

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 578**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01) **G01N 33/20** (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/552 (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/547 (2006.01)
G01N 33/546 (2006.01)
G01N 33/537 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05858304 .8**
 96 Fecha de presentación: **03.11.2005**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1815028**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **MICROBURBUJAS PARA SEPARACIÓN POR AFINIDAD.**

30 Prioridad:
03.11.2004 US 624948 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.03.2012

73 Titular/es:
IRIS MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC.
2075 CORTE DEL NOGAL, SUITE J
CARLSBAD, CA 92011-1415, US

72 Inventor/es:
ADAMS, Thomas y
JABLONSKI, Edward

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 578 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

Microburbujas para separación por afinidad

Este invento se refiere a métodos para aislamiento por afinidad y un ensayo por afinidad basados en microburbujas de albúmina revestidas con una molécula de afinidad.

5 ANTECEDENTES DEL INVENTO

En el campo del aislamiento de células, virus, bacterias y moléculas solubles se han usado diversos tipos de partículas como fase sólida para absorber, o unirse a, la diana de interés. Por ejemplo, unas partículas magnéticas, cuando están revestidas con un ligando, tal como un anticuerpo, se pueden unir a una proteína soluble o célula diana. La diana unida sobre la partícula magnética efectúa una separación de la diana, de otros tipos celulares o proteínas. Ha habido diversas mejoras de este trabajo original y se ha dispuesto durante años de ejemplos comerciales.

Otros han utilizado partículas de látex, liposomas, glóbulos de grasa de leche, partículas de plástico tales como poliestireno y polietileno y polipropileno, nailon, etc. Como soportes para la captura, cada uno de estos tiene sus propios atributos y problemas particulares. La unión inespecífica de proteínas y células no diana es el problema más común con que se encuentran estos métodos, lo que da lugar a una separación imperfecta. Además, la mayoría de los métodos requieren al menos una operación adicional después de la unión para efectuar la separación de la especie no unida de la unida a la partícula; por ejemplo, para las partículas magnéticas se debe aplicar un campo magnético, y a veces se usa una centrifugación para separar las partículas de la disolución o se usa una filtración para separar las partículas de la disolución.

En general, el tiempo requerido para que se unan las proteínas o células diana está relacionado con la superficie específica de las partículas y con la cantidad de partículas por unidad de volumen de la disolución. Cuanta más pequeña es la partícula, más rápida es la unión a causa de su superficie específica aumentada. Desafortunadamente, una mayor superficie específica aumenta generalmente la unión inespecífica.

Los métodos de separación, dependiendo de la naturaleza o principio de la separación, pueden conducir al aislamiento conjunto de partículas diferentes. Esto es evidente en las separaciones basadas en la centrifugación por gravedad, en la que pueden sedimentar conjuntamente partículas y células u otras especies. Además, ciertos tipos celulares, tales como macrófagos y monocitos, pueden ingerir inespecíficamente las partículas y pueden ser aislados junto con las células diana. Aunque las limitaciones individuales de la tecnología previa pueden ser minimizadas o evitadas realizando ciertas operaciones o tomando ciertas precauciones, ciertas limitaciones son inherentes y no pueden ser totalmente superadas. El hecho de que haya muchos planteamientos diferentes con diversos grados de éxito sugiere que se necesita una mejor solución para el problema.

El agente de separación óptimo tendría una superficie específica infinita con una interacción inespecífica nula para que la unión se produjera instantáneamente y se minimizara la unión a moléculas solubles o células no diana. Idealmente, el propio agente debería separarse de la suspensión celular o la disolución de moléculas solubles sin atrapar células ni moléculas no diana, respectivamente.

En el Documento US 2003/104359 se describe el uso de microburbujas proteicas para un aislamiento por afinidad o ensayo por afinidad mediante los cuales se pueden destruir las microburbujas aplicando presión o vacío o mediante un cambio del pH.

SUMARIO DEL INVENTO

El presente invento proporciona un método para el aislamiento por afinidad o ensayo por afinidad de una especie, que comprende:

- (a) proporcionar, en una disolución, microburbujas de albúmina revestidas con una molécula de afinidad que se une específicamente a una especie;
- (b) poner las microburbujas, en una disolución, en contacto con la especie que interacciona con la molécula de afinidad que reviste las microburbujas, generándose de este modo microburbujas revestidas con la especie;
- (c) dejar que las microburbujas revestidas con la especie floten en la parte superior de la disolución, separándose de este modo las microburbujas revestidas con la especie, de la especie libre y la disolución; y
- (d) destruir las microburbujas tratando con un detergente o agente tensioactivo las microburbujas revestidas con la especie.

Las microburbujas pueden ser formadas mediante la introducción de un gas en una disolución de albúmina, por ejemplo, por sonicación. El gas se puede introducir en la albúmina por medio de un proceso que comprende calentar una disolución de albúmina. En otra realización, las microburbujas de albúmina pueden ser estabilizadas, por ejemplo, por desnaturalización de la albúmina o tratamiento con Cr^{+++} .

De acuerdo con el invento, la molécula de afinidad puede ser un receptor, un ligando o un anticuerpo. Alternativamente, la molécula de afinidad puede ser biotina, avidina o estreptavidina.

La molécula de afinidad se puede copular directamente con la microburbuja usando, por ejemplo, un reactivo heterobifuncional tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo. En otra realización del invento, la molécula de afinidad se copula indirectamente con la microburbuja, tal como a través de la interacción de al menos otra molécula. En un aspecto del invento, se copula directamente la microburbuja con estreptavidina y se biotinila la molécula de afinidad, de modo que la estreptavidina y la biotina interaccionan para copular la molécula de afinidad con la microburbuja.

En una realización, la molécula de afinidad se copula a través de un grupo funcional amina presente en la microburbuja.

En una realización, la especie es un receptor, un ligando o un antígeno. En una realización, la especie es un analito. En realizaciones alternativas, la especie es un virus o una célula.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Se ha de entender que tanto la descripción general precedente como la descripción detallada siguiente son sólo ejemplares y explicativas y no son restrictivas del invento reivindicado. Como aquí se utiliza, el uso del singular incluye el plural a menos que se afirme específicamente otra cosa. Como aquí se utiliza, "o" significa "y/o" a menos que se afirme otra cosa. Además, el uso de la expresión "que incluye", así como de otras formas tales como "incluye" e "incluido", no es restrictivo. Como aquí se utiliza, "puede" significa "podría" a menos que se afirme otra cosa.

Los encabezamientos de sección aquí usados son solamente con fines de organización y no han de ser considerados restrictivos del contenido descrito.

Definiciones

Antes de seguir adelante con una descripción de las realizaciones específicas del presente invento, se definirán y describirán diversos términos con detalle.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, las nomenclaturas utilizadas al respecto y los procedimientos, técnicas y métodos de laboratorio aquí descritos son aquellos conocidos en la técnica a la cual pertenecen. Se usan indistintamente símbolos químicos y abreviaturas estándares con los nombres completos representados por dichos símbolos. De este modo, por ejemplo, se entiende que los términos "carbono" y "C" tienen un significado idéntico. Se pueden usar técnicas estándares para las síntesis químicas, las modificaciones químicas, los análisis químicos, la preparación, formulación y distribución farmacéuticas y el tratamiento de pacientes. Se pueden usar técnicas estándares para la metodología de DNA recombinante, la síntesis de oligonucleótidos, el cultivo tisular, y similares. Se pueden llevar a cabo reacciones y técnicas de purificación usando, por ejemplo, kits de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se lleva normalmente a cabo en la técnica o como aquí se describe. Las técnicas y procedimientos precedentes se pueden llevar generalmente a cabo de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales o más específicas que se citan y discuten por toda la memoria descriptiva. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., "Molecule Cloning: A Laboratory Manual" (2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), y Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988), que se incorporan aquí por referencia en su totalidad para cualquier finalidad.

Como aquí se usa, "**burbuja**" se refiere a un glóbulo pequeño, hueco y de poco peso, típicamente un pequeño volumen esférico de gas encerrado dentro de una película delgada. Las burbujas pueden estar llenas de cualquier gas, incluyendo, pero sin limitarse a, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, gases fluorocarbonados, y diversas combinaciones de los mismos, tal como aire. La película delgada es albúmina. En una realización, la película delgada es estable bajo las condiciones y las disoluciones a las que resulta expuesta. En otra realización, la burbuja puede ser selectivamente hecha estallar, machacada o solubilizada. Las "**microburbujas**" son burbujas pequeñas, generalmente con un diámetro en el intervalo de 0,1 a 100 μm , típicamente de 1 a 50, y frecuentemente de 2 a 20 o de 2 a 30 μm .

El término "**analito**", como aquí se utiliza, se refiere a cualquier sustancia que se desea detectar en un ensayo y que puede estar presente en una muestra. El analito puede ser, sin limitación, cualquier sustancia. En una realización preferida del invento, un analito comprende una sustancia para la cual existe un anticuerpo presente en la naturaleza o para la cual se puede preparar un anticuerpo. El analito puede ser, por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un hapteno, un hidrato de carbono, un lípido, un fármaco, una célula, un subcomponente u orgánulo celular (por ejemplo, lisosomas o mitocondrias) u otro compuesto cualquiera de una gran variedad de moléculas biológicas o no biológicas, complejos o combinaciones de los mismos. En otra realización, el analito es un anticuerpo. En aún otra realización, el analito es un ácido nucleico (DNA, RNA, PNA) y ácidos nucleicos que son mezclas de los mismos o que incluyen derivados nucleotídicos o compuestos análogos).

Los analitos ligandos polivalentes que se pueden detectar usando las composiciones, métodos y kits del presente

invento serán normalmente poli(aminoácidos), es decir, polipéptidos y proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, y combinaciones de los mismos. Dichas combinaciones incluyen componentes de células, tejidos, bacterias, virus, paredes celulares, membranas celulares, orgánulos celulares, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos, y similares. De acuerdo con un aspecto del invento, ciertos analitos no contienen ácido nucleico.

- 5 Se puede detectar ventajosamente una gran variedad de analitos proteicos usando los métodos del presente invento. Dichos analitos proteicos pueden ser clasificados de acuerdo con familias, teniendo cada familia unas similares características estructurales, funciones biológicas, relación con microorganismos específicos (particularmente con microorganismos causativos de enfermedad), y demás. Las familias proteicas de particular interés para el presente invento incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citocinas, enzimas, hormonas, antígenos cancerosos, marcadores nutricionales, antígenos tisularmente específicos, y agentes para guerra biológica. Estos analitos proteicos pueden estar presentes en la sangre, suero, plasma, líquido espinal, líquido sinovial, saliva, orina, semen, líquido prostático, células o tejidos.
- 10

Los ejemplos siguientes son ejemplos de clases de analitos proteicos relacionados por estructura que se pueden detectar utilizando los métodos del presente invento:

- 15 protaminas
 histonas
 albúminas
 globulinas
 escleroproteínas
- 20 fosfoproteínas
 mucoproteínas

Los ejemplos siguientes son proteínas clínicamente importantes halladas en el plasma humano, que se pueden detectar usando las composiciones, métodos, y kits del presente invento:

- ∇₁-lipoproteína
- 25 ∇₁-antitripsina
 Transcortina
 Postalbúmina 4,6 S
 Pobre en triptófano
 ∇₁-glicoproteína
- 30 ∇_{1II}-glicoproteína
 Globulina ligante de tiroxina
 Inter-∇-inhibidor de tripsina
 Globulina Gc
 (Gc 1-1)
- 35 (Gc 2-1)
 (Gc 2-2)
 Haptoglobina
 (Hp 1-1)
 (Hp 2-1)
- 40 (Hp 2-2)
 Ceruloplasmina
 Colinesterasa

	∇ ₂ -lipoproteína(s)
	Mioglobina
	Proteína C reactiva
	∇ ₂ -macroglobulina
5	∇ ₂ -HS-glicoproteína
	Zn-∇ ₂ -glicoproteína
	∇ ₂ -neuramino-glicoproteína
	Eritropoyetina
	Lipoproteína ∃
10	Transferrina
	Hemopexina
	Fibrinógeno
	Plasminógeno
	∃ ₂ -glicoproteína I
15	∃ ₂ -glicoproteína II
	Inmunoglobulina G (IgG) o (-globulina G
	Fórmula molecular: ((₂ 6 ₂) o ((₂ 8 ₂))
	Inmunoglobulina A (IgA) o (-globulina A
	Fórmula molecular: (∇ ₂ 6 ₂) ⁿ o (∇ ₂ 8 ₂) ⁿ
20	Inmunoglobulina M (IgM) o (-globulina M
	Fórmula molecular: (: ₂ 6 ₂) ⁵ o (: ₂ 8 ₂) ⁵
	Inmunoglobulina D (IgD) o (-globulina D ((D)
	Fórmula molecular: (* ₂ 6 ₂) o (* ₂ 8 ₂))
	Inmunoglobulina E (IgE) o (-globulina E ((E)
25	Fórmula molecular: (: ₂ 6 ₂) o (: ₂ 8 ₂))
	Cadenas ligeras 6 y 8 libres
	Factores del complemento:
	C'1
	C'1q
30	C'1r
	C'1s
	C'2
	C'3
	∃ ₁ A
35	∇ ₂ D
	C'4

C'5

C'6

C'7

C'8

5 C'9

Los factores de coagulación sanguínea importantes que se pueden detectar usando los métodos del presente invento incluyen los ejemplos enumerados en la Tabla siguiente.

Tabla 1. FACTORES DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA

Designación internacional	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
IIA	Trombina
III	Tromboplastina tisular
V y VI	Proacelerina, globulina aceleradora
VII	Proconvertina
VIII	Globulina antihemofílica (AHG; del inglés, <u>anti</u> hemophilic <u>g</u> lobulin)
IX	Factor de Christmas, componente de la tromboplastina plasmática (PTC; del inglés, <u>p</u> lasma <u>t</u> hromboplastin <u>c</u> omponent)
X	Factor de Stuart-Prower, autoprotrombina III
XI	Tromboplastina plasmática
XIII	Factor estabilizador de fibrina

Las hormonas proteicas importantes que se pueden detectar usando las composiciones, métodos, y kits del presente invento incluyen:

10 Hormonas peptídicas y proteicas

Hormona paratiroidea (parathormona)

Tirocalcitonina

Insulina

Glucagón

15 Relaxina

Eritropoyetina

Melanotropina (hormona estimulante de melanocitos; intermedina)

Somatotropina (hormona del crecimiento)

Corticotropina (hormona adrenocorticotrópica)

20 Tiotropina

Hormona estimulante del folículo

Hormona luteinizante (hormona estimulante de células intersticiales)

Hormona luteomamotrópica (luteotropina, prolactina)

Gonadotropina (gonadotropina coriónica)

25 Hormonas tisulares

Secretina

Gastrina

	Angiotensinas I y II
	Bradicinina
	Lactógeno placentario humano
	Citocinas
5	IL-1
	IL-2
	IL-4
	IL-6
	IL-8
10	IL-10
	EGF
	TNF
	NGF
	Antígenos cancerosos
15	PSA
	CEA
	∇-fetoproteína
	Fosfatasa ácida
	CA 19.9
20	CA 125
	Antígenos tisularmente específicos
	Fosfatasa alcalina
	Mioglobina
	CPK-MB
25	Troponina
	BNP
	Pro-BNP
	Calcitonina
	Proteína básica de la mielina
30	Hormonas peptídicas de la neurohipófisis
	Oxitocina
	Vasopresina
	Factores liberadores (RF; del inglés, <u>r</u> eleasing <u>f</u> actors) CRF, LRF, TRF, RF de somatotropina, GRF, FSH-RF, PIF, MIF
35	Ricina
	Toxina diftérica
	Toxina botulínica

Enterotoxina B de *Staphylococcus*

Las bacterias y virus son también analitos que se pueden detectar usando los métodos del presente invento. Entre estos analitos biológicos se incluyen, entre otros:

5 Corinebacterias
Corynebacterium diphtheria

Neumococos
Diplococcus pneumoniae

10 Estreptococos
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius

Estafilococos
Staphylococcus aureus
Staphylococcus albus

15 Neisserias
Neisseria meningitidis
Neisseria gonorrhoeae

Enterobacteriáceas
Coliformes
20 *Escherichia coli*
Aerobacter aerogenes
Klebsiella pneumoniae
Salmonelas
Salmonella typhosa
Salmonella choleraesuis
25 *Salmonella typhimurium*
Shigelas
Shigella dysenteria
Shigella schmitzii
Shigella arabinotard
30 *Shigella flexneri*
Shigella boydii
Shigella sonnei

Otros bacilos entéricos
35 *Proteus vulgaris*
Proteus mirabilis
Proteus species
Proteus morgani
Pseudomonas aeruginosa
40 *Alcaligenes faecalis*
Vibrio cholerae

Grupo de Hemophilus-Bordetella
Hemophilus influenza
Hemophilus ducryi
45 *Hemophilus hemophilus*
Hemophilus aegypticus
Hemophilus parainfluenza
Bordetella pertussis

Pasteurelas
50 *Pasteurella pestis*
Pasteurella tularensis

Brucelas
Brucella melitensis
Brucella abortus
Brucella suis

55 Bacilos aeróbicos formadores de esporas
Bacillus anthracis

Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Bacillus cereus

Bacilos anaeróbicos formadores de esporas

- 5
Clostridium botulinum
Clostridium tetani
Clostridium perfringens
Clostridium novyi
10
Clostridium septicum
Clostridium histolyticum
Clostridium tertium
Clostridium bifermentans
Clostridium sporogenes

Micobacterias

- 15
Mycobacterium tuberculosis hominis
Mycobacterium bovis
Mycobacterium avium
Mycobacterium leprae
Mycobacterium paratuberculosis

20
Actinomicetos (bacterias similares a hongos)

- Actinomyces israelii*
Actinomyces bovis
Actinomyces naeslundii
25
Nocardia asteroides
Nocardia brasiliensis

Las espiroquetas

- Treponema pallidum*
Treponema pertenue
Treponema carateum
30
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola
Tripanosomas

Micoplasmas

- 35
Mycoplasma pneumoniae

Otros patógenos

Rickettsias (parásitos similares a bacterias)

- Rickettsia prowazekii*
Rickettsia mooseri
40
Rickettsia rickettsii
Rickettsia conori
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus
Rickettsia akari
45
Rickettsia tsutsugamushi

Clamidias (parásitos inclasificables, bacterianos/víricos)

Agentes de Clamidias (denominación incierta)

Hongos

- 50
Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis
Hisoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Pal-acoccidioides brasiliensis
Candida albicans
55
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifer (Absidia corymbifera)
Rhizopus oryzae
Rhizopus arrhizua

	Ficomictos
	<i>Rhizopus nigricans</i>
	<i>Sporotrichum schenkii</i>
	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5	<i>Fonsecaea compact</i>
	<i>Fonsecaea dermatidis</i>
	<i>Cladosporium carrionii</i>
	<i>Phialophora verrucosa</i>
10	<i>Aspergillus nidulans</i>
	<i>Madurella mycetomi</i>
	<i>Madurella grisea</i>
	<i>Allescheria boydii</i>
	<i>Phialophora jeanselmei</i>
	<i>Microsporum gypseum</i>
15	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	<i>Keratinomyces ajelloi</i>
	<i>Microsporum canis</i>
	<i>Microsporum adouini</i>
	<i>Trichophyton rubrum</i>
20	<u>Virus</u>
	<u>Adenovirus</u>
	<u>Herpesvirus</u>
	<i>Herpes simplex</i>
	<i>Varicella</i> (varicela)
25	<i>Herpes zoster</i> (herpes)
	Virus B
	<i>Cytomegalovirus</i>
	<u>Poxvirus</u>
	<i>Variola</i> (viruela)
30	<i>Vaccinia</i>
	<i>Poxvirus bovis</i>
	<i>Paravaccinia</i>
	<i>Molluscum contagiosum</i>
	<u>Picornavirus</u>
35	<i>Poliovirus</i>
	<i>Coxsackievirus</i>
	Echovirus
	Rhinovirus
40	<u>Mixovirus</u>
	<i>Parainfluenza</i> (1-4)
	Virus de las paperas
	Virus de la Enfermedad de Newcastle
	Virus del sarampión
	Virus de la peste bovina
45	Virus del moquillo canino
	Virus respiratorio sincitial
	Virus de la rubéola
	<u>Arbovirus</u>
50	Virus de la encefalitis equina oriental
	Virus de la encefalitis equina occidental
	Virus Sindbis
	Virus Chikugunya
	Virus del bosque de Semliki
	Virus Mayora
55	Virus de la encefalitis de St. Louis
	<i>Rickettsia prowazekii</i>
	Virus de la encefalitis de California
	Virus de la fiebre por garrapatas de Colorado
	Virus de la fiebre amarilla
60	Virus del dengue
	<u>Reovirus</u>
	<i>Reovirus</i> Tipos 1-3

Retrovirus

Virus I y II de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Virus linfotrópicos humanos I y II de células T (HTLV; del inglés, human T-cell lymphotropic virus)

Hepatitis

5 Virus de la hepatitis A

Virus de la hepatitis B

Virus de la hepatitis C

Virus tumorales

10 Virus de la leucemia de Rauscher

Virus de Gross

Virus de la leucemia de Moloney

Virus del papiloma humano

15 Además, puede resultar deseable detectar tejidos o células normales o enfermas de un paciente. La presencia o ausencia de cierto cáncer circulante u otras células puede ser, por ejemplo, el diagnóstico de una enfermedad. De esta manera, las células endógenas de un paciente humano son analitos que pueden ser ventajosamente detectados usando los métodos del presente invento.

20 La expresión "**molécula de afinidad**", como aquí se utiliza, se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse específicamente a otra molécula. En una realización, la molécula de afinidad es un anticuerpo. En otra realización, la molécula de afinidad es un antígeno. En otras realizaciones del invento, las moléculas de afinidad pueden incluir, sin limitación: ácidos nucleicos (DNA, RNA, PNA y ácidos nucleicos que son mezclas de los mismos o que incluyen derivados nucleotídicos o compuestos análogos); moléculas receptoras biológicas, tal como el receptor de insulina; ligandos de receptores (por ejemplo, la insulina para el receptor de insulina); y moléculas biológicas, químicas u otras que tienen afinidad por otra molécula, tales como biotina y avidina. No es necesario que las moléculas de afinidad comprendan una molécula completa presente en la naturaleza, sino que pueden consistir en sólo una porción, fragmento o subunidad de una molécula presente o no en la naturaleza, tal como, por ejemplo, el fragmento Fab de un anticuerpo. La molécula de afinidad puede comprender además un marcador que pueda ser detectado.

30 Se pueden generar moléculas de afinidad mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden hallar en un suero, preparado a partir de fluido ascítico o un sobrenadante de un cultivo tisular de hibridomas, o pueden proceder de un sistema de expresión recombinante, como es bien sabido en la técnica. Se pueden generar fragmentos, porciones o subunidades de, por ejemplo, un anticuerpo, receptor u otra especie por un medio químico, enzimático u otro para obtener, por ejemplo, moléculas bien conocidas (por ejemplo, Fab y Fab') o nuevas. El presente invento también contempla que las moléculas de afinidad puedan incluir moléculas recombinantes, quiméricas e híbridas, tales como anticuerpos humanizados y primatizados, y otras formas de anticuerpo no presentes en la naturaleza. Los expertos en la técnica reconocerán que los ejemplos no restrictivos anteriormente proporcionados que describen diversas formas de anticuerpos se pueden también extender a otras moléculas de afinidad para que las formas recombinantes, quiméricas, híbridas, truncadas, etc., de moléculas que no son anticuerpos se puedan usar en los métodos del presente invento.

40 Por las expresiones "**que se une específicamente**" y "**unión específica**", como aquí se utilizan, se quiere significar que un anticuerpo u otra molécula se une a una diana, tal como un antígeno, ligando u otro analito, con una afinidad mayor que aquella con que se une a otras moléculas bajo las condiciones especificadas. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, como es sabido en la técnica, son moléculas polipeptídicas que contienen regiones que se pueden unir a otras moléculas, tales como antígenos. "Que se une específicamente" puede significar que un anticuerpo u otra molécula de afinidad se une a una molécula de analito diana con una afinidad al menos aproximadamente 10^6 órdenes de magnitud mayor, preferiblemente una afinidad al menos aproximadamente 10^7 órdenes de magnitud mayor, más preferiblemente una afinidad al menos aproximadamente 10^8 órdenes de magnitud mayor, y muy preferiblemente una afinidad al menos aproximadamente 10^9 órdenes de magnitud mayor, que la afinidad con que se unen moléculas no relacionadas a la molécula diana. Típicamente, la unión específica se refiere a afinidades en el intervalo de aproximadamente 10^6 órdenes de magnitud a aproximadamente 10^9 órdenes de magnitud mayores que las afinidades de la unión inespecífica. La unión específica se puede caracterizar por afinidades superiores a 10^9 órdenes de magnitud con respecto a la unión inespecífica. Siempre que aquí aparezca un intervalo, como en "1-10" o "uno a diez", el intervalo se refiere, sin limitación, a cada número entero o unidad de medida en el intervalo dado. De este modo, por 1-10 se quiere significar cada uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y cualquier subunidad intermedia.

55 Los "**anticuerpos policlonales**" o "**PAbs**" son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo procedentes de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o un derivado antigénico funcional del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar animales huésped, tales como conejos, ratones y cabras, por inyección con un antígeno o un producto de conjugación de hapteno-vehículo, opcionalmente complementados con agentes adyuvantes. Los anticuerpos policlonales pueden estar no purificados, purificados o parcialmente purificados de otras especies en un suero. Las técnicas para la preparación y purificación de anticuerpos policlonales son bien conocidas en este campo técnico y se describen en diversas referencias generales y más específicas,

incluyendo, pero sin limitarse a, Kabat y Mayer, "Experimental Immunochemistry", 2ª edición [Thomas, Springfield, Illinois, EE.UU. (1961)]; Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" [Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU. (1988)]; y Weir, "Handbook of Experimental Immunology, 5ª edición [Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts, EE.UU. (1996)].

5 Se pueden obtener "**anticuerpos monoclonales**" o "**MABs**", que son poblaciones homogéneas de anticuerpos hacia un antígeno particular, mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo, tal como por cultivo continuo de líneas celulares. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas de Köhler y Milstein [Nature 256: 495-7 (1975); y Patente de EE.UU. nº 4.376.110], la técnica de hibridomas de células B humanas [Kosbor et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-30 (1983)] y la técnica de hibridomas-EBV [Cole et al. en "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., New York, páginas 77-96 (1985)]. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase inmunoglobulínica, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el MAB de este invento puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*. La producción de títulos elevados de MABs *in vivo* hace que éste sea un método de producción actualmente preferido.

15 Además, se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de "**anticuerpos quiméricos**" [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855 (1984); Takeda et al., Nature 314: 452-54 (1985)] mediante el corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con una apropiada especificidad antigénica junto con genes de una molécula de anticuerpo humana con una apropiada actividad biológica. Un anticuerpo quimérico puede ser una molécula cuyas diferentes porciones proceden de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable procedente de un MAB murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

20 Alternativamente, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena [Patente de EE.UU. nº 4.946.778; Bird, Science 242: 423-26 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83 (1988); y Ward et al., Nature 334: 544-46 (1989)], para producir anticuerpos de una sola cadena-gen adecuados para uso en el presente invento. Los anticuerpos de una sola cadena se forman típicamente por enlace de los fragmentos de cadenas pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, para dar lugar a un polipéptido de una sola cadena.

25 Mediante técnicas conocidas se pueden generar fragmentos de anticuerpo que reconozcan epítopos específicos. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no se limitan a: los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina, y los fragmentos Fab que se pueden generar al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bancos de expresión de Fab [Huse et al., Science 246: 1275-81 (1989)] para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

30 El término "**hapteno**", como aquí se utiliza, se refiere a un pequeño determinante antigénico proteico o no proteico que puede ser reconocido por un anticuerpo. Típicamente, los haptenos no provocan la formación de anticuerpos en un animal a menos que formen parte de una especie más grande. Por ejemplo, se copulan frecuentemente pequeños haptenos peptídicos con una proteína vehicular, tal como hemocianina de lapa *Fissurella*, para generar una respuesta de anticuerpos anti-hapteno. Los "**antígenos**" son macromoléculas capaces de generar una respuesta de anticuerpos en un animal y ser reconocidas por el anticuerpo resultante. Tanto los antígenos como los haptenos comprenden al menos un determinante antigénico o "**epítipo**", que es la región del antígeno o hapteno que se une al anticuerpo. Típicamente, el epítipo de un hapteno es la molécula completa.

35 "**Receptor**" o "**receptor biológico**" se refiere típicamente a una estructura molecular dentro de, o sobre, la superficie de una célula, caracterizada por la unión selectiva de una sustancia específica (por ejemplo, un "**ligando**") y que da lugar a un efecto fisiológico específico que acompaña a la unión. Los ejemplos de receptores incluyen receptores de la superficie celular para hormonas peptídicas, neurotransmisores, antígenos, fragmentos del complemento e inmunoglobulinas, y receptores citoplásmicos para hormonas esteroides. Sin embargo, como aquí se utiliza, el receptor será típicamente aislado y purificado y no es necesario que efectúe o sea capaz de efectuar un efecto fisiológico u otro efecto biológico. Los métodos del presente invento explotan la unión selectiva del receptor a la sustancia específica.

40 En general, el término "**ligando**" se refiere a una molécula que se une a un receptor. Típicamente, un ligando es una molécula pequeña y soluble, tal como una hormona o un neurotransmisor.

45 La expresión "**soporte sólido**" se refiere a cualquier fase sólida que se puede utilizar para inmovilizar, por ejemplo, un analito, un anticuerpo o un complejo. Los soportes sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen las paredes de pocillos de una cubeta de reacción, tal como una placa para microtitulación, las paredes de tubos de ensayo, glóbulos de poliestireno, glóbulos paramagnéticos o no magnéticos, membranas de nitrocelulosa, membranas de nailon, micropartículas tales como partículas de látex, y glóbulos rojos de oveja (u otro animal). Los materiales típicos para soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliestireno, celulosa, nailon, látex y derivados de los mismos. Además, el soporte sólido puede ser revestido, derivatizado o, en cualquier caso, modificado para promover la adhesión de las moléculas deseadas (por ejemplo, analitos) y/o obstaculizar la unión inespecífica u otras interacciones indeseadas. La elección de una "fase sólida" específica no es normalmente

crítica, y dicha fase puede ser seleccionada por un experto en la técnica dependiendo del ensayo empleado. De esta manera, las partículas de látex, micropartículas, glóbulos paramagnéticos o no magnéticos, membranas, tubos de plástico, paredes de pocillos para microtitulación, chips de vidrio o silicio y glóbulos rojos son todos soportes sólidos adecuados. Convenientemente, el soporte sólido puede ser seleccionado para acomodar diversos métodos de detección. Por ejemplo, se pueden utilizar placas de 96 o 384 pocillos para ensayos que serán automatizados mediante, por ejemplo, estaciones de trabajo robóticas, y/o aquellos en que se realizará la detección usando, por ejemplo, un dispositivo lector de placas. Para los métodos del presente invento que pueden implicar una operación de detección autorradiográfica o quimioluminiscente en que se utiliza una visualización basada en una película, el soporte sólido puede ser una membrana delgada, tal como una membrana de nitrocelulosa o nailon. De acuerdo con un método también aquí descrito en el que se llevan a cabo inmunoensayos de tipo sándwich, se emplean típicamente las paredes de los pocillos de una cubeta de reacción. Alternativamente, se pueden usar glóbulos paramagnéticos como un soporte sólido. Los métodos adecuados para inmovilizar moléculas sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares, y combinaciones de las mismas. Sin embargo, el método de inmovilización no es típicamente importante y puede implicar mecanismos de adsorción no caracterizados. De este modo, un "soporte sólido", como aquí se utiliza, se puede referir a cualquier material que sea insoluble o que se pueda hacer insoluble mediante una reacción subsiguiente. El soporte sólido puede ser escogido por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar un reactivo de captura. Alternativamente, la fase sólida puede conservar un receptor adicional que tenga la capacidad para atraer e inmovilizar un reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia que esté opuestamente cargada con respecto al propio reactivo de captura o con respecto a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura. Como también se describe aquí, una molécula receptora adicional puede ser cualquier elemento ligante específico que esté inmovilizado sobre (fijado a) la fase sólida y que tenga la capacidad para inmovilizar un reactivo de captura por medio de una reacción de unión específica. La molécula receptora adicional permite la inmovilización indirecta del reactivo de captura a una fase sólida antes de, o durante, la realización del ensayo. De este modo, la fase sólida puede ser un plástico, un plástico derivatizado, un metal paramagnético o no magnético, la superficie de vidrio o silicio de un tubo de ensayo, un pocillo para microtitulación, una lámina, un glóbulo, una micropartícula, un chip u otras configuraciones conocidas por quienes tienen una experiencia normal en la técnica.

En general, "**péptido**" se refiere a una cadena corta de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Los péptidos comprenden típicamente cadenas de aminoácidos de aproximadamente 2-100, más típicamente de aproximadamente 4-50 y muy comúnmente de aproximadamente 6-20, aminoácidos. En general, "**polipéptido**" se refiere a secuencias individuales de aminoácidos de cadenas lineales o ramificadas que son típicamente más largas que las de los péptidos. Los "**polipéptidos**" comprenden habitualmente una longitud de al menos aproximadamente 100 a 1000 aminoácidos, más típicamente de al menos aproximadamente 150 a 600 aminoácidos, y frecuentemente de al menos aproximadamente 200 a aproximadamente 500 aminoácidos. Las "**proteínas**" incluyen polipéptidos individuales y también complejos de múltiples cadenas polipeptídicas, que pueden ser iguales o diferentes. Las múltiples cadenas de una proteína se pueden caracterizar por sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria así como por la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos; se pueden mantener juntas mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro; y pueden incluir modificaciones posteriores a la síntesis tales como, sin limitación, glicosilación, fosforilación, truncamientos y otros procesamientos. Los anticuerpos tales como, por ejemplo, las proteínas IgG están típicamente compuestos de cuatro cadenas polipeptídicas (es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) que son mantenidas juntas por enlaces disulfuro. Además, las proteínas pueden incluir componentes adicionales tales como metales asociados (por ejemplo, hierro, cobre y azufre), u otros restos. Las definiciones de péptidos, polipéptidos y proteínas incluyen, sin limitación, formas biológicamente activas e inactivas; formas desnaturalizadas y nativas; así como formas variantes, modificadas, truncadas, híbridas y quiméricas de las mismas. Los péptidos, polipéptidos y proteínas se pueden obtener de cualquier fuente o mediante cualquier método, incluyendo, pero sin limitarse a, extracción de tejidos u otros materiales presentes en la naturaleza; producción recombinante en organismos huésped tales como células de bacterias, hongos, plantas, insectos o animales; y síntesis química usando métodos que son bien conocidos por el técnico experto.

La expresión "**producto de conjugación**", como aquí se usa, se refiere a dos moléculas que se han fijado covalentemente o, en cualquier caso, se han unido entre sí. En una realización, se genera un producto de conjugación de ácido nucleico al unir covalentemente un ácido nucleico con una proteína, polipéptido u otra molécula de afinidad. En una realización preferida del invento, la proteína, polipéptido u otra molécula de afinidad está covalentemente fijada a un ácido nucleico por medio de un grupo enlazante para formar un producto de conjugación.

Un "**kit**" para detectar la presencia de un analito en una muestra mediante los métodos del invento puede comprender, a modo de ejemplo, al menos un medio recipiente en el que está dispuesta una pareja ligante específica para el analito seleccionado. El kit puede comprender además otros recipientes que comprendan uno o más de los elementos siguientes: tampones, disoluciones u otros reactivos y materiales necesarios para llevar la detección del analito a cabo; reactivos que permitan multiplicar los componentes de sondas de ácido nucleico de las parejas ligantes; y reactivos que permitan detectar la presencia de componentes de ácido nucleico después de la multiplicación. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para su uso. El kit, si está destinado a un uso diagnóstico, puede incluir también la notificación de uso aprobado por la "Food and Drug Administration" e instrucciones para el mismo.

Específicamente, un kit compartimentado incluye cualquier kit en que estén contenidos reactivos en recipientes separados. Dichos recipientes incluyen pequeños recipientes de vidrio, recipientes de plástico o tiras de plástico o

papel. Dichos recipientes permiten la transferencia eficaz de reactivos de un compartimento a otro para que las muestras y los reactivos no se contaminen cruzadamente y se puedan añadir los agentes o disoluciones de cada recipiente de forma cuantitativa de un compartimento a otro. Dichos recipientes pueden incluir un recipiente que admita una muestra de ensayo, un recipiente que contenga la sonda o los cebadores usados en el ensayo, recipientes que contengan tampones y reactivos (tales como disolución salina tamponada con fosfato, tampones de Tris, y similares), y recipientes que contengan los reactivos usados para detectar el ácido nucleico marcador, el producto multiplicado o similar. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que se pueden incorporar fácilmente parejas ligantes, a uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

Un kit para copular DNA con un anticuerpo u otra molécula de afinidad mediante los métodos del invento puede comprender al menos un medio recipiente en que esté dispuesto el DNA activado liofilizado. El kit puede comprender además otros recipientes que comprendan uno o más de los elementos siguientes: reactivos, tampones y agentes que permitan detectar la presencia de ácido nucleico después de la reacción. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para su uso. Un kit para preparar o utilizar las nuevas composiciones y métodos para aislar y ensayar analitos aquí descritos puede incluir la microburbuja ya fabricada o la película delgada usada para crear la microburbuja. Asimismo, la microburbuja del kit puede ya tener o no la molécula de afinidad fijada. El kit puede comprender además otros recipientes que comprendan uno o más de los elementos siguientes: reactivos, tampones y agentes que permitan preparar las microburbujas o que sean útiles para emplearlas en los métodos de aislamiento por afinidad, purificación, concentración, etc. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para su uso. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que se pueden incorporar fácilmente las composiciones y métodos descritos en el presente invento a uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

El presente invento proporciona una metodología para aislar y ensayar analitos, incluyendo también células, virus, subcomponentes celulares y moléculas solubles en disolución. Se basa en microburbujas de albúmina revestidas para que se una específicamente el analito diana (célula, virus, subcomponente celular o molécula soluble). De acuerdo con el invento, las microburbujas son revestidas con, o, en cualquier caso, preparadas para que presenten en su superficie exterior, una molécula de afinidad. La metodología del presente invento puede ser también usada para concentrar analitos, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos, antígenos, proteínas y ácidos nucleicos.

En una realización, las microburbujas revestidas con molécula de afinidad comprenden además un marcador detectable. En aún otra realización, la propia molécula de afinidad es el marcador detectable. En estas realizaciones, la cantidad o presencia o ausencia del analito, especie o microburbuja se puede cuantificar o detectar en virtud del marcador. En una realización, el marcador sobre la microburbuja es un ácido nucleico que puede ser multiplicado y detectado. Las técnicas utilizadas para llevar a cabo la detección pueden incluir, pero no se limitan a, PCR, secuenciación de nucleótidos, secuenciación por PCR, tecnología de balizas moleculares, hibridación, hibridación seguida de PCR, fluorescencia, radiomarcación, fosforescencia y absorbancia. Los ejemplos de reactivos que se pueden usar para la detección incluyen, pero no se limitan a, radioetiquetas, etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina), fluorescencia, fosforescencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, etiquetas de afinidad (por ejemplo, biotina, avidina o estreptavidina) y otros reactivos bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica. Estas realizaciones no son restrictivas y se pueden idear otras realizaciones que se usen con el invento.

Las microburbujas de albúmina se forman típicamente mediante la introducción de una disolución de albúmina mediante, por ejemplo, sonicación. Las burbujas pueden ser llenadas con cualquier gas, incluyendo, pero sin limitarse a, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, gases fluorocarbonados y diversas combinaciones de los mismos, tal como aire. En un aspecto del invento, se puede introducir gas en la albúmina por medio de un proceso que comprende calentar una disolución de albúmina. Sin limitarse a una teoría específica, el calentamiento puede servir para estabilizar las microburbujas de albúmina al desnaturalizar la proteína. En otra realización, las microburbujas de albúmina pueden ser estabilizadas, por ejemplo, desnaturalizando la proteína, fijando la proteína, entrecruzando la proteína o mediante tratamiento con Cr^{+++} . En un aspecto, las microburbujas se estabilizan por entrecruzamiento con aldehídos tales como glutaraldehído y formaldehído.

En general, las microburbujas de albúmina tienen un diámetro en el intervalo de 0,1 a 100 μm , típicamente de 1 a 50 μm , y frecuentemente de 2 a 20 o de 2 a 30 μm .

De acuerdo con el invento, la molécula de afinidad puede ser un receptor, un ligando o un anticuerpo. Alternativamente la molécula de afinidad puede ser biotina, avidina o estreptavidina. En una realización del invento, las microburbujas son biotiniladas y son luego revestidas con estreptavidina, lo que crea una microburbuja que puede ser fácilmente revestida con un ligando biotinilado tal como un anticuerpo. En otra realización, las microburbujas son microburbujas revestidas con ligando.

El revestimiento de las microburbujas con una molécula de afinidad puede ser llevado a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. Ventajosamente, las proteínas contienen grupos amina funcionales que pueden servir como base para numerosas modificaciones y reacciones de copulación, tal como una reacción con aldehídos. Además, el técnico experto reconocerá que la albúmina que compone las microburbujas puede ser químicamente derivatizada o funcionalizada para que interaccione covalentemente con diversos tipos de moléculas de afinidad. El

técnico experto estará familiarizado con una diversidad de reactivos, productos y kits comerciales para la copulación de proteínas y otras moléculas con las microburbujas del invento. La molécula de afinidad puede ser directamente copulada con la proteína, por ejemplo, usando un reactivo heterobifuncional tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo.

5 En otra realización del invento, la molécula de afinidad se copula indirectamente con la albúmina, tal como por medio de la interacción de al menos una molécula distinta. En un aspecto del invento, se copulan directamente las microburbujas con estreptavidina y se biotinila la molécula de afinidad, de modo que la estreptavidina y la biotina interactúan para copular la molécula de afinidad con la proteína. Las interacciones de biotina y avidina/estreptavidina son bien conocidas en la técnica, como lo son los métodos para copular estas moléculas con otras especies. También se
10 puede hacer referencia a un libro de texto o manual de laboratorio general o más específico que describa la química, biología e interacciones de la biotina, avidina y estreptavidina, y/o a los métodos para copular biotina y avidina/estreptavidina con otras moléculas. Véase, por ejemplo, "Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook" (redactado por Savage et al., Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EE.UU., 1992).

15 El invento proporciona métodos para el aislamiento por afinidad o ensayo por afinidad de una especie. El método comprende las operaciones de proporcionar microburbujas revestidas con una molécula de afinidad en una disolución, poner las microburbujas en contacto con una especie que interacciona con la molécula de afinidad en una disolución, generándose de este modo microburbujas revestidas con la especie, y separar de la disolución las microburbujas revestidas con la especie –lo que permite que las microburbujas revestidas con la especie floten en la parte superior de la disolución– separándose de este modo la especie de la disolución. De esta manera, se puede
20 aislar por afinidad o ensayar por afinidad toda clase de especies, incluyendo proteínas (antígenos, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas), ácidos nucleicos, lipoproteínas, grasas, triglicéridos, azúcares, hidratos de carbono, virus, células, componentes celulares, orgánulos subcelulares y componentes de orgánulos subcelulares, así como complejos de los mismos.

25 En aún otra realización del invento, se proporcionan métodos para la concentración de una especie por afinidad. De acuerdo con estas realizaciones, el método comprende las operaciones de proporcionar microburbujas revestidas con una molécula de afinidad en una disolución, poner las microburbujas en contacto con una especie que interacciona con la molécula de afinidad en una disolución, generándose de este modo microburbujas revestidas con la especie, y separar de la disolución las microburbujas revestidas con la especie –lo que permite, en una realización preferida, que las microburbujas revestidas con la especie floten en la parte superior de la disolución– separándose
30 de este modo la especie de la disolución. De esta manera, se puede concentrar toda clase de especies tales como proteínas (antígenos, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas), ácidos nucleicos, lipoproteínas, grasas, triglicéridos, azúcares, hidratos de carbono, virus, células, componentes celulares, orgánulos subcelulares y componentes de orgánulos subcelulares, así como complejos de los mismos.

35 La especie que se puede aislar, ensayar, purificar o concentrar puede ser cualquier clase de material, incluyendo proteínas (antígenos, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas), ácidos nucleicos (RNA, DNA, compuestos nucleotídicos análogos, mezclas de los mismos, etc.), lipoproteínas, grasas, triglicéridos, azúcares, hidratos de carbono, virus, células, componentes celulares (liposomas, retículo endoplásmico, etc.), orgánulos subcelulares (mitocondrias, etc.) y componentes de orgánulos subcelulares, así como complejos de los mismos. En un aspecto de esta realización, la especie es un receptor, un ligando o un antígeno. En una realización, la especie es un analito. En
40 realizaciones alternativas, la especie es un virus o una célula.

Las microburbujas revestidas se unen a la especie diana, incluyendo células, virus, analitos u otras moléculas, y suben luego a la superficie de la disolución, separándose de este modo de la disolución de contacto y las especies no diana. En ciertas realizaciones en que el tiempo de separación es importante, la disolución que contiene las microburbujas puede ser centrifugada o sometida a una trampa de burbujas para efectuar la separación más rápidamente.
45

Las microburbujas de albúmina tienen la útil propiedad de poder ser fácilmente destruidas y hechas desaparecer visualmente al añadir una pequeña cantidad de un detergente o agente tensioactivo. Este aspecto del invento es particularmente útil cuando es deseable aislar la especie diana desprovista de la microburbuja de captura. Por ejemplo, puede ser deseable caracterizar el fenotipo de una célula aislada por afinidad o liberar la célula aislada para un
50 ulterior análisis o propagación. Los métodos del presente invento proporcionan, en ciertas realizaciones, un medio sencillo para liberar la especie de la microburbuja de captura, lo que evita reactivos potencialmente perjudiciales, tales como enzimas, productos químicos agresivos y valores de pH extremos.

También se describen aquí métodos para liberar el analito o especie de la microburbuja mediante un medio enzimático o químico o por aplicación de presión o vacío.

55 Las microburbujas tienen la ventaja adicional con respecto a las partículas sólidas, en cuanto a aplicaciones de afinidad, de que la fuerza normal de la gravedad y la fuerza de flotación de la microburbuja van en sentidos diferentes, lo que da lugar a una reducción significativa de la unión inespecífica y a la captura de especies que típicamente se hundían hacia el fondo del recipiente de reacción durante la separación. Se puede potenciar la separación al forzar a las células no unidas a alejarse de las microburbujas en un pequeño campo centrífugo, como con una velocidad

centrífuga moderada, bajo unas condiciones que no afecten negativamente a las microburbujas.

Como se describe más adelante bajo EJEMPLOS, experimentos con microburbujas de albúmina revestidas con un anticuerpo antibacteriano y mezcladas con una suspensión de bacterias dieron lugar a la esterilización de la suspensión, aislándose todas las bacterias junto con las microburbujas. Similarmente, en experimentos de control, las microburbujas sin anticuerpo específico mostraron poca unión inespecífica, lo que dio lugar a la falta de bacterias detectables que resultaran conjuntamente purificadas con las microburbujas después de la separación.

Se entenderá que, a la luz de las enseñanzas aquí contenidas, la aplicación de las enseñanzas del presente invento a un problema o situación específico estará dentro de las capacidades de quien tiene una experiencia normal en la técnica. El invento será adicionalmente ilustrado por referencia a los siguientes Ejemplos no restrictivos. Los ejemplos siguientes, incluyendo los experimentos y los resultados alcanzados, se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no se ha de considerar que son restrictivos del presente invento.

Ejemplos

MICROBURBUJAS DE ALBÚMINA

Ejemplo 1: Preparación de microburbujas de albúmina

Se diluyó una disolución de albúmina (humana) al 5%, USP (Bayer Corporation, Elkhart, Indiana, EE.UU.), hasta el 1% a temperatura ambiental con disolución salina normal saturada de aire. Se pusieron veinte mililitros de la disolución diluida en un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml de capacidad y se sumergió el vaso de precipitados, por debajo de su nivel de 25 ml, en un baño de agua a 85 °C. Se controló la temperatura de la disolución de albúmina usando un termómetro digital, con agitación suave de la disolución. A una temperatura de procesamiento de 73 °C, se puso la sonda de un Branson Digital Sonifier®, Modelo 450 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, Connecticut, EE.UU.), en contacto con la superficie de la disolución de albúmina y se realizó inmediatamente una sonicación con una amplitud del 80% durante 10 segundos. Se retiró el vaso de precipitados del baño de agua y se puso en hielo triturado, y se agitó suavemente su contenido hasta que la temperatura se redujo a 40 °C. La suspensión de microburbujas de albúmina fue transferida a una bolsa flexible de 150 ml de capacidad (Flexboy® Bag, Stedim, Concord, California, EE.UU.) a temperatura ambiental. Se repitió varias veces el proceso con disolución fresca hasta que se llenó la bolsa. Se ajustó la suspensión de microburbujas a un contenido de azida sódica de 0,05% y se almacenó verticalmente la bolsa bajo refrigeración durante al menos 24 horas. El proceso de sonicación convirtió aproximadamente el 5% de la albúmina soluble en microburbujas de albúmina insolubles, llenas de aire.

Ejemplo 2: Preparación de microburbujas de albúmina estabilizadas con cromo

En ciertos experimentos, se estabilizaron las microburbujas de albúmina por tratamiento con Cr⁺⁺⁺. Se dejó que las microburbujas de albúmina flotaran y se retiró la fase líquida y se reemplazó por sulfato de cromo y potasio 5 mM. Las microburbujas fueron mantenidas en suspensión mediante una suave agitación y fueron incubadas durante 30 minutos en un baño de agua a 60 °C. Después de la incubación, la disolución de cromo fue eliminada por lavado del modo descrito más adelante y fue reemplazada por albúmina sérica humana al 1% en disolución salina normal. Las microburbujas de albúmina tratadas con cromo fueron tratadas del modo descrito para las microburbujas no tratadas.

Ejemplo 3: Preparación de microburbujas de albúmina revestidas con biotina

La disolución de albúmina no convertida fue drenada desde debajo de la capa flotante de microburbujas y fue reemplazada por disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline), fría y saturada de aire, pH de 7,4, que contenía poli(alcohol vinílico) (PVA; del inglés, polyvinyl alcohol) al 0,2% (peso molecular de 30.000 -70.000) (PVA/PBS). Las microburbujas fueron resuspendidas mediante una suave agitación y fueron transferidas a jeringas de plástico desechables provistas de una válvula obturadora montada en el fondo. Se eliminó por lavado la albúmina soluble residual de las microburbujas mediante repetidas centrifugaciones a 200 x g y 4 °C durante 5 minutos, drenado y reposición de la disolución con PVA/PBS fresco frío, saturado de aire. Las microburbujas de albúmina lavadas fueron suspendidas a aproximadamente el 25% (volumen/volumen) en PVA/PBS y fueron biotiniladas por reacción con hexanoato de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) (sulfo-NHS-LC-biotina; sulfo-NHS-LC-biotina EZ-Link™, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois, EE.UU.) en una concentración de 0,01 a 1,0 mg/ml bajo agitación suave a temperatura ambiental durante al menos una hora. La biotina sin reaccionar fue eliminada mediante diversos lavados centrífugos con PVA/PBS frío y saturado de aire, a 4 °C. Se evaluó el grado de marcación con biotina disolviendo en PVA/PBS que contenía Triton X-100 al 0,1% una parte alícuota de microburbujas suspendidas y determinando las concentraciones de proteína (ensayo de proteínas con BCA, Pierce) y biotina [ensayo con ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)-benzoico]. Las reacciones de biotilación típicas de microburbujas de albúmina producen relaciones molares de biotina a albúmina de 40% a 500%. Se confirmó la disponibilidad de biotina en la superficie de las microburbujas de albúmina observando la asociación espontánea de las microburbujas-biotina con partículas paramagnéticas BioMag de estreptavidina exentas de nucleasas (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, EE.UU.) en suspensión. Las microburbujas de albúmina revestidas con biotina fueron almacenadas bajo refrigeración en PVA/PBS que contenía azida sódica al 0,05%.

Ejemplo 4: Preparación de microburbujas de albúmina revestidas con estreptavidina

Microburbujas de albúmina llenas de aire fueron indirectamente revestidas con estreptavidina (Prozyme, San Leandro, California, EE.UU.) al exponer las microburbujas-biotina a estreptavidina en exceso. Bajo estas condiciones se evita el entrecruzamiento de las microburbujas. También se revistieron directamente microburbujas de albúmina con estreptavidina por medio de un reactivo entrecruzante proteico bifuncional.

Para el revestimiento indirecto, una suspensión de microburbujas de albúmina revestidas con biotina y suspendidas en PVA/PBS fue completa y rápidamente tratada mediante la adición de una disolución de 10 mg/ml de estreptavidina hasta obtener una concentración final de 1 mg/ml, con mezclamiento continuo por formación de remolinos. La estreptavidina sin reaccionar fue eliminada mediante lavados centrífugos repetidos, como se describió anteriormente. La naturaleza tetravalente de la estreptavidina aseguraba que aún se disponía de sitios ligantes de biotina.

Alternativamente, se revistieron directamente microburbujas de albúmina con estreptavidina usando 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (s-SMCC). Se trató estreptavidina, en una concentración de 10 mg/ml en PBS, pH de 7,4, con S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) en un exceso molar de 5 a 10 órdenes de magnitud, durante al menos 1 hora a temperatura ambiental. El SATA sin reaccionar fue separado de la estreptavidina por FPLC usando una resina Sephadex G-25 equilibrada en PBS, y la proteína purificada fue almacenada congelada. Justo antes de su uso, se eliminó el grupo acetilo protector de la estreptavidina modificada mediante un tratamiento con PBS que contenía hidroxilamina 50 mM y EDTA 2,5 mM, pH de 7,5, durante 2 horas a temperatura ambiental. Simultáneamente, una suspensión de microburbujas de albúmina suspendidas en PVA/PBS fue tratada con s-SMCC en una concentración de 0,01 a 1 mg/ml bajo agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiental. Se eliminó inmediatamente el reactivo s-SMCC en exceso mediante un lavado centrífugo (repetido 4 veces) y se combinaron las microburbujas-s-SMCC con la estreptavidina modificada con sulfhidrilo. La estreptavidina se llega a copular covalentemente con la superficie de las microburbujas de albúmina por reacción del grupo funcional maleimida con el grupo sulfhidrilo recién expuesto de la estreptavidina. Se eliminó la estreptavidina en exceso de las microburbujas mediante repetidos lavados centrífugos, se suspendieron las microburbujas en PBS frío y saturado de aire que contenía azida sódica al 0,05% y se almacenó la suspensión bajo refrigeración.

Ejemplo 5: Revestimiento de microburbujas de albúmina con un anticuerpo

Se obtuvo un anticuerpo hacia *E. coli* 0157:H7 de KPL (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), purificado por afinidad, y se biotiniló del modo descrito más adelante. Se disolvió el anticuerpo en PBS, pH de 7,4, y se calentó la disolución a 37 °C durante 30 minutos. La disolución calentada fue tratada con hexanoato de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) (sulfo-NHS-LC-biotina EZ-Link™) en un exceso molar de 8-12 órdenes de magnitud, durante 2 horas a temperatura ambiental. El reactivo de biotina en exceso se eliminó mediante una cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-25, realizándose la elución con PBS. El anticuerpo biotinilado fue concentrado por ultrafiltración usando un dispositivo filtrante Microcon® YM-30 (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) y fue almacenado bajo refrigeración en presencia de azida sódica como conservante. Las microburbujas de albúmina revestidas con avidina fueron resuspendidas mediante una agitación suave y fueron combinadas con un exceso molar de anticuerpo etiquetado con biotina, en PBS. El material en exceso fue separado de las microburbujas insolubles mediante centrifugaciones y resuspensiones repetidas, como se describió anteriormente. Las microburbujas de albúmina revestidas con anticuerpo fueron almacenadas a 4 °C en PVA/PBS que contenía azida sódica.

Ejemplo 6: Captura de células bacterianas sobre microburbujas revestidas con anticuerpo

Se obtuvo *E. coli* 0157:H7 del American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, EE.UU.) y se propagó en medios de líquido Luria Bertani (LB) y agar a 37 °C. Las bacterias desarrolladas en medios líquidos fueron sucesivamente diluidas en PVA/PBS o PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, *bovine serum albumin*) al 0,2% (BSA/PBS), estériles y fríos, hasta una densidad de aproximadamente 5000 células/ml. Se añadió la décima parte del volumen de la suspensión de microburbujas a la suspensión celular y se agitó suavemente durante varios minutos a temperatura ambiental. Se dejó que las microburbujas flotaran en la superficie de la mezcla por flotabilidad natural durante 10 minutos. Se tomaron diez microlitros de la fase líquida subyacente, evacuada de las microburbujas flotantes, mediante una micropipeta, se sembraron en una placa de LB agar formando rayas y se incubó durante la noche a 37 °C. Las muestras testigo positivo de la suspensión bacteriana produjeron aproximadamente 50 colonias/placa. La suspensión bacteriana tratada con microburbujas revestidas con anticuerpo estaba desprovista de células formadoras de colonias. Se pudieron recuperar las células bacterianas de las microburbujas agitando suavemente la suspensión de microburbujas y sembrando 10 µl de la suspensión en placas, según resultó evidenciado por las colonias formadas en las placas de LB resultantes después de una incubación durante la noche. Este resultado indica que las células bacterianas son capturadas por las microburbujas de albúmina revestidas con anticuerpo. Las suspensiones bacterianas tratadas con microburbujas de albúmina no revestidas o revestidas con estreptavidina no consiguieron eliminar células de la suspensión.

Ejemplo 7: Preparación de microburbujas modificando primero la albúmina y sonicando luego

Se halló que las microburbujas de albúmina preparadas a partir de albúmina sérica biotinilada al marcar la albúmina sérica con biotina antes de la formación de las microburbujas se unían a avidina y/o estreptavidina. Se disolvió

albúmina sérica bovina (BSA; Bovuminar, Fracción V de Cohn, Intergen, Purchase, New York, EE.UU.) en disolución salina normal que contenía caprilato sódico 4 mM y triptofanato sódico 4 mM hasta 50 mg/ml, y la disolución se esterilizó por filtración y se guardó en un recipiente de vidrio claro bajo iluminación fluorescente a temperatura ambiental durante dos semanas. Este tratamiento fotooxidaba los grupos sulfhidrilo libres que podían interferir en la formación de las microburbujas. Se tomaron veinte mililitros de la disolución de BSA y se ajustó su pH a 8,5 con NaOH 1 M. Se añadieron veinticinco microgramos de s-NHS-LC-biotina con mezclamiento y se mantuvo el pH en 8,5 durante 1 hora a temperatura ambiental. La mezcla de reacción fue diluida hasta un contenido de albúmina del 1% mediante la adición de disolución salina normal y fue sometida al proceso de sonicación del modo anteriormente descrito para la albúmina humana no modificada. Las microburbujas de albúmina resultantes fueron lavadas varias veces con BSA al 1% en disolución salina normal para eliminar la biotina no incorporada. Las microburbujas preparadas a partir de albúmina biotinilada fueron reactivas con avidina o estreptavidina y pudieron ser revestidas con avidina o estreptavidina del modo anteriormente descrito.

MICROBURBUJAS DE VIDRIO

Ejemplo 8 ilustrativo: Preparación de microburbujas de vidrio revestidas con amina

Se suspendieron burbujas de vidrio 3M™ ScotchLite™ S60HS (St. Paul, Minnesota, EE.UU.), que tenían una densidad de aproximadamente 0,6 g/cm³ y un diámetro medio de aproximadamente 30 µm, en agua y se dejaron flotar en la parte superior de la suspensión. La capa líquida fue drenada desde el fondo para eliminar partículas finas y pequeños fragmentos. Esto se llevó convenientemente a cabo en una jeringa desechable de 60 cm³ de capacidad, provista de una válvula obturadora montada en la punta. Se repitió el lavado varias veces. Se proporcionaron restos hidroxilo reactivos superficiales por suspensión en NaOH 0,25 M, durante 24 horas a 60 °C, de las microburbujas lavadas, lo que fue seguido de un lavado con agua para eliminar el álcali. Las microburbujas fueron posteriormente tratadas con HCl 0,05 M durante 1 hora a temperatura ambiental. Se eliminó el ácido por lavado con agua seguida de acetona seca y se secó finalmente el producto en una estufa a 60 °C. Se convirtieron las funciones hidroxilo en grupos amino al suspender en una disolución de 3-aminopropiltriétoxilano (3-APS, Sigma) al 3% en acetona o tolueno secos, durante 30 minutos a temperatura ambiental, las microburbujas de vidrio tratadas y secadas. Se eliminó el silano en exceso mediante varios lavados con acetona y se secaron las microburbujas derivatizadas en una estufa a 60 °C.

En ciertos experimentos, se suspendieron las microburbujas de vidrio en ácido sulfúrico al 70% y peróxido de hidrógeno al 9% durante 16 horas a temperatura ambiental, lo que fue seguido de un lavado exhaustivo con agua. Las microburbujas tratadas con ácido fueron resuspendidas en una disolución de 3-APS:agua:etanol (3:4:92 en volumen) preparada justo antes de su uso. Se dejó que transcurriera la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiental. Se eliminó el reactivo en exceso mediante un lavado en etanol y se cocieron las microburbujas de vidrio a 115 °C durante 1 hora. Las microburbujas fueron lavadas de nuevo en etanol y fueron secadas en una estufa a 60 °C.

Las microburbujas de vidrio revestidas con amina fueron almacenadas secas a temperatura ambiental. Se confirmó la presencia de grupos amina funcionales superficiales en una cantidad de 2,5-3,0/nm² mediante un análisis en que se usaba 4-O-(4,4'-dimetoxitritil)butirato de S-succinimidilo (Pierce).

Ejemplo 9 ilustrativo: Revestimiento de microburbujas de vidrio-amina con un anticuerpo

Microburbujas de vidrio revestidas con amina fueron suspendidas en bicarbonato sódico 50 mM, Tween™ 20 al 0,1%, pH de 8,5, y fueron hechas reaccionar con sulfo-NHS-LC-biotina durante dos horas a temperatura ambiental. El reactivo de biotina estaba presente en un exceso de 0,1 a 7 órdenes de magnitud con respecto a las aminas superficiales disponibles. Las microburbujas de vidrio fueron lavadas y almacenadas en PBS que contenía Tween™ 20 al 0,1% (PBS/Tween™). Se añadió avidina, disuelta en agua en una concentración de 5 mg/ml, en un exceso molar para saturar los sitios de biotina disponibles. Se eliminó la avidina en exceso por lavado con PBS/Tween™ y se almacenaron las microburbujas en PBS que contenía BSA al 0,2% (BSA/PBS) y azida sódica al 0,05%, bajo refrigeración.

También se revistieron microburbujas de vidrio-amina con avidina modificada con sulfhidrilo, por medio del reactivo entrecruzante s-SMCC. Se suspendieron microburbujas de vidrio-amina, 1:10 (peso/volumen), en fosfato sódico 50 mM, pH de 7,5, que contenía dimetilformamida al 10% y 2 mg/ml de s-SMCC durante una hora a temperatura ambiental. Las burbujas de vidrio revestidas con maleimida fueron lavadas con etanol seco al 100%, drenadas, secadas bajo vacío en un vial de vidrio y almacenadas bajo nitrógeno a -20 °C. Se desacetiló avidina, modificada con SATA para que contuviera grupos sulfhidrilo libres (véase el Ejemplo 4 anterior), en una cantidad en exceso con hidroxilamina y se añadió directamente a las microburbujas de vidrio-maleimida secadas, para obtener microburbujas revestidas con avidina. La avidina en exceso fue eliminada por lavado con PBS/Tween™ después de una incubación durante la noche.

Las microburbujas de vidrio (20 mg) revestidas con avidina fueron suspendidas en 1,0 ml de PBS/BSA y fueron combinadas con 10 µg de anticuerpo hacia *E. coli* 0157:H7, modificado para que contuviera 2-6 grupos biotina (véase el Ejemplo 5 anterior). El anticuerpo se fijó rápidamente al revestimiento superficial de avidina en dos horas en un baño de hielo, creándose microburbujas de vidrio revestidas con anticuerpo. Estas microburbujas fueron lavadas y

almacenadas a 4 °C como una suspensión en un tampón acuoso adecuado para mantener la estabilidad del anticuerpo. Se añadieron BSA y azida sódica como estabilizantes.

Ejemplo 10 ilustrativo: Captura de *E. coli* 0157 sobre microburbujas de vidrio revestidas con anticuerpo

5 *E. coli* desarrollado en cultivo fue sucesivamente diluido hasta 5000 células/ml en PBS estéril y frío que contenía BSA y azida sódica. La suspensión bacteriana fue tratada con microburbujas revestidas con anticuerpo al 1% (volumen/peso), con agitación a temperatura ambiental durante varios minutos. Se dejó que las microburbujas flotaran en la superficie, y se tomaron 10 µl de la capa líquida subyacente (evacuada por flotación de las microburbujas) y se sembraron en placas de medios de agar en paralelo con muestras testigo no tratadas de la suspensión bacteriana. Las suspensiones bacterianas tratadas con microburbujas no revestidas no presentaban reducción de las colonias formadas durante la noche a 37 °C. La suspensión bacteriana tratada con microburbujas de vidrio revestidas con anticuerpo presenta una disminución del 50 al 100% en cuanto a unidades formadoras de colonias, que fueron recuperadas por resuspensión y siembra en placas. Este resultado confirmaba la captura de células bacterianas sobre microburbujas de vidrio revestidas con un anticuerpo específico.

Ejemplo 11 ilustrativo: Revestimiento de microburbujas de vidrio-epoxi con un anticuerpo

15 Se lavaron burbujas de vidrio 3M™ ScotchLite™ H20/1000 y se suspendieron en borato sódico 0,1 M, cloruro sódico 0,15M, pH de 9,0. Se añadió avidina en una concentración de 5 mg/ml y se incubó la suspensión a 4 °C durante 48 horas. Las microburbujas de vidrio revestidas con avidina fueron lavadas en BSA/PBS con azida sódica al 0,05% para eliminar la avidina no unida y fueron almacenadas en la misma disolución. Las microburbujas de vidrio revestidas con anticuerpo hacia *E. coli* 0157:H7, etiquetado con biotina, y fueron utilizadas para separar células bacterianas de una suspensión del modo anteriormente descrito.

Ejemplo 12 ilustrativo: Preparación de microburbujas de vidrio revestidas con cis-diol

25 Se prepararon microburbujas de vidrio con restos hidroxilo activos del modo anteriormente descrito (véase el Ejemplo 6 anterior). Las microburbujas de vidrio secadas fueron silanizadas por tratamiento con acetona seca que contenía 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano al 6% (volumen/volumen), durante 3 horas a temperatura ambiental. El reactivo de silano en exceso fue eliminado por lavado con acetona, lo que fue seguido de suspensión en HCl 0,05 M durante 2 horas a 60° para convertir la función epoxi en funciones cis-diol. Se eliminó el ácido por lavado en acetona y se secaron las microburbujas durante la noche a 37 °C. Las microburbujas de vidrio con cis-diol fueron almacenadas secas a temperatura ambiental.

30 Una suspensión al 25% de microburbujas de vidrio revestidas con cis-diol fue activada con carbonildiimidazol (CDI) 0,3 M en acetona seca durante 1 hora a temperatura ambiental en un recipiente sellado, con ventilación cada 10 minutos. Se eliminó el reactivo en exceso por lavado con acetona seca y se secaron las microburbujas de vidrio bajo vacío a temperatura ambiental. Las microburbujas activadas fueron almacenadas secas bajo nitrógeno a 4 °C.

35 Las microburbujas de vidrio activadas por CDI fueron revestidas mediante una incubación durante la noche con 4 mg/ml de avidina disueltos en carbonato sódico 0,1 M, pH de 9,5, a temperatura ambiental. Se redujo el pH a 6,5 mediante la adición de fosfato sódico monobásico 0,2 M. Las microburbujas de vidrio revestidas con avidina fueron lavadas y almacenadas en BSA/PBS que contenía azida sódica.

Se aplicó el anticuerpo hacia *E. coli* 0157:H7, etiquetado con biotina, y se separaron las bacterias de la suspensión del modo previamente descrito. Este experimento proporcionó una reducción de bacterias del 50 -100%, como resultó evidenciado por un número reducido de colonias con respecto a las muestras testigo.

40 En ciertos experimentos, las microburbujas de vidrio revestidas con cis-diol fueron activadas con peryodato sódico 0,2 M durante 90 minutos a temperatura ambiental. El producto fue lavado con agua y luego con etanol y fue dejado secar al aire a temperatura ambiental. Esta química permitió revestir la superficie de las microburbujas de vidrio con funciones aldehído reactivas con amina. Se llevaron a cabo el subsiguiente revestimiento con avidina, seguido del anticuerpo biotinilado, y el ensayo del modo anteriormente descrito, con resultados similares.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento por afinidad o ensayo por afinidad de una especie, que comprende:
- (a) proporcionar, en una disolución, microburbujas de albúmina revestidas con una molécula de afinidad que se une específicamente a una especie;
 - 5 (b) poner las microburbujas, en una disolución, en contacto con la especie que interacciona con la molécula de afinidad que reviste las microburbujas, generándose de este modo microburbujas revestidas con la especie;
 - (c) dejar que las microburbujas revestidas con la especie floten en la parte superior de la disolución, separándose de este modo las microburbujas revestidas con la especie, de la especie libre y la disolución; y
 - 10 (d) destruir las microburbujas tratando con un detergente o agente tensioactivo las microburbujas revestidas con la especie.
2. El método de la Reivindicación 1, en que la destrucción de las microburbujas genera una disolución que contiene la especie.
3. El método de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en que la molécula de afinidad es seleccionada del grupo
15 que consiste en: un receptor, un ligando y un anticuerpo, o en que la molécula de afinidad es biotina, o en que la molécula de afinidad es avidina o estreptavidina.
4. El método de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, en que la especie es un receptor, un ligando o un antígeno, o en que la especie es un analito, o en que la especie es un virus o una célula o un subcomponente de la misma.
- 20 5. El método de cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 2, que comprende además centrifugar las microburbujas y la disolución, por lo que la especie sedimenta bajo la fuerza de la gravedad, potenciándose de este modo la separación de las microburbujas revestidas con la especie, de la especie libre y la disolución.
6. El método de la Reivindicación 1 ó 2, en que la especie está modificada con biotina, avidina o estreptavidina.
7. El método de la Reivindicación 1, en que la destrucción de las microburbujas permite el aislamiento de la especie
25 diana desprovista de las microburbujas de captura.
8. El método de la Reivindicación 1, en que la albúmina es seleccionada entre albúmina sérica humana (HSA) y albúmina sérica bovina (BSA).