor es la diferencia en los valores de la impedancia medida, mayor es la interacción entre la IgE y el alérgeno bajo análisis.

En el presente documento, los solicitantes han desarrollado un nuevo dispositivo basado en la medición de los valores de impedancia en muestras de suero que permite evaluar la reactividad alérgica de un paciente en respuesta a un alérgeno mediante el análisis de una muestra de suero de un paciente de una manera muy fácil y rápida, mediante mediciones que demuestran ser reproducibles y repetibles en el tiempo.

5 Con referencia particular a la figura 1, el dispositivo 1 para el diagnóstico de una enfermedad alérgica, según la presente invención, comprende:

- 10 - un recipiente 2 para un alérgeno de interés para el cual se va a detectar una IgE específica en una muestra de suero de un paciente;
- una unidad de medición 3 que comprende un soporte apropiado para muestras de alérgeno/suero y electrodos para la generación de señales eléctricas de CA sobre el soporte;
- una bomba 4 para tomar una muestra de alérgeno del recipiente 2 y bombearla hacia la unidad de medición 3 a través de conductos adecuados;
- 15 - un recipiente 5 para el suero de un paciente analizar, que comprende, de manera opcional, una centrifugadora y un dispositivo de filtración para el tratamiento de la sangre completa del paciente y su separación para obtener una muestra de suero a analizar;
- una bomba 6 para tomar la muestra de suero de un paciente a analizar del recipiente 5 y bombearla hacia la unidad de medición 3 a través de conductos adecuados;
- 20 - una unidad de procesamiento 7 asociada a la unidad de medición 3 es capaz de recoger y procesar los datos provenientes de dicha unidad 3 para obtener los correspondientes valores de impedancia de las muestras ensayadas, y enviarlas a una pantalla o a una estación remota para un posterior procesamiento y visualización de los datos.

25 Por estación remota se entiende en el presente documento, en particular, un ordenador personal o un dispositivo inteligente que, según una realización preferente de la presente invención, también puede generar mensajes establecidos para la unidad de medición 3 y/o la unidad de procesamiento 7 a diferentes frecuencias y amplitudes.

30 El dicho recipiente 2 anterior puede ser un recipiente capaz de mantener por separado diferentes alérgenos, de los que el alérgeno de interés se selecciona de vez en cuando.

La unidad de medición 3 comprende un soporte que está diseñado para tener la resistencia mínima y consiste, de manera preferente, en una almohadilla cubierta de un metal noble, tal como oro o platino, que forma un par de electrodos, a efectos de minimizar cualquier proceso de oxidación e interacción de la almohadilla con los materiales biológicos bajo análisis. Después de cada adición de una gota o de una prueba, la almohadilla se limpia, de manera preferente, con una solución alcohólica, reduciendo así los riesgos de interferencia entre una medición y las mediciones posteriores. El soporte, según la presente invención, que consiste, de manera preferente, en una almohadilla recubierta de un metal noble para formar el par de electrodos, es, por lo tanto, inespecífico para el alérgeno bajo análisis, es decir, no requiere ninguna modificación o funcionalización de los electrodos de medición dependiendo del alérgeno a investigar. Por lo tanto, con un mismo dispositivo, según la presente invención, se pueden probar distintos alérgenos sin necesidad de realizar modificaciones en la unidad de medición y en el soporte al pasar de un alérgeno a otro. En otras palabras, el dispositivo de la presente invención puede utilizarse para el diagnóstico de diferentes enfermedades alérgicas, asociadas a diferentes alérgenos, sin necesidad de cambiar la unidad de medición y, en particular, los electrodos de medición, que no son específicos de alérgenos.

45 La impedancia se define, en general, como la oposición total que un circuito, o más en general un objeto, ofrece al flujo de corriente alterna (CA) a una frecuencia determinada. Se conocen muchos procedimientos para la medición de la impedancia; se puede seleccionar el más apropiado según los requisitos y condiciones de las mediciones, tales como la cobertura de frecuencia o la precisión de las mediciones requerida. La unidad de medición 3 del dispositivo de la presente invención y la unidad de procesamiento asociada 7 se pueden construir mediante una estructura de hardware adecuada con un software y una placa base interdigitada o una banda de almohadilla fabricada de un metal noble, tal como el oro, como soporte para las muestras a analizar. Entre los ejemplos adecuados de una unidad de medición de impedancia 3 y una unidad de procesamiento asociada 7 se encuentran, por ejemplo, los sistemas descritos en "AGILENT IMPEDANCE MEASUREMENT HANDBOOK", 4ª edición; o divulgados por Ackman J.J. et al. 1984 Critical Reviews in Biomedical Engineering 11 (4), páginas 281-311; Chen S.W. et al. 2012 Biosensors and Bioelectronics 33 (1), páginas 196-203; Dvorskiy, V.Ya. et al. 1998 Izvestiya VUZ: Radioelektronika 41 (7), páginas 75-77.

60 Según una realización preferente de la presente invención, el recipiente 5 comprende una centrifugadora y un dispositivo de filtración aguas abajo de la misma, de manera que una muestra de sangre de un paciente tomada del paciente se puede utilizar directamente para la prueba en el dispositivo de la presente invención; siendo esta sangre completa procesada por la centrifugadora y por el filtro para obtener un suero que contiene la IgE de interés, en el que, a continuación, se analiza la impedancia con un alérgeno, según el procedimiento de la presente invención. Con referencia particular a la figura 2, se muestra un ejemplo del recipiente 5 y de su estructura interna; sin embargo, son posibles recipientes de diferentes formas y dimensiones.

En la presente invención, las mediciones de impedancia se llevan a cabo en un régimen de corriente alterna (CA) a una frecuencia que varía de 10 Hz a 100 kHz con una resolución, como mínimo, de 1 Hz, a fin de minimizar la interacción y los efectos de polarización de aquellas sustancias todavía presentes en el suero, que podrían polarizarse si se polarizan con un voltaje constante; de esta manera, las propiedades del suero bajo análisis se conservan al más alto grado.

El flujo de suero y alérgenos en el dispositivo de la presente invención está asistido por bombas que permiten, a continuación, que fluya a través de los conductos y regulan su deposición sobre el soporte en la unidad de medición 3. La cantidad de suero a ensayar y de alérgeno en el dispositivo de la presente invención está regulada para que sea de 100 μ l a 40 ml. Los valores de impedancia medidos para dichos volúmenes pueden variar entre 500 k Ω y 5 Ω .

Un software especializado en la unidad de procesamiento 7 es capaz de establecer los parámetros de medición adecuados para realizar las mediciones de impedancia en un intervalo de frecuencias para llevar a cabo un barrido de frecuencias o a una sola frecuencia, según las necesidades de la prueba, y la amplitud de las señales en la muestra pueden establecerse, por ejemplo, entre 200 mV_{pp} y 2 V_{pp}. Los datos recogidos a partir de las mediciones se pueden recoger, a continuación, a través de un bus compartido o especializado; de manera preferente, se utiliza un protocolo de comunicación I2C para configurar la unidad de medición de impedancia y la recogida de datos obtenidos.

El procedimiento de la presente invención para el diagnóstico *in vitro* de enfermedades alérgicas comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto una solución que contiene alérgenos con un soporte provisto de electrodos;
- medir la impedancia de dicha solución que contiene alérgenos, obteniendo un primer valor de impedancia;
- añadir suero de un paciente a dicha solución que contiene alérgenos sobre dicho soporte provisto de electrodos;
- medir la impedancia de dicho suero añadido a dicha solución que contiene alérgenos, obteniendo un segundo valor de impedancia;
- evaluar la diferencia entre dicho segundo y dicho primer valor de impedancia, estando esta diferencia correlacionada con la concentración de IgE específica de dicho alérgeno en dicho suero.

El dicho primer valor de impedancia anterior obtenido para la solución que contiene alérgenos representa una línea de base del procedimiento de medición de la presente invención, correspondiente a la impedancia de base a la frecuencia y amplitudes seleccionadas para la medición.

La variación de impedancia cuando se añade suero se correlaciona con la concentración de IgE presente en el suero y específica del alérgeno, y puede proporcionar una medida de la interacción entre el alérgeno y la IgE específica. De hecho, mediante la adición de cantidades adicionales de suero y la medición de la impedancia, se puede obtener una curva, cuya pendiente proporciona una medida de la velocidad de reacción y de la dinámica de la interacción alérgeno-proteína. En otras palabras, el procedimiento de la presente invención puede comprender ciclos repetidos de las etapas indicadas anteriormente, en las que la medición de la impedancia del suero añadido a la solución con alérgenos se repite a intervalos de tiempo determinados, obteniendo así varios segundos valores de impedancia a diferentes tiempos, cuya diferencia con el primer valor de impedancia de la solución que contiene alérgenos se correlaciona con la variación en el tiempo de la concentración de IgE presente en el suero bajo investigación y específica para el alérgeno en cuestión.

Los experimentos llevados a cabo por los solicitantes y descritos a continuación han demostrado que el procedimiento de la presente invención es dependiente del alérgeno, es decir, las mediciones de impedancia dependen de la concentración de alérgeno utilizada. Las condiciones óptimas de medición incluyen una concentración del alérgeno que varía entre 10 mg/ml y 150 mg/ml.

Las ventajas del dispositivo de la presente invención son: una gran precisión, siempre dentro del 1 % de la medición a escala completa; una gran facilidad de operaciones y utilización del dispositivo; la posibilidad de estudiar la cinética de la reacción IgE/alérgeno que no es posible mediante ningún otro ensayo conocido por los solicitantes.

Este tipo de información sobre la cinética de reacción entre la IgE específica y el alérgeno es, de hecho, un parámetro importante para la evaluación en un sujeto de la gravedad de una determinada forma alérgica de los propios sujetos y, en particular, de la posibilidad de que el sujeto sufra anafilaxia y, en los casos más graves, el llamado shock anafiláctico, debido a un determinado alérgeno. De hecho, la anafilaxia es una reacción alérgica grave de inicio rápido; dentro del procedimiento de diagnóstico de la presente invención, por lo tanto, una medición dinámica de la impedancia en el suero de un sujeto, tal como se ha descrito anteriormente, que resalta una fuerte variación inicial de la impedancia detectada, puede indicar una predisposición del sujeto a episodios anafilácticos. A la inversa, una variación muy lenta de la impedancia, incluso si tiende a alcanzar valores absolutos más elevados durante tiempos relativamente largos, puede indicar una falta de predisposición en el sujeto a episodios anafilácticos. Véase, por ejemplo, Simons F.E.R. et al. World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011: 127, 587-93.

Una ventaja adicional importante del dispositivo y el procedimiento de la presente invención es el coste mucho menor para los reactivos y los instrumentos con respecto a las técnicas conocidas: en el procedimiento de la

presente invención el único tratamiento realizado antes de la medición de la impedancia es la preparación de suero a partir de la muestra del paciente de sangre completa, que requiere solo una centrifugadora y, de manera opcional, un filtro, a la vez que en el procedimiento de la presente invención no se necesitan marcadores ni agentes de inmovilización/funcionalización ni IgE antihumana.

En particular, en comparación con las técnicas de RAST/ImmunoCAP(R), el procedimiento de la presente invención es mucho más simple, ya que minimiza la posible pérdida de epítomos alergénicos en la preparación de la fase sólida, es mucho más rápido debido a que toda la prueba con el procedimiento de la presente invención sólo tarda 5 minutos en completarse y es más económico que las pruebas inmunoenzimáticas, siendo los únicos costes para la obtención del suero y del alérgeno.

Por último, una ventaja adicional del presente procedimiento es que permite el estudio de la cinética del antígeno(alérgeno)/anticuerpo (IgE) de la reacción mediante la medición de la dinámica de interacción de la pendiente. La medida derivada indica, como en las medidas de los sensores de gases, la cinética de la reacción. El valor así medido es, por tanto, una indicación de la constante de tiempo de la reacción, supuestamente de primer orden.

PARTE EXPERIMENTAL

Medición de la reactividad alérgica en suero de sujetos alérgicos a la caseína de la leche de vaca utilizando el dispositivo de la invención.

Ejemplo 1

Inicialmente se examinaron los sueros que se extrajeron de tres pacientes que tenían diferentes niveles de IgE específica para caseína, detectados con el procedimiento conocido ImmunoCAP®. La medición de los valores de impedancia de estos sueros se realizó con el dispositivo de la presente invención y los resultados se muestran en la figura 3a, en la que la curva (--) corresponde al paciente con mayor valor de IgE específica para caseína (> 100 KU/l), se obtuvo la curva (- - -) para el paciente con valores intermedios de IgE específica para caseína (58 KU/l) y, finalmente, se obtuvo la curva (---) para el paciente con un valor de IgE específica para caseína de 2 KU/l. La tendencia de las tres curvas de impedancia en la figura 3 se correlaciona con los valores de IgE específica en suero.

Estas mediciones y las siguientes se llevan a cabo sobre gotas de las muestras a ensayar, teniendo cada gota un volumen de 15 ml, mientras que la frecuencia específica usada fue de 30 kHz.

En la figura 3b se indican los valores de estado estacionario de las respuestas de los mismos tres pacientes mencionados anteriormente que tenían los valores de IgE de > 100, 58 y 2, respectivamente.

En la figura 3c, se representa la derivada de la dinámica de reacción mediante la utilización de la representación de las mismas curvas para los tres pacientes que se han descrito anteriormente. Para los pacientes alérgicos, parece existir una correlación entre las derivadas positivas después de la adición del alérgeno y el grado de respuesta al alérgeno.

Ejemplo 2

Para los mismos tres pacientes, a continuación, se investigó la repetibilidad de la medición de la impedancia con el presente dispositivo, llevando a cabo para cada uno de los tres pacientes dos ensayos idénticos utilizando el suero del paciente y el alérgeno, es decir, caseína. Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura 4, en la que el ensayo con caseína está representado por una curva (-(--), y el ensayo con el suero del paciente está representado por una curva (--). Vale la pena señalar que los resultados obtenidos en los ensayos realizados para cada paciente están sustancialmente superpuestos.

Ejemplo 3

Para los mismos tres pacientes mencionados anteriormente, se repitieron las mediciones de impedancia con el dispositivo de la presente invención mediante el registro de la curvas de impedancia suero-alérgeno y suero-suero para cada uno de los tres pacientes; su comparación proporciona una medida de la diferencia de impedancia entre el alérgeno (- - -) y el suero (--). Los resultados se muestran en las figuras 5 de a) a c).

Ejemplo 4

Por último, se analizaron los sueros de tres pacientes sin IgE específica para caseína y que padecían queratoconjuntivitis vernal, siendo, por lo tanto, pacientes para los que la alergia a la caseína no era posible, como un control negativo, para verificar que las mediciones de impedancia con el presente dispositivo no proporcionan ninguna respuesta en estos casos. En estos experimentos, los sueros de los pacientes se pusieron en contacto con

la caseína y con sus sueros, obteniendo, en ambos casos, una falta de respuesta. Los resultados de los dos experimentos se muestran en las figuras 6 de a) a c).

En conclusión, a partir de los experimentos llevados a cabo y descritos anteriormente, es evidente que:

- 5
- existe una correlación entre los valores de IgE específica para caseína y la tendencia de las curvas de impedancia;
 - la prueba de diagnóstico basada en mediciones con el presente dispositivo es reproducible en pacientes alérgicos;
 - para sujetos sanos, no alérgicos a la caseína, no se detecta respuesta en la medición de la impedancia de la
- 10 presente prueba.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad alérgica, que comprende las siguientes etapas:
- 5 - poner en contacto una solución que contiene alérgenos con un soporte provisto de electrodos, que consiste en una almohadilla recubierta de un metal noble que forma un par de dichos electrodos;
 - medir la impedancia de dicha solución que contiene alérgenos, obteniendo un primer valor de impedancia;
 - añadir suero de un paciente a dicha solución que contiene alérgenos sobre dicho soporte provisto de electrodos;
 10 - medir la impedancia de dicho suero añadido a dicha solución que contiene alérgenos, obteniendo un segundo valor de impedancia;
 - evaluar la reactividad alérgica de dicho paciente en respuesta a dicho alérgeno mediante la evaluación de la diferencia entre dicho segundo y dicho primer valor de impedancia, estando esta diferencia correlacionada con la concentración de IgE específica de dicho alérgeno en dicho suero y con el grado de respuesta al alérgeno, a la vez que no se detecta respuesta a dicho alérgeno en sujetos sanos.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho par de electrodos están fabricados de oro o platino.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho soporte provisto de electrodos se lava después de cada adición para reducir los riesgos de interferencia entre mediciones posteriores.
- 20 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha medición de la impedancia se lleva a cabo en régimen de corriente alterna (CA) a una frecuencia que varía de 10 Hz a 100 kHz con una resolución, como mínimo, de 1 Hz.
- 25 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha solución que contiene alérgenos tiene una concentración de alérgenos que varía de 10 mg/ml a 150 mg/ml.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de medir la impedancia del suero añadido a la solución que contiene alérgenos y dicha etapa de evaluar la diferencia entre dicho primer y dicho segundo valor de impedancia se repiten a intervalos de tiempo para evaluar la variación en el tiempo de dicha diferencia, que se correlaciona con la variación en el tiempo de la concentración de dicha IgE específica.
- 30 7. Dispositivo (1) para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad alérgica, según un procedimiento, tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho dispositivo:
- 35 - un recipiente (2) para un alérgeno de interés para el cual se va a detectar una IgE específica en la muestra de suero de un paciente;
 - una unidad de medición (3) que comprende un soporte apropiado para muestras de alérgeno/suero y electrodos para la generación de señales eléctricas de CA sobre el soporte, en el que dicho soporte es una almohadilla recubierta de un metal noble que forma un par de electrodos;
 40 - una bomba (4) para tomar una muestra de alérgeno del recipiente (2) y bombearla hacia la unidad de medición (3) a través de conductos adecuados;
 - un recipiente (5) para analizar el suero de un paciente;
 - una bomba (6) para tomar la muestra de suero de un paciente a analizar del recipiente (5) y bombearla hacia la
 45 unidad de medición (3) a través de conductos adecuados;
 - una unidad de procesamiento (7) asociada a dicha unidad de medición (3) y capaz de recoger y procesar los datos provenientes de dicha unidad (3) para obtener los correspondientes valores de impedancia de las muestras ensayadas, y enviarlas a una pantalla o a una estación remota para un posterior procesamiento y visualización de los datos.
- 50 8. Dispositivo, según la reivindicación 7, que comprende, además, una centrifugadora y un dispositivo de filtración en dicho recipiente (5) para el tratamiento de la sangre total del paciente y su separación para obtener dicha muestra de suero a ensayar.
- 55 9. Dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que dicho recipiente (2) es un recipiente capaz de contener por separado diferentes alérgenos, de los cuales se selecciona de vez en cuando un alérgeno de interés.
- 60 10. Dispositivo, según la reivindicación 7, en el que dicho par de electrodos están fabricados de oro o platino.
11. Dispositivo, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la unidad de procesamiento (7) comprende un software especializado capaz de establecer los parámetros de medición adecuados para realizar las mediciones de impedancia en un intervalo de frecuencias para realizar un barrido de frecuencias o a una única frecuencia según las necesidades del ensayo y para establecer la amplitud de las señales en la muestra.
- 65

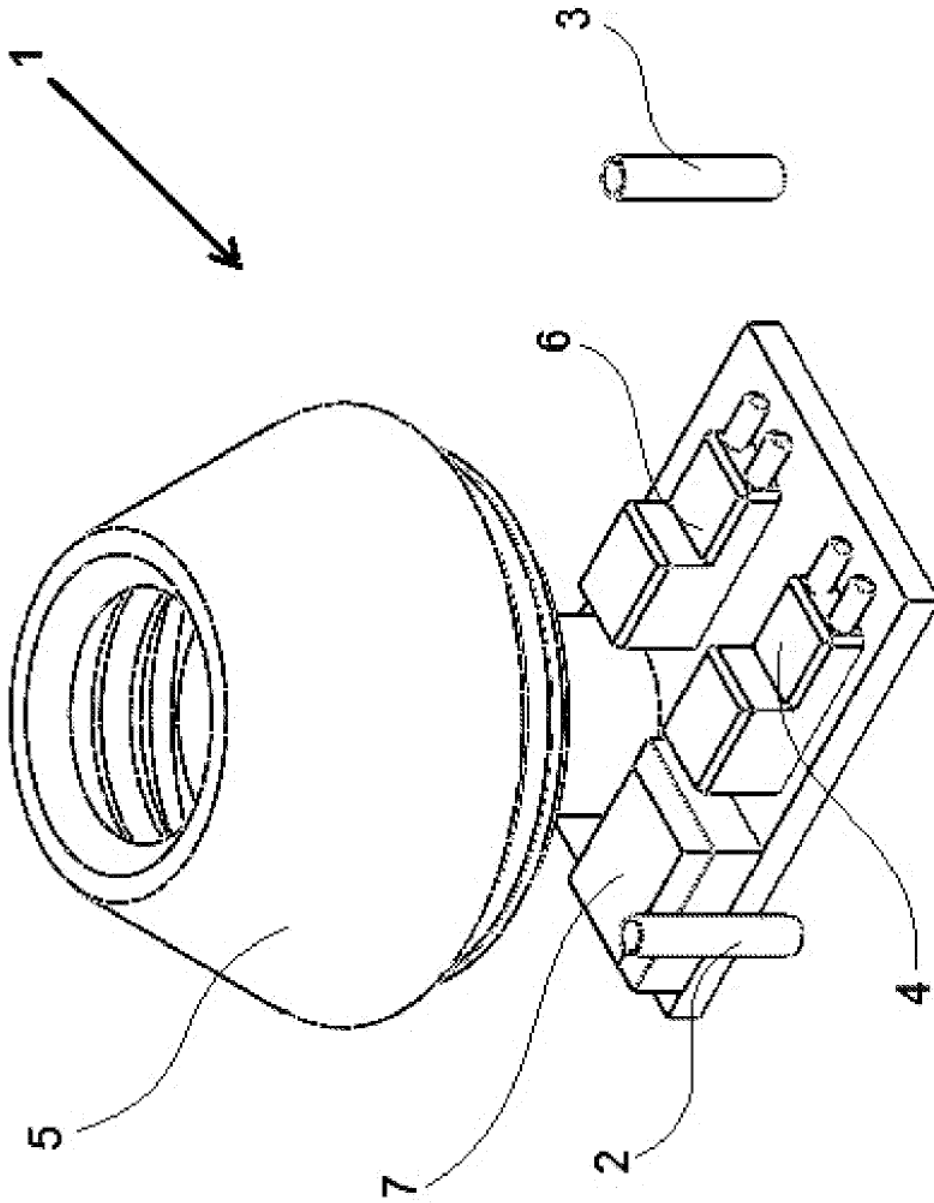


Fig. 1

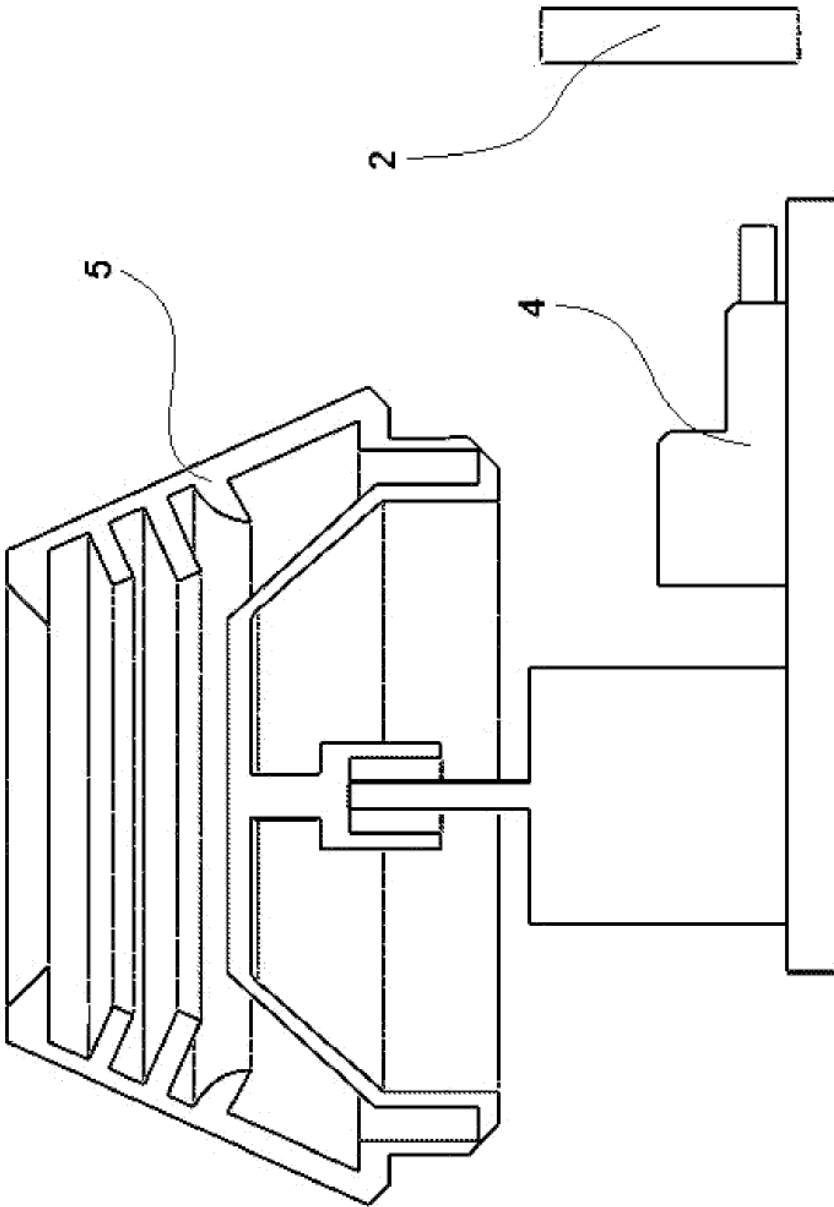


Fig. 2

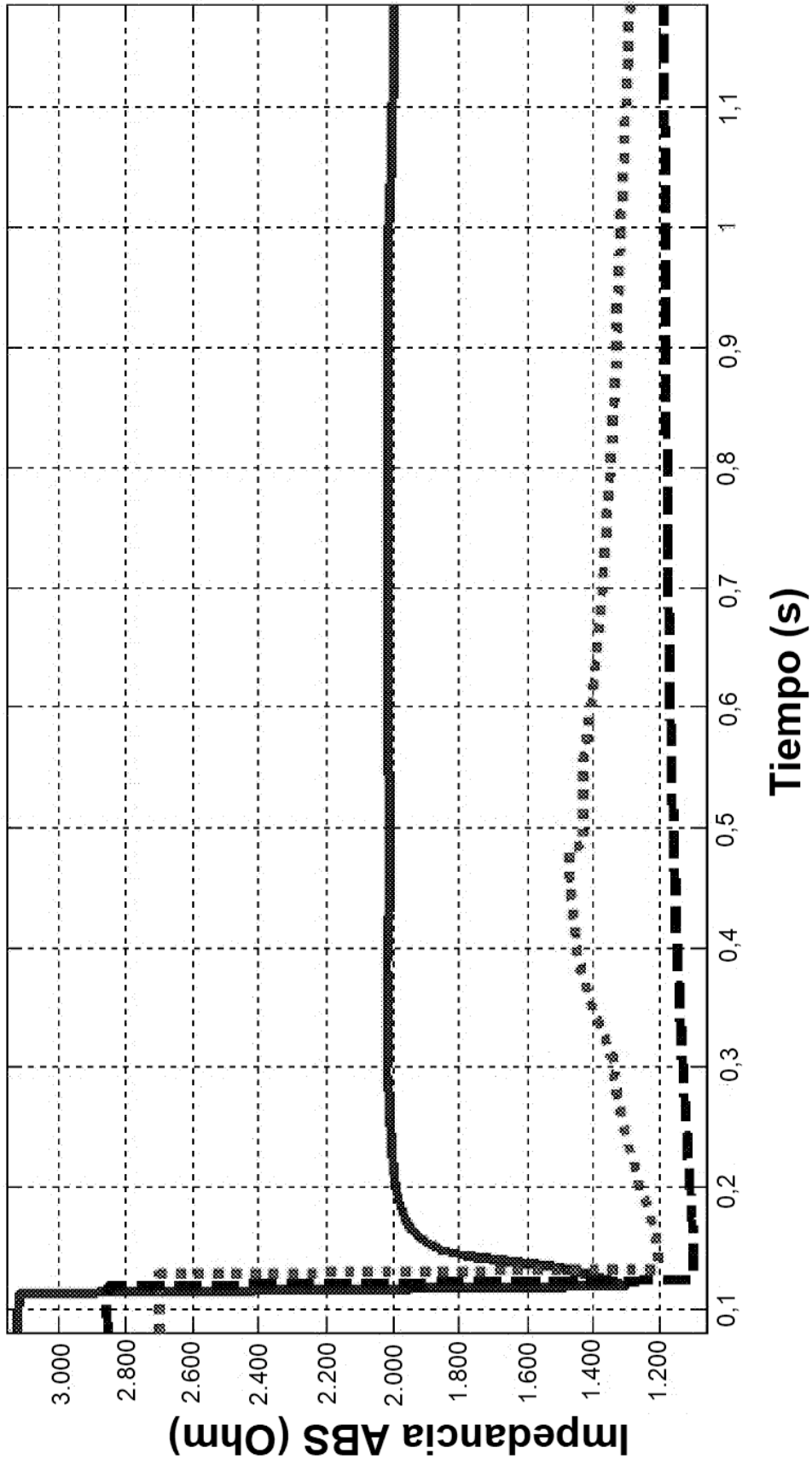


Fig. 3a

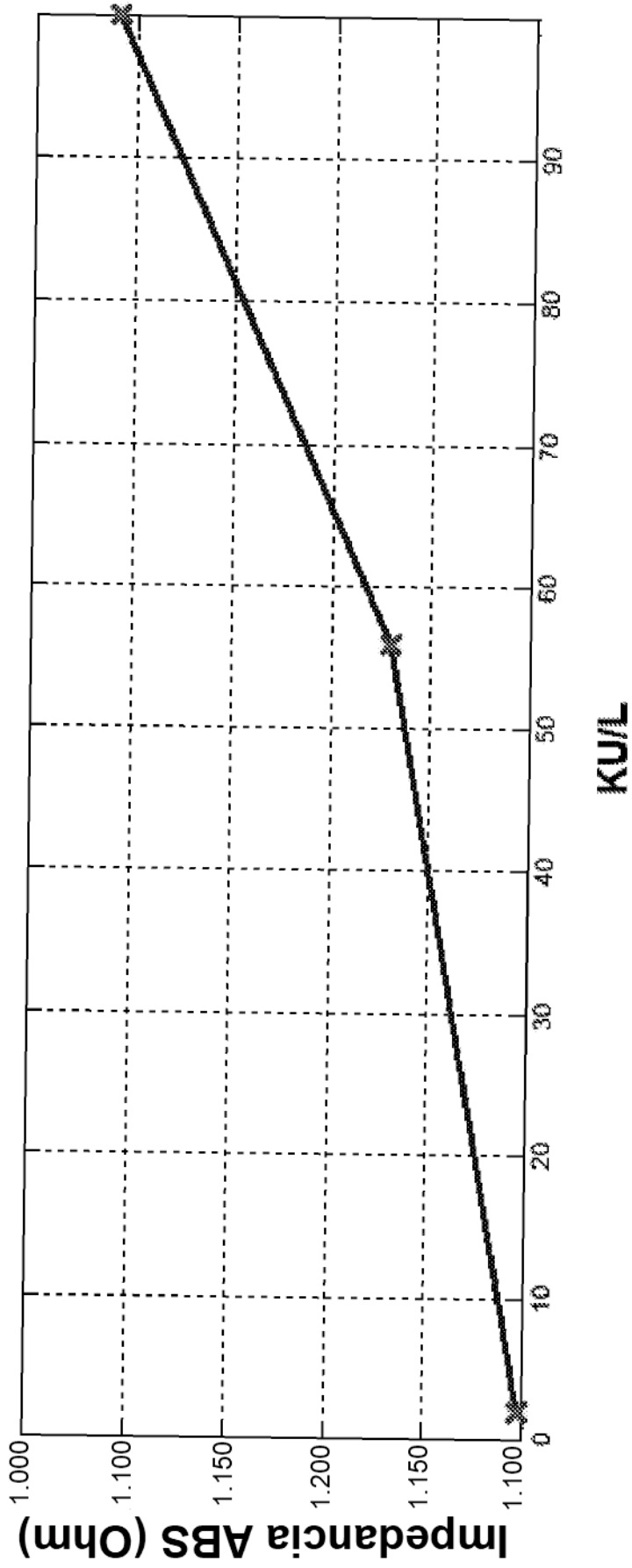


Fig. 3b

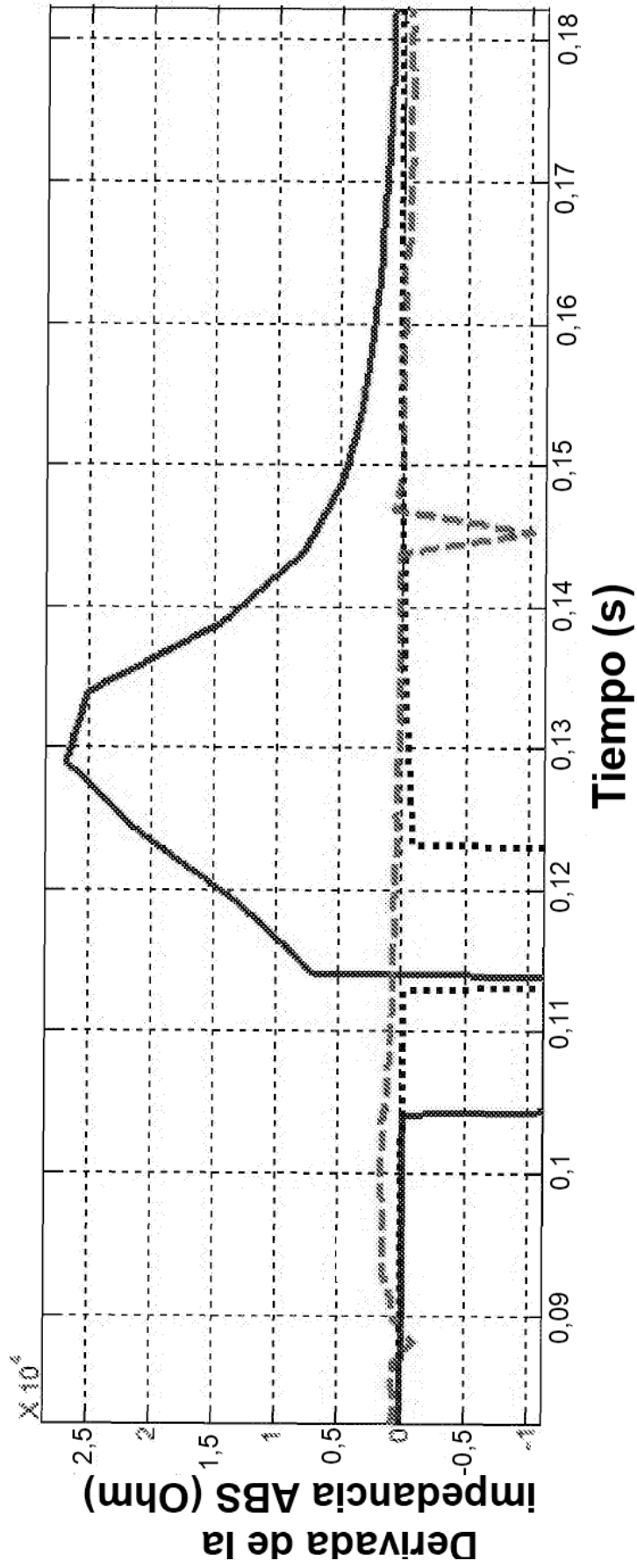


Fig. 3C

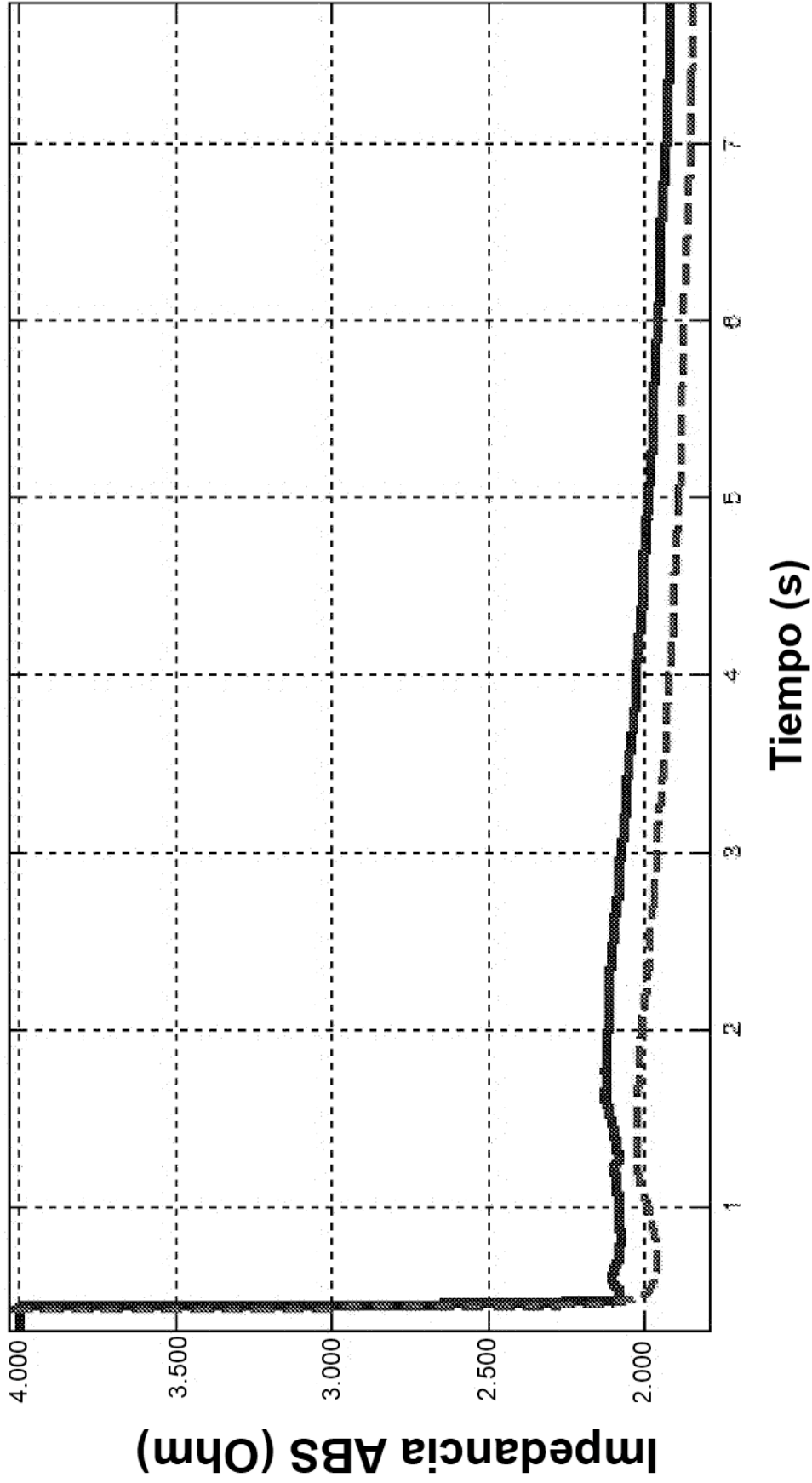


Fig. 4

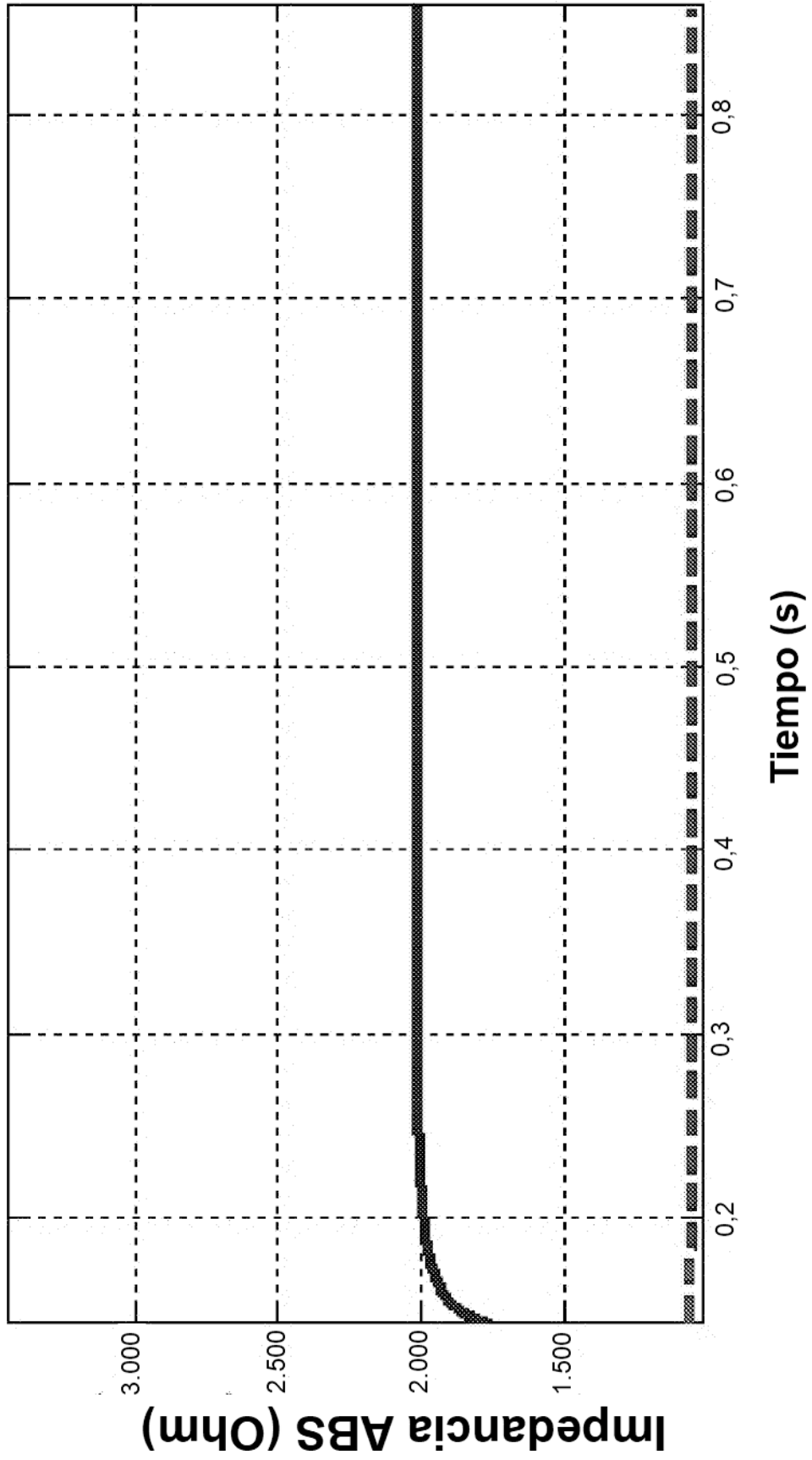


Fig. 5a

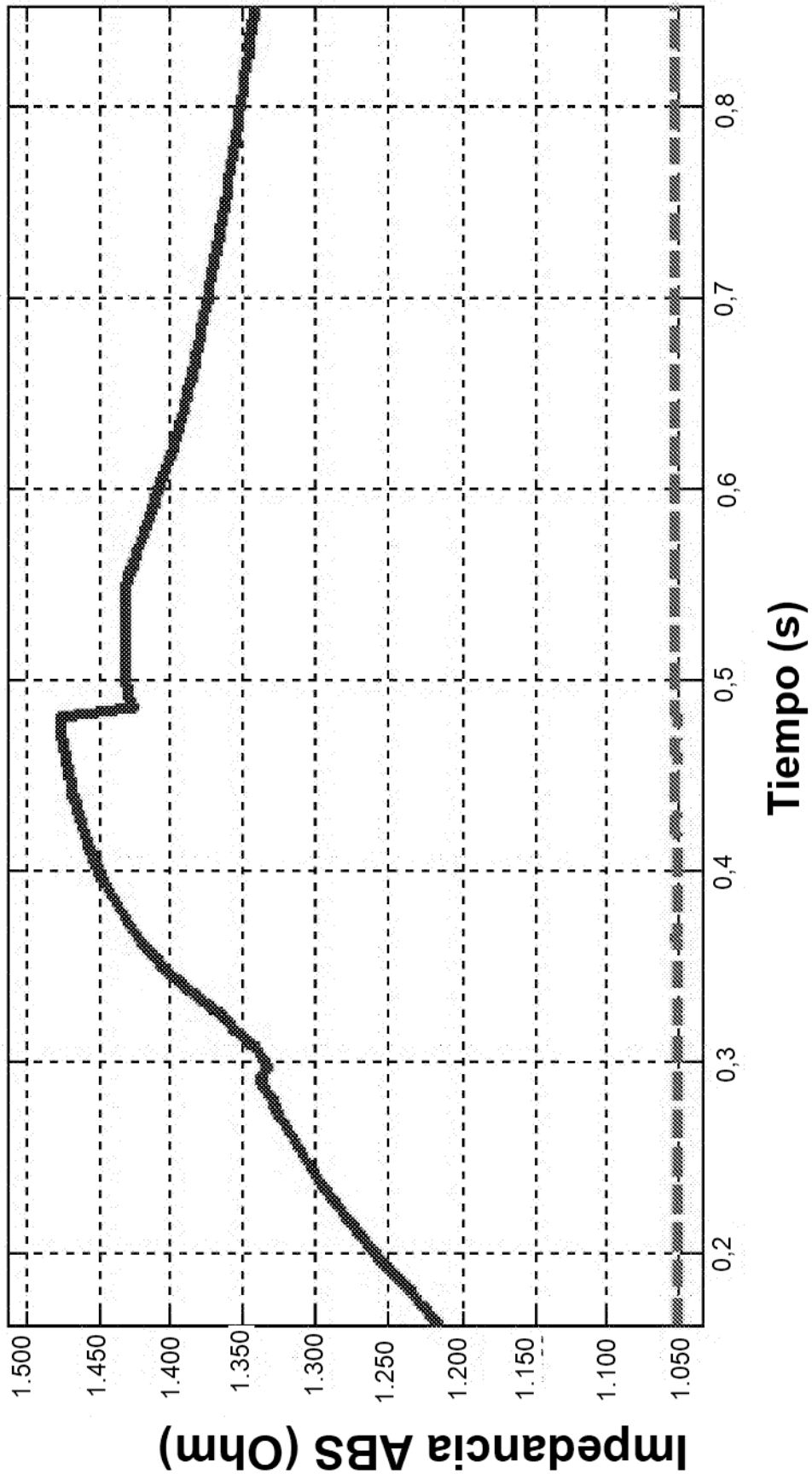


Fig. 5b

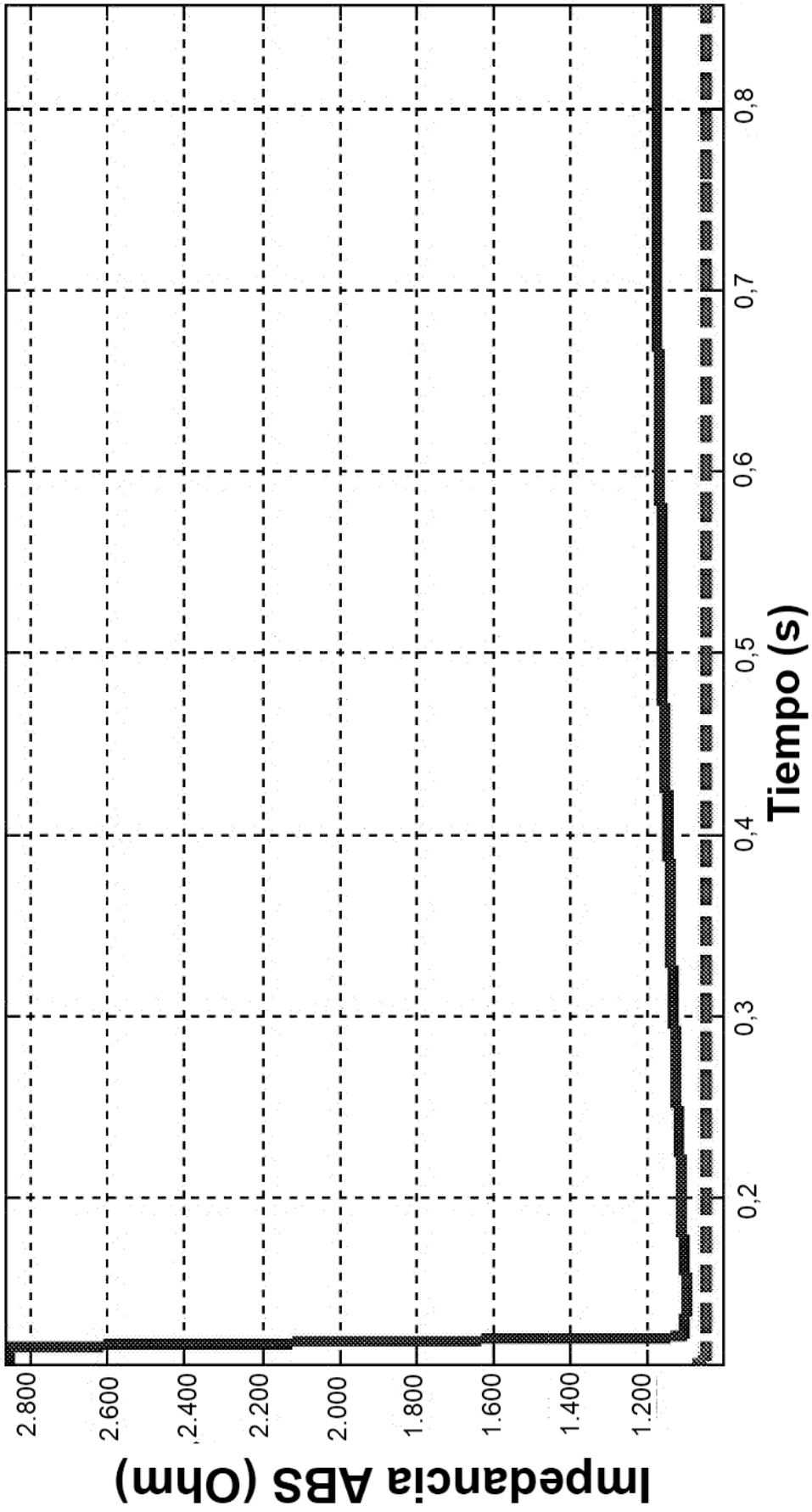


Fig. 5c

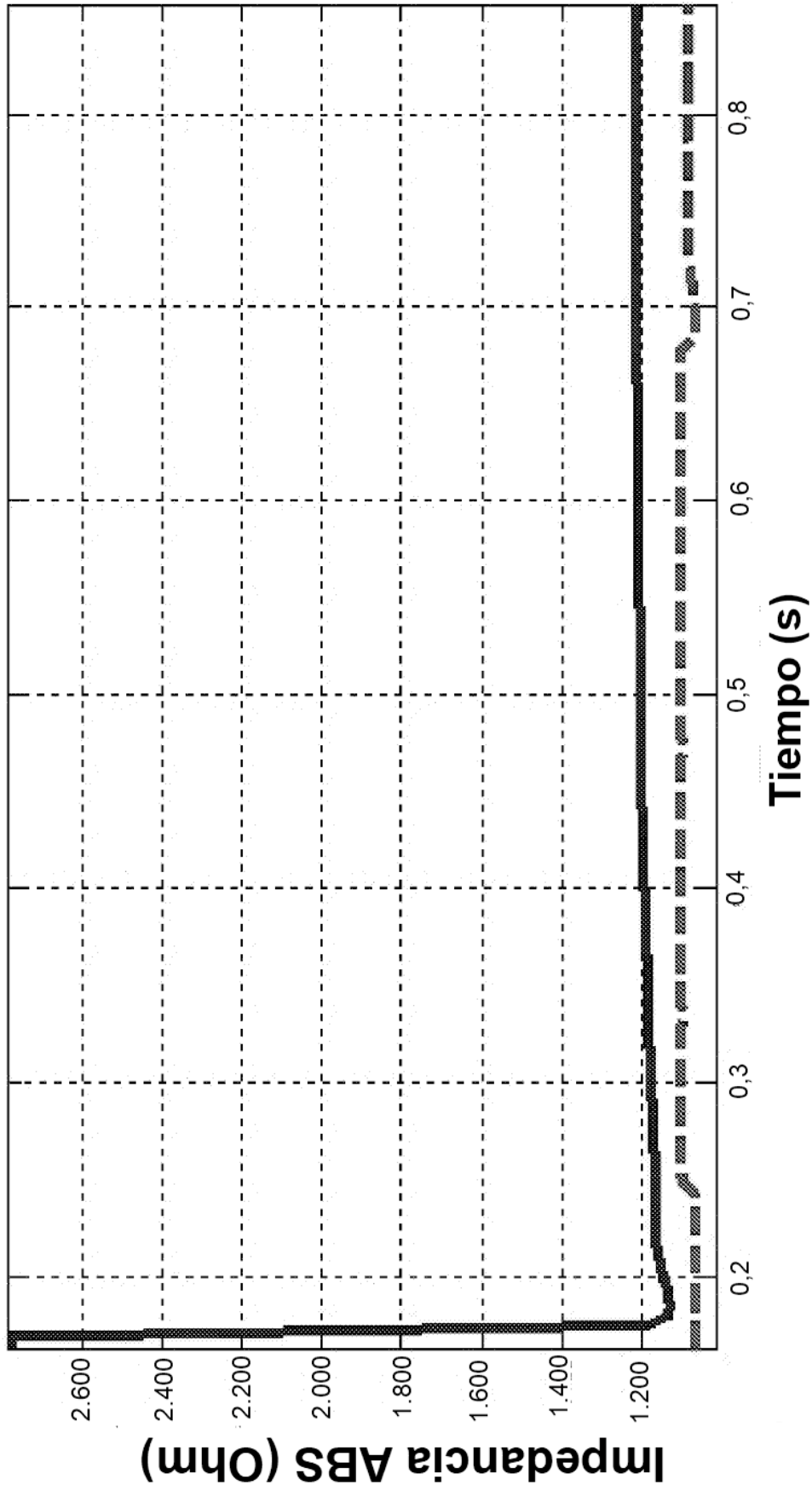


Fig. 6a

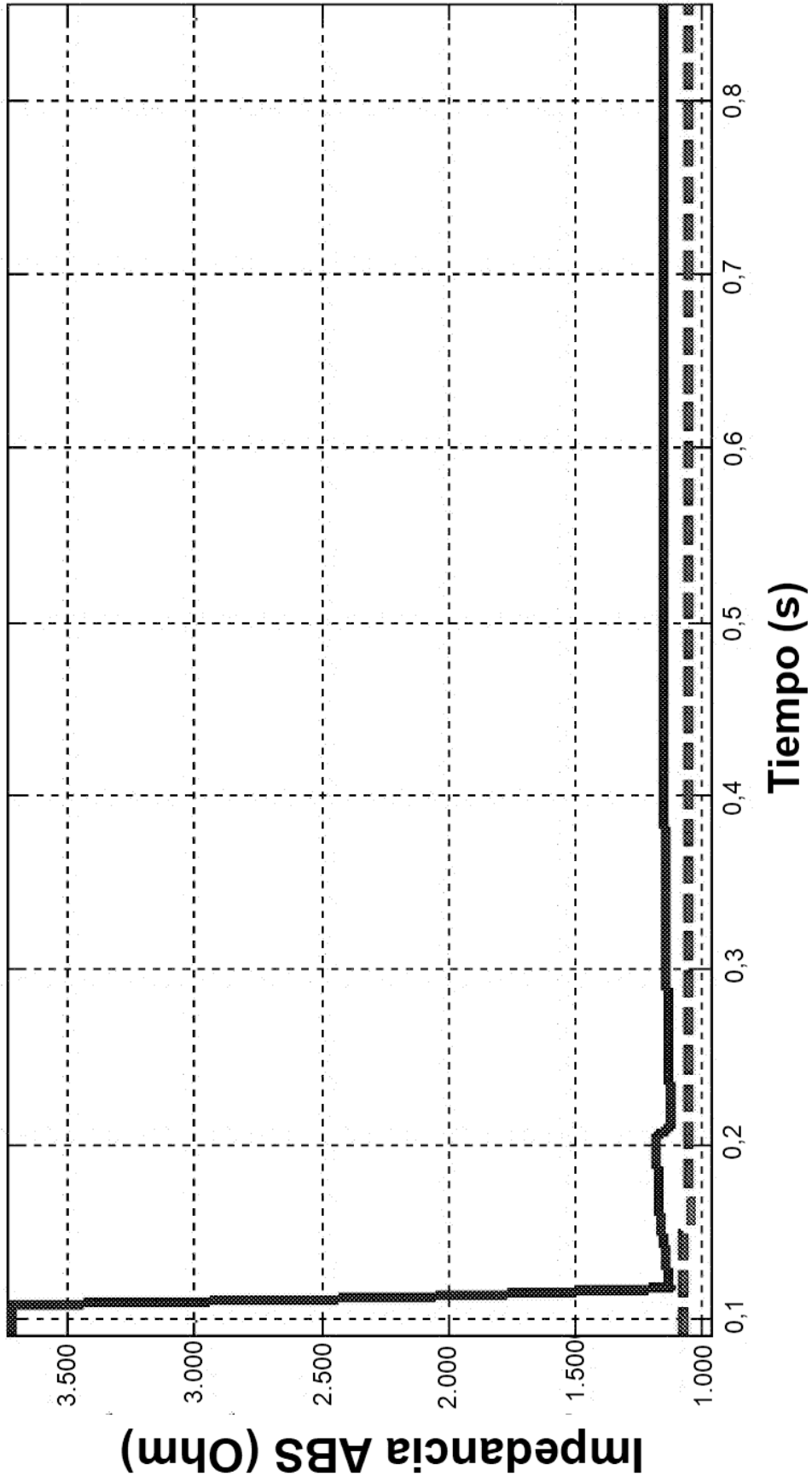


Fig. 6b

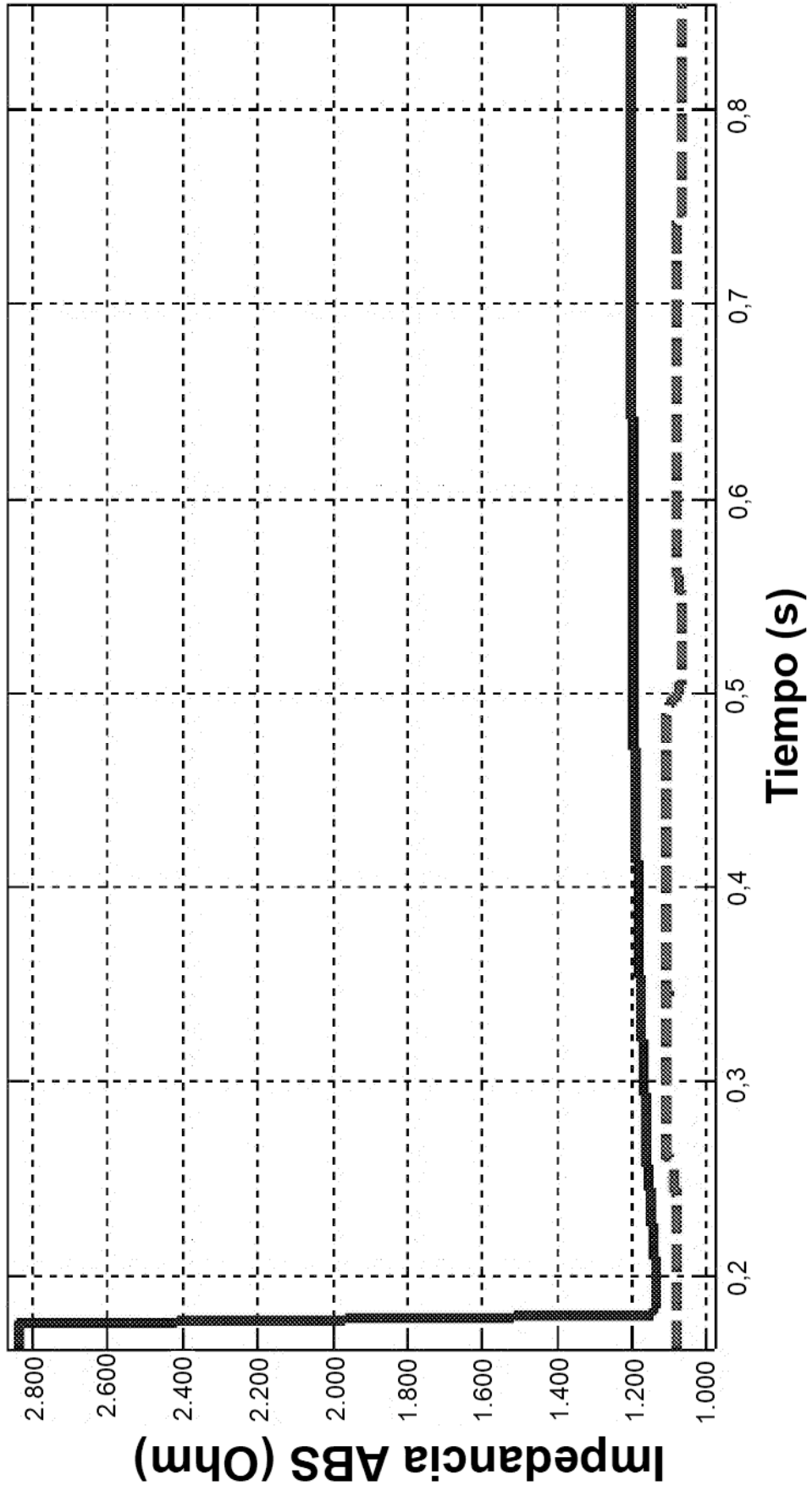


Fig. 6c

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Literatura no patente citada en la descripción

- 10
- **ABSOLOM D.R. et al.** *CRC Critical Reviews in Immunology*, 1986, vol. 6 (1), 1-46
 - **SCHROEDER I. et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, February 2010, vol. 125 (2), S41-52
 - **ISHIZAKA K. et al.** *J. Allergy*, 1967, vol. 37, 169-172
 - **WIDE L. et al.** *Lancet*, 1967, vol. 2, 1105 -1109
 - Analytical performance characteristics and clinical utility of immunological assays for human immunoglobulin E antibodies of defined allergen specificities. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CL-SI)*, 2009
 - **ECKMAN J. et al.** *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2009, vol. 5, 2-8
 - **SIMPSON A. et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, vol. 116, 744-749
 - AGILENT IMPEDANCE MEASUREMENT HANDBOOK
 - **ACKMAN J.J. et al.** *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 1984, vol. 11 (4), 281-311
 - **CHEN S.W.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, vol. 33 (1), 196-203
 - **DVORSKIJ, V.YA. et al.** *Izvestiya VUZ: Radioelektronika*, 1998, vol. 41 (7), 75-77
 - **SIMONS F.E.R. et al.** World Allergy Organization Guidelines for the Assessment and Management of Anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, vol. 127, 587-93