

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 563**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09727083 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2277048**

54 Título: **Procedimiento para detectar una sustancia química**

30 Prioridad:

02.04.2008 GB 0805951

02.04.2008 US 41830 P

16.09.2008 GB 0816926

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

02.07.2013

73 Titular/es:

**VIVACTA LIMITED (100.0%)
100 Guillat Avenue Kent Science Park
Sittingbourne
Kent ME9 8GU, GB**

72 Inventor/es:

**CARTER, TIMOTHY JOSEPH NICHOLAS y
ROSS, STEVEN ANDREW**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 410 563 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 detectar una sustancia química

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una sustancia química y, en particular, a un inmunoensayo que emplea un dispositivo de detección química que contiene un transductor.

5 Un inmunoensayo es un ensayo que mide la presencia o más normalmente la concentración de un analito en un fluido biológico. Típicamente, implica la unión específica de un antígeno a un anticuerpo. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, teniendo los anticuerpos monoclonales diferentes ventajas, que incluyen reproducibilidad de fabricación y contención de una unión a un epítipo de un analito. Con el fin de proporcionar una medición cuantificable de la concentración del analito, se compara la respuesta con muestras patrón de concentración conocida. Se puede determinar la concentración del anticuerpo o antígeno por medio de una variedad de procedimientos, aunque uno de los más comunes es marcar bien el antígeno o bien el anticuerpo y detectar la presencia del marcador.

10 Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo, el antígeno de la muestra desconocida compite con el antígeno marcado (el "indicador") para unirse a los anticuerpos, que están típicamente inmovilizados sobre una fase sólida. Posteriormente, se mide la cantidad de antígeno marcado unido al sitio del anticuerpo, normalmente por medio de separación y medición del antígeno marcado unido a la fase sólida. Claramente, la respuesta será inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra desconocida. En un principio de ensayo análogo, el anticuerpo marcado de la solución compite con el antígeno inmovilizado sobre la fase sólida y que se encuentra presente en la muestra, dando lugar a una proporcionalidad inversa similar. En un inmunoensayo no competitivo, también denominado como ensayo inmunométrico, el antígeno de la muestra desconocida se une a un exceso de anticuerpos inmovilizados (los anticuerpos de "captura") y se mide la cantidad de antígeno unido. A diferencia del procedimiento competitivo, los resultados del procedimiento no competitivo serán directamente proporcionales a la concentración de antígeno. En el denominado ensayo "inmunométrico", también denominado "ensayo de sándwich", el antígeno se une al sitio de anticuerpo de captura, y posteriormente se introduce el antígeno marcado que se une al antígeno unido al anticuerpo de captura. Posteriormente, se mide la cantidad de anticuerpo marcado en el sitio.

15 En un inmunoensayo de sándwich típico, se une un anticuerpo específico para un antígeno de interés a un soporte polimérico tal como una lámina de poliestireno. Se coloca una gota de la muestra objeto de ensayo, por ejemplo un extracto celular o una muestra de suero u orina, sobre la lámina, que se lava tras la formación del complejo anticuerpo-antígeno. Posteriormente, se añade un anticuerpo específico para un sitio diferente del antígeno, y se lava de nuevo el soporte. Este segundo anticuerpo transporta un marcador (el indicador marcado) de manera que se pueda detectar con elevada sensibilidad. La cantidad del segundo anticuerpo unido a la lámina es proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra. Este ensayo y otras variaciones de este tipo de ensayo resultan bien conocidos, véase, por ejemplo, "The Immunoassay Handbook, 2nd Ed.", David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001.

20 Los inmunoensayos de este tipo funcionan particularmente bien para analitos de masa molecular grande, principalmente porque se puede abordar dos o más epítipos; las áreas de complementariedad entre analito y anticuerpo son relativamente grandes y tienen lugar diferencias relativamente grandes entre analitos, por ejemplo, por medio de al menos un amino ácido de los péptidos. Con inmunoensayo de molécula pequeña (en ocasiones denominada "hapteno", que es una molécula pequeña que, cuando se une a un vehículo grande tal como una proteína, puede inducir una respuesta inmunológica), la ausencia de dos epítipos prohíbe la formación de un "sándwich". Esto ha servido de motivación para el desarrollo de técnicas adicionales.

25 Una técnica de inmunoensayo relativamente nueva es el denominado ensayo "inmunométrico de anticuerpo selectivo" que está diseñado para mejorar la especificidad y la sensibilidad de la detección de moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, N. Kobayashi y J. Goto, en *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. 36, Ed. H.E. Spiegel y col., Academic Press, 2001, páginas 139-170 y en particular en la sección 3,3 en las páginas 155-158). El inmunoensayo también tiene la desventaja de que proporciona una relación directa entre la concentración del analito y la señal, en lugar de la relación inversa comúnmente observada en los inmunoensayos competitivos.

30 El protocolo está basado en el enmascaramiento de los sitios del anticuerpo ocupados con una molécula marcada con hapteno múltiple para permitir la determinación selectiva posterior de anticuerpos ocupados con hapteno. En primer lugar, los anticuerpos anti-hapteno se inmovilizan sobre (se unen a) un soporte sólido. A continuación, se expone el soporte a una muestra que contiene el analito desconocido (hapteno) y una macromolécula múltiple conjugada al hapteno. El analito y la macromolécula compiten posteriormente por los sitios de unión de los anticuerpos anti-hapteno sobre el soporte sólido. Se puede introducir el analito antes que la macromolécula, o se pueden introducir simultáneamente y se dejan competir por la superficie o, en el caso en el que la macromolécula se una reversiblemente a la superficie, se puede introducir la macromolécula antes que el analito. Posteriormente, se une un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se une a los anticuerpos primarios que no están unidos a la macromolécula. Debido a que la proporción de anticuerpo primario que no está unido a la macromolécula es directamente proporcional a la cantidad de analito, el ensayo proporciona una determinación de la cantidad de analito presente en la muestra.

Se ha observado que esto es muy sensible y específico pero, tal y como se practica actualmente, requiere un número de etapas de incubación y lavado, para eliminar de la manera más importante el exceso de marcaje no unido antes de la determinación de la cantidad de anticuerpo marcado presente. Esto añade complejidad significativamente al ensayo y limita sustancialmente la aplicabilidad de la técnica.

5 El documento WO 2004/090512 desvela un dispositivo para detectar la energía generada por la desintegración no radiativa generada por una sustancia tras la irradiación con radiación electromagnética. Wu y col., Clinica Chimica Acta, 2006, 369, 119-124 desvela el pasado seleccionado y el futuro del desarrollo de inmunoensayos y aplicaciones en química clínica. N. Kubayashi y J. Goto, Academic Press, 2001, 139-170 desvela inmunoensayos no competitivos para moléculas pequeñas con elevada sensibilidad y especificidad.

10 Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

Un procedimiento para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

- 15 (i) proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica, y un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, en el que el primer reactivo tiene un sitio de unión que es capaz de unirse a un segundo reactivo en presencia del analito;
- 20 (ii) introducir el segundo reactivo, presentando el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo en presencia del analito y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber la radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa y que está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones, en el que bien el primer o bien el segundo reactivo son capaces de unirse al analito,
- 25 (iii) exponer la muestra al transductor permitiendo de este modo que el analito se una bien al primer o bien al segundo reactivo;
- (iv) introducir un reactivo de enmascaramiento que sea capaz de unirse al mismo primer o segundo reactivo como el analito, evitando de este modo la unión del primer reactivo al segundo reactivo;
- 30 (v) irradiar la muestra con radiación electromagnética;
- (vi) transformar la energía generada en una señal eléctrica, y
- (vii) detectar la señal eléctrica, en el que las etapas (ii) a (iv) pueden ocurrir en cualquier orden.

De este modo, el segundo reactivo marcado (el indicador) se puede unir únicamente al primer reactivo (inmovilizado) en presencia del analito y no en presencia del reactivo de enmascaramiento, permitiendo que el analito compita con el reactivo de enmascaramiento para unirse al primer o al segundo reactivo. Como resultado del uso del transductor que tiene una película piezo/piroeléctrica, se consigue la ventaja de ser capaz de detectar la unión del segundo reactivo en tiempo real sin las etapas de separación y lavado.

La presente invención también proporciona un kit que comprende (i) un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica; un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al segundo reactivo en presencia del analito; (ii) un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo en presencia del analito y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa y que está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones, y (iii) un reactivo de enmascaramiento que es capaz de unirse al mismo primer o segundo reactivo que el analito, evitando de este modo la unión del primer reactivo al segundo reactivo.

A continuación, se describe la presente invención con referencia a los dibujos, en los cuales:

- 50 La Figura 1 muestra un dispositivo de acuerdo con WO 2004/090612;
- La Figura 2 muestra una representación esquemática del procedimiento de la presente invención;
- La Figura 3 muestra un dispositivo para su uso en un kit de acuerdo con la presente invención, y
- La Figura 4 muestra un gráfico de recuentos frente a tiempo, que usa el procedimiento de la presente invención.

55 El procedimiento de la presente invención proporciona la detección de un analito en una muestra. Como primera etapa, el procedimiento incluye la provisión de un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica y exponer la muestra al transductor. Dichos transductores son conocidos en la materia, véase por ejemplo, el documento WO 90/13017 y el documento WO 2004/090512.

A este respecto, la Figura 1 muestra el principio del dispositivo 1 de detección química apropiado para su uso en la presente invención. El dispositivo 1 está basado en la generación de calor de la sustancia 2 tras irradiación de la sustancia 2 con radiación electromagnética. El dispositivo 1 comprende un transductor 3 piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene revestimientos de electrodo 4, 5. Preferentemente, el transductor 3 es una película, por ejemplo, una película protectora de poli(fluoruro de vinilideno). Preferentemente, los revestimientos de electrodo 4, 5, están formados a partir de un óxido de estaño e indio que tiene un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque casi cualquier espesor es posible a partir de un límite inferior de 1 nm por debajo del cual la conductividad eléctrica es demasiado baja y un límite superior de 100 nm por encima del cual la transmisión óptica es demasiado baja (no debería ser menor de un 95% de T). Por medio del uso de cualquier técnica, se mantiene una sustancia 2 sobre o en las proximidades del transductor 3, mostrado aquí unido al revestimiento 4 de electrodo superior. El reactivo puede ser cualquier forma apropiada y se puede depositar una pluralidad de reactivos. Preferentemente, la sustancia 2 se adsorbe sobre el electrodo superior, por ejemplo, acoplada covalentemente o unida por medio de fuerzas intermoleculares tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals. Una característica clave del presente dispositivo es que la sustancia 2 genera calor cuando se irradia con una fuente de radiación electromagnética 6, tal como luz, preferentemente luz visible. La fuente de luz puede ser, por ejemplo, un LED.

La fuente de luz 6 ilumina la sustancia 2 con luz de longitud de onda apropiada (por ejemplo, un color complementario). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que la sustancia 2 absorbe la luz para generar un estado excitado que posteriormente experimenta una desintegración radiativa, generando energía, indicada por medio de las líneas curvas de la Figura 1. Esta energía está principalmente en forma de calor (es decir, movimiento térmico en el medio ambiente) aunque también se pueden generar otras formas de energía, por ejemplo, ondas de choque.

No obstante, se detecta esta energía por medio del transductor y se convierte en una señal eléctrica. Se calibra el dispositivo de la presente invención para el reactivo particular objeto de medición y además no es necesario determinar la forma precisa de la energía generada por medio de la desintegración radiativa. A menos que se especifique lo contrario, el término "calor" se usa en la presente memoria de manera que signifique la energía generada por medio de la desintegración radiativa. Se coloca la fuente de luz 6 para iluminar la sustancia 2. Preferentemente, se coloca la fuente de luz 6 sustancialmente perpendicular al transductor 3 y los electrodos 4, 5, y se ilumina la sustancia 2 a través del transductor 3 y los electrodos 4, 5. La fuente de luz puede ser una fuente de luz interna en el interior del transductor en el cual la fuente de luz es un sistema de ondas guiadas. La guía de ondas puede ser el propio transductor o la guía de ondas puede ser una capa adicional unida al transductor. La longitud de onda de la iluminación depende del marcador usado; por ejemplo, para marcadores de oro de 40 nm la longitud de onda preferida es 525 nm y para marcadores de carbono la longitud de onda preferida es de 650 nm.

Se detecta la energía generada por la sustancia 2 por medio del transductor 3 y se convierte en una señal eléctrica. Se detecta la señal eléctrica por medio de un detector 7. La fuente de luz 6 y el detector 7 están ambos bajo el control del controlador 8.

En una realización, la fuente de luz 6 genera una serie de pulsos de luz (el término "luz" usado en la presente memoria significa cualquier forma de radiación electromagnética a menos que se mencione una longitud de onda específica) que es denominada "luz de destellos". En principio, un destello de luz individual, es decir, un pulso de radiación electromagnética, sería suficiente para generar una señal en el transductor 3. No obstante, con el fin de obtener una señal reproducible, se usa una pluralidad de destellos de luz que, en la práctica, requiere luz de destellos. La frecuencia a la cual se aplican los pulsos de radiación electromagnética puede variar. En el límite inferior, el retardo temporal entre los pulsos debe ser suficiente para el retardo temporal entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica objeto de determinación. En el límite superior, el retardo temporal entre cada pulso no debe ser tan grande como para que el período transcurrido de registro de datos se amplíe irracionalmente. Preferentemente, la frecuencia del pulso es de 2-50 Hz, más preferentemente de 5-15 Hz y del modo más preferido de 10 Hz. Esto se corresponde con un retardo temporal entre pulsos de 20-500 ms, 66-200 ms y 100 ms, respectivamente. Además, la denominada relación "marca-espacio", es decir, la relación de señal activada con respecto a señal desactivada es preferentemente uno aunque se pueden usar otros valores como ventaja en determinadas situaciones. Las fuentes de radiación electromagnética que producen luz de destellos con diferentes frecuencias de formación de destellos de luz o diferentes relaciones de marca-espacio resultan conocidas en la materia. El detector 7 determina el retardo temporal (o "retardo de correlación") entre cada pulso de luz a partir de la fuente de luz 6 y la correspondiente señal eléctrica detectada por el detector 7 del transductor 3. El solicitante ha encontrado que el retardo temporal es una función de la distancia, d.

Se puede usar cualquier procedimiento para determinar el retardo temporal entre cada pulso de luz y la correspondiente señal eléctrica que proporcione resultados reproducibles. Preferentemente, se mide el retardo temporal desde el comienzo de cada pulso de luz hasta el momento en el que se detecte un máximo de la señal eléctrica correspondiente a la absorción de calor por parte del detector 7.

De este modo, se puede separar la sustancia 2 de la superficie del transductor y todavía se puede detectar la señal. Además, no solo se puede detectar la señal a través de un medio de intervención capaz de transmitir energía al transductor 3, sino que se pueden distinguir distancias diferentes, d, (esto se ha denominado "formación de perfil de profundidad") y que la intensidad de la señal recibida sea proporcional a la concentración de sustancia 2 en la

distancia particular, d, desde la superficie del transductor 3.

La Figura 2 muestra la incorporación del dispositivo 1 de la Fig. 1 en un ensayo inmunométrico de anticuerpo selectivo de acuerdo con la presente invención. El transductor 3 se muestra en una configuración vertical, aunque son posibles otras orientaciones e incluso resultan ventajosas en otras circunstancias. Se reviste el transductor 3 con un primer reactivo mostrado en la Figura 2 como primer anticuerpo 9 (un anticuerpo de captura inmovilizado). La muestra también contiene un analito 10 y un segundo anticuerpo 11 unido a un marcador 12 (que corresponde a la sustancia 2 de la Figura 1).

El primer anticuerpo 9 ha aumentado frente al analito 10 y se une selectivamente al analito 10 cuando se introduce la muestra. No obstante, también se incorpora un reactivo de enmascaramiento 13 a la muestra. En el presente ejemplo, el reactivo de enmascaramiento 13 es capaz de unirse al primer anticuerpo 9. Típicamente, el reactivo de enmascaramiento 13 es una macromolécula 13a que tiene sitios múltiples 13b que son capaces de unirse al primer reactivo 9. Preferentemente, los sitios de unión de la macromolécula son restos que tienen la misma estructura química que el analito.

La macromolécula puede ser cualquier molécula que proporcione el impedimento estérico necesario a la unión del segundo reactivo 11 y que se pueda conjugar de forma múltiple. Ejemplos incluyen polisacáridos, polímeros sintéticos, tales como poliestireno o látex, y polipéptidos, tales como poli(L-lisina). Preferentemente, el peso molecular de la macromolécula es 10 veces el del analito, más preferentemente de 100 a 1000 veces el del analito, por ejemplo, un peso molecular de 5.000 a 500.000 Dalton. Un tipo particular de agente de enmascaramiento que se puede usar es un anticuerpo idiotípico, que reconoce específicamente el sitio de unión del agente de captura sobre la superficie.

La Figura 2 muestra el agente de enmascaramiento 13 unido a un número de los primeros anticuerpos 9 sobre la superficie del transductor 3. No obstante, dos de los anticuerpos 9 se muestran unidos a analito 10. Los anticuerpos 9 unidos al analito 10 son capaces de unirse de manera adicional al segundo anticuerpo 10 unido al marcador 12. El segundo reactivo 11 tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo 9 en presencia del analito 10, pero no en presencia del reactivo de enmascaramiento 13, ya que el reactivo de enmascaramiento 13 bloquea el sitio de unión, principalmente por medio de impedimento estérico.

De manera importante, el procedimiento de la presente invención permite la detección de la unión del segundo anticuerpo 11 al primer reactivo 9 en tiempo real, sin etapas de separación y de lavado. Esto es una ventaja importante en la materia. De este modo, en una realización preferida, el ensayo se lleva a cabo sin retirar la muestra del transductor 3 entre las etapas de exposición de la muestra con respecto al transductor 3 e irradiación de la muestra. Además, no se requiere intervención adicional (por ejemplo, para separar el segundo reactivo unido y no unido) durante las etapas (ii) a (iv).

El segundo reactivo que no está unido a la superficie se encuentra libre para difundir fuera de la superficie. Preferentemente, se permite que el segundo reactivo se separe de la superficie únicamente por medio de difusión.

La Figura 2 muestra una realización en la cual el reactivo de enmascaramiento se une al primer reactivo, aunque se incluyen otros ejemplos dentro del alcance de la presente invención. Una característica clave de la presente invención es que se expone el transductor a la muestra en presencia de un reactivo de enmascaramiento y que el agente de enmascaramiento es capaz de unirse bien al primer o bien al segundo reactivo para evitar la unión del primer reactivo al segundo reactivo. El reactivo de enmascaramiento también se debe unir al mismo primer o segundo reactivo que el analito. De este modo, si el primer reactivo es capaz de unirse al analito, el primer reactivo también se unirá al reactivo de enmascaramiento, y el segundo reactivo no se unirá al analito o al agente de enmascaramiento. Lo mismo aplica al segundo reactivo, por analogía. Evitando esta unión y compitiendo con el analito, el reactivo de enmascaramiento es capaz de provocar que la cantidad de segundo reactivo que se une al primer reactivo sea proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

A este respecto, el agente de enmascaramiento se puede unir de manera que se pueda desprender al primer o al segundo reactivo antes de la exposición del transductor a la muestra (se preincuba el primer o el segundo reactivo con el reactivo de enmascaramiento), o se puede introducir el reactivo de enmascaramiento en sustancialmente el mismo instante que la muestra.

Cuando se une el reactivo de enmascaramiento al primer o segundo reactivo antes de la exposición del transductor a la muestra, se debe unir de manera que se pueda desprender con el fin de permitir que el analito se una al primer o segundo reactivo. La expresión unión que se puede desprender significa que el reactivo de enmascaramiento es capaz de unirse al primer o al segundo reactivo, pero que el agente de enmascaramiento es desplazado por medio de la unión del analito a dicho primer o segundo reactivo. Cuando se introduce el reactivo de enmascaramiento en sustancialmente el mismo instante que la muestra, la unión puede ser apta para desprendimiento, pero esto no resulta esencial ya que el agente de enmascaramiento todavía puede competir con el analito en cuanto a la unión al primer o al segundo reactivo. Cuando la unión es apta para desprendimiento, preferentemente el agente de enmascaramiento se une reversiblemente al primer o al segundo reactivo, es decir, existe un equilibrio entre los estados unido y no unido.

Aunque el primer y el segundo reactivos están ejemplificados en la Figura 2 por medio de un primer y un segundo anticuerpo, la presente invención no se encuentra limitada a ellos. De este modo, aunque el primer y segundo reactivos son preferentemente anticuerpos, también se pueden usar otros reactivos, tales como ácidos nucleicos. En otra realización preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo un ensayo inmunométrico de anticuerpo selectivo para detectar un analito (en ocasiones referido como un "hapteno", que es una molécula pequeña que, cuando se encuentra unida a un vehículo grande tal como una proteína, puede exhibir una respuesta inmunológica) en una muestra, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica y un primer anticuerpo inmovilizado sobre el transductor, en el que el primer anticuerpo es capaz de unirse a un segundo anticuerpo en presencia del analito; (ii) introducir el segundo anticuerpo que es capaz de unirse al primer anticuerpo en presencia del analito y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa y que está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones, en el que bien el primer o bien el segundo anticuerpo es capaz de unirse al analito; (iii) exponer la muestra al transductor permitiendo de este modo que el analito se una bien al primer o al segundo anticuerpo; (iv) introducir un reactivo de enmascaramiento que sea capaz de unirse al mismo primer o segundo anticuerpo; (v) irradiar la muestra con radiación electromagnética; (vi) transformar la energía generada en una señal eléctrica; y (vii) detectar la señal eléctrica, en la que las etapas (ii) a (iv) pueden ocurrir en cualquier orden. Preferentemente, el enlace es reversible.

El primer reactivo 9 se muestra en la Figura 2 unido a la superficie del transductor 3 y preferentemente se adsorbe sobre el transductor. La superficie también puede estar cubierta por revestimientos adicionales para estabilizar la superficie, por ejemplo, Stabilcoat de SurModics Inc., Eden Prairie, MN, EE.UU.

Como se ha comentado en referencia a la Figura 2, el segundo reactivo 11 tiene un marcador 12 unido al mismo. El marcador 12 es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por medio de la fuente de radiación con el fin de generar energía por medio de desintegración no radiativa. De este modo, para detectar la presencia del marcador 12 en posición proximal con respecto al transductor 3, se irradia la muestra con una serie de pulsos de radiación electromagnética. El transductor 3 transforma la energía generada en una señal eléctrica y se detecta la señal eléctrica por medio del detector 7.

El marcador 12 es capaz de interactuar con la radiación electromagnética generada por medio de la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa. El marcador está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada (por ejemplo, un látex coloreado), una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica (por ejemplo, oro), una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones.

En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es una radiación de radio frecuencia. Todos los otros marcadores mencionados anteriormente emplean luz, que puede incluir radiación IR o UV. Preferentemente, el marcador es una partícula de oro o una partícula de carbono. Las partículas de carbono presentan ventajas ya que absorben de manera esencialmente uniforme en todas las longitudes de onda de interés y son mucho menos densas que la mayoría de las partículas metálicas minimizando su sedimentación durante el ensayo. Las partículas de oro se encuentran disponibles comercialmente o se pueden preparar usando procedimientos conocidos (véase por ejemplo G. Frens, *Nature*, 241, 20-22 (1973)). Para una explicación más detallada del marcador de nanopartícula, véase el documento de EE.UU. 6.344.272 y el documento WO 2007/141581.

Preferentemente, la presente invención usa una partícula que tiene un tamaño de partícula de 20 a 1.000 nm, más preferentemente de 100 a 500 nm. Por tamaño de partícula se entiende el diámetro de la partícula en su punto más amplio.

El marcador 12 se encuentra en posición proximal con respecto al transductor cuando ya ha tenido lugar el episodio de unión. Es decir, el marcador se encuentra suficientemente cerca de la superficie del transductor como para que el transductor sea capaz de detectar la energía generada por el marcador tras la irradiación de la muestra. La distancia actual entre el marcador y la superficie del transductor dependerá, no obstante, de un número de variables, tales como el tamaño y naturaleza del marcador, el tamaño y naturaleza del primer y segundo anticuerpos y del analito, la naturaleza del medio de la muestra, y la naturaleza de la radiación electromagnética y del correspondiente ajuste del detector. Con respecto a la naturaleza de la radiación electromagnética, el dispositivo de la presente invención puede incluir una fuente de radiación que se adapte para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector se adapta para determinar el retardo temporal entre cada pulso de radiación electromagnética procedente de la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica, permitiendo de este modo una determinación precisa de la posición del marcador con respecto al transductor, como se ha comentado con referencia a la Figura 1.

Se espera que la muestra desconocida contenga el analito, pero por supuesto se puede usar el ensayo de la presente invención para determinar la presencia o ausencia del analito. Preferentemente, el analito es una molécula pequeña en la medida en que el ensayo se adapta idealmente a dicha molécula, aunque la presente invención no se encuentra limitada a la misma. La expresión "molécula pequeña" que se usa en la presente memoria es una expresión de la materia y se usa para distinguir la molécula de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Con frecuencia, una molécula pequeña es denominada en el campo de los inmunoensayos como "hapteno", que es una molécula pequeña, que cuando se encuentra unida a un vehículo grande tal como una proteína puede exhibir un respuesta inmunológica e incluye moléculas tales como hormonas y fármacos sintéticos. Típicamente, una molécula pequeña de este tipo tiene un peso molecular de 2.000 o menos, con frecuencia de 1.000 o menos e incluso de 500 o menos. El primer reactivo se puede adaptar para unirse al propio analito, aunque el analito puede experimentar una reacción química o un episodio inicial de formación de complejo antes de unirse al primer reactivo. Por ejemplo, el analito podría protonarse/desprotonarse en el pH de las condiciones del ensayo.

La muestra que puede contener o no el analito de interés será generalmente una muestra de fluido y normalmente una muestra biológica, tal como un fluido corporal (además acuoso), por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero u orina. La muestra puede contener partículas suspendidas y puede incluso ser sangre. Una ventaja del procedimiento de la presente invención es que el ensayo se puede llevar a cabo con una muestra que no contenga partículas suspendidas sin que ello suponga una influencia negativa sobre los resultados del ensayo. Típicamente, la muestra estará en el orden de microlitros (por ejemplo, 1-100 μ l, preferentemente 1-10 μ l). Con el fin de albergar una muestra de fluido, preferentemente el transductor se ubica en una cámara de muestra y más preferentemente en un pocillo. En una realización preferida, el transductor se encuentra integrado con la cámara, es decir, forma una de las paredes que definen la cámara. La muestra puede simplemente quedar retenida por medio de las fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro de un conducto capilar.

La presente invención también proporciona un kit para llevar a cabo el ensayo descrito en la presente memoria. El kit comprende un dispositivo para detectar un analito en una muestra como se describe sustancialmente con referencia a la Figura 1. El dispositivo comprende un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica, un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al reactivo de enmascaramiento de analito, bien añadido a la muestra que contiene el analito o unido de manera que se pueda desprender al primer reactivo antes de la adición de la muestra, una fuente de radiación electromagnética y un detector para detectar la señal eléctrica. El kit además comprende el segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo en presencia del analito pero no en presencia del agente de enmascaramiento. El segundo reactivo se puede secar sobre una de las superficies interiores de la cámara antes de ser usado, de manera que se libere cuando se introduce la muestra. En una realización preferida, el dispositivo consiste esencialmente en las características anteriormente descritas. Por "esencialmente" se entiende que no se requieren otras características para llevar a cabo el ensayo.

El dispositivo puede adoptar la forma de un lector portátil manual y un dispositivo desechable que contiene el transductor. Se recoge la muestra en un sistema esencialmente cerrado, se mezcla con el segundo reactivo y se coloca en un lector que llevaría a cabo la irradiación de la muestra y la detección de la señal eléctrica resultante.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Preparación de biosensores de piezo/piropelícula activos

Se revistió por inmersión una película protectora biomorfa de poli(fluoruro de vinilideno) piezoeléctrica (PVDF), revestida con óxido de estaño e indio usado como dispositivo de detección en el siguiente ejemplo, en una solución de poliestireno (un 1% en tolueno) en un entorno de baja humedad para dar una capa de poliestireno sobre la parte superior del óxido de estaño e indio. Posteriormente se revistió ésta en una solución de poliestireno (200 μ g/ml en PBS - 10 mmol/l de tampón de fosfato, pH 7,5, que contenía 2,7 mmol/l de KCl, 137 mmol/l de NaCl y un 0,05% de Tween) por medio de incubación a temperatura ambiente durante la noche. Se preparó poliestreptavidina como se ha descrito por parte de Tischer y col (documento de EE.UU. 5.061.640).

Para preparar una superficie de "captura" se incubó la superficie de poliestreptavidina con anti-testosterona marcada con biotina (M1), proporcionando una superficie revestida de anticuerpo (C1). Se incubaron 10 μ g/ml de anti-testosterona marcada con biotina (Hytest Ltd, Turku, Finlandia, Cat. N°. 2T2-biotin, o Accurate Chemical Co. Wesbury, Nueva York, EE.UU., Cat. N°. BHS113) en PBS a temperatura ambiente durante la noche y posteriormente se lavaron con PBS en exceso y se revistieron con Stabilcoat (SurModics Inc., Eden Prairie, MN, EE.UU.) antes de secar a 40 °C.

Se sometieron los anticuerpos a marcaje con biotina por medio de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se preparó una solución de anticuerpo de 5 mg/ml en PBS disolviendo un anticuerpo liofilizado, o por medido de dilución. Si esta solución contiene otras proteínas o Tris u otros agentes interferentes, se purifica por medio de diálisis o filtración de gel. Posteriormente, se prepara una solución de NHS-biotina a 20 mmol/l

5 en DMSO anhidro y se añaden 15 µl de la solución de NHS-biotina al anticuerpo (1 ml). Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se somete a diálisis el anticuerpo frente a PBS que contiene una azida de sodio (un 0,01%). Se puede diluir el anticuerpo marcado con biotina hasta 1 mg/ml con azida de sodio de un 1% y 20% de glicerol para almacenamiento a -20 °C o +4 °C. El grado de marcaje con biotina debería estar dentro del intervalo de 1-3 biotinas por cada IgG. Esto se puede estimar por medio de la cuantificación de las biotinas o para tasas elevadas de marcaje con biotina, por medio de la cuantificación de las aminas.

Ejemplo 2

Preparación de los conjugados de indicador

10 Se prepararon conjugados de indicador marcados con carbono como se ha descrito esencialmente por parte de Van Doom y col (documento de EE.UU. 5.641.689). Para preparar los conjugados de indicador revestidos de anticuerpo (C2), se incubó 1 ml de Special Black-4 RCC concretamente partículas de carbono de 150 nm (Degussa, Essen, Alemania) en un tampón de fosfato de 5 mmol/l, se incubó a pH 6,2 con 200 µg/ml de solución de poliestreptavidina durante la noche a temperatura ambiente con agitación, dando lugar a una superficie revestida con estreptavidina. Se lavó el conjugado de carbono resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión). Posteriormente, se incubaron durante la noche 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales secundarios marcados con biotina (M2), reactivos frente a las especies de anticuerpo usadas como fuente para el anticuerpo de captura de anti-testosterona (M1) en PBS, con 1 ml de esta suspensión de partículas de carbono revestidas de estreptavidina con agitación. Se lavó el conjugado de carbono resultante (C2) (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) 3 veces con tampón de borato de 0,05 mol/l a pH 8,5 y se almacenó en la presente solución tampón en oscuridad a 4 °C. Por motivos de claridad, si el anticuerpo anti-testosterona (M1) fue un anticuerpo de ratón monoclonal, el anticuerpo monoclonal secundario (M2) fue un anticuerpo de cabra cultivado para reaccionar frente al anticuerpo de ratón intacto completo (denominado "anticuerpo anti-ratón de cabra"). Por supuesto, se podrían usar cualesquiera otros pares de especies, tanto mono como policlonales, y serían bien conocidos por los expertos en la materia.

25 Ejemplo 3

Preparación del reactivo de enmascaramiento

30 Para preparar el reactivo de enmascaramiento revestido de antígeno (MR1), se incubó a pH 6,2 1 ml de partículas de látex de poliestireno revestidas con estreptavidina (diámetro nominal 23 nm), Bangs Laboratories P/N PS02N/8192 (Bangs Laboratories Inc., Fishers IN, EE.UU.) en tampón de fosfato de 5 mmol/l, con 30 nmol/l de testosterona 7 α -C6-marcada con biotina, preparada como se ha descrito en Luppá y col. (Clin. Chem. 1997, 43, 2345, a temperatura ambiente durante la noche con agitación. Se lavó 3 veces el conjugado resultante con solución tampón de borato de 0,05 mol/l a pH 8,5 como se ha comentado anteriormente y se almacenó en esta solución tampón en oscuridad a 4 °C.

Ejemplo 4

35 Preparación de película revestida de anticuerpo enmascarado

Para preparar una superficie de piezopelícula enmascarada (C3), se incubó una pieza de piezopelícula revestida de anticuerpo (C1, descrita anteriormente) con un reactivo de enmascaramiento revestido de antígeno (MR1 anterior) en PBS a temperatura ambiente durante la noche y posteriormente se lavó con PBS en exceso y se revistió con Stabilcoat (SurModics Inc., Eden Prairie, MN, EE.UU.) antes del secado a 40 °C.

40 Ejemplo 5

Ensayo - Sensor de piezo/piropelícula revestido de anticuerpo y reactivo de enmascaramiento

45 Como se muestra en la Figura 3, se fabricó un sensor 1 para llevar a cabo el ensayo. Se fabrica el sensor 1 a partir de una pieza de piezopelícula 3 revestida de anticuerpo (C3, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y una pieza de película 14 recubierta de policarbonato transparente. Las películas están espaciadas a una distancia de aproximadamente 500 micrómetros usando un espaciador 15 formado por una pieza de película de poliestireno revestida con un adhesivo sensible a la presión, cortada para formar dos cámaras 16, 17 de tamaño desigual; una cámara 16 de dimensiones aproximadas de 30 x 10 x 0,5 mm para la reacción de ensayo y una segunda cámara 17 más pequeña de dimensiones 10 x 10 x 0,5 mm para una reacción de control. Se lleva a cabo la provisión para permitir las conexiones eléctricas en las superficies de la parte superior e inferior de la piezopelícula con el fin de detectar la carga generada.

50 Se llevan a cabo los ensayos llenando la cámara grande 16 (a través del orificio de llenado 18) con una mezcla de solución Tris de 0,1 mol/l, que contiene MgCl₂ de 0,150 mol/l y una solución de Tween 20 de un 0,075%, que contiene partículas de carbono coloidales de 150 nm (a una concentración final de un 0,0025% de sólidos), revestidas con anticuerpo marcado con biotina (C2, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria), reactivo frente al anticuerpo de captura (M1), y patrones de testosterona en PBS para dar un intervalo de

5 concentración final de 0,1-100 nmol/l. Se llena simultáneamente la cámara de control 17 con una mezcla de reacción idéntica a la de la cámara de ensayo con patrón de testosterona sustituido por PBS. Se sellan los orificios de entrada y salida y se conecta el conjunto de la cámara a un instrumento de ensayo de manera que la piezopelícula 3 se oriente verticalmente sobre la cara lateral de la cámara. Posteriormente, se ilumina la piezopelícula con luz de LED con destellos, secuencialmente con cuatro LED (de longitud de onda de 625 nm), de los cuales tres iluminan áreas diferentes de la superficie de la cámara de ensayo y uno ilumina la superficie piezoeléctrica de la cámara de control. Para cada pulso de LED, se mide un voltaje a través de la piezopelícula usando un amplificador de cierre y análogo al convertidor digital (ADC). Se representa gráficamente la señal de ADC con respecto al tiempo y la Figura 4 muestra la relación de recuentos de ADC/min frente a concentración de testosterona.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:
 - (i) proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica, y un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, en el que el primer reactivo tiene un sitio de unión que es capaz de unirse a un segundo reactivo en presencia del analito;
 - (ii) introducir el segundo reactivo que tiene un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo en presencia del analito y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa y que está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones, en el que el primer o el segundo anticuerpo es capaz de unirse al analito;
 - (iii) exponer la muestra al transductor permitiendo de este modo que el analito se una bien al primer o al segundo reactivo;
 - (iv) introducir un reactivo de enmascaramiento que sea capaz de unirse al mismo primer o segundo reactivo que el analito evitando de este modo la unión del primer reactivo al segundo reactivo;
 - (v) irradiar la muestra con radiación electromagnética;
 - (vi) transformar la energía generada en una señal eléctrica; y
 - (vii) detectar la señal eléctrica, en el que las etapas (ii) a (iv) puede ocurrir en cualquier orden.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer y segundo reactivos son anticuerpos.
3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se introduce el agente de enmascaramiento en sustancialmente el mismo instante que la muestra.
4. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el transductor se encuentra ubicado en una cámara de muestra.
5. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la muestra contiene partículas suspendidas.
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que la muestra es sangre.
7. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que la fuente de radiación está adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector está adaptado para determinar el retardo temporal entre cada pulso de radiación electromagnética de la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica.
8. Un procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el procedimiento se lleva a cabo sin retirar la muestra del transductor entre las etapas de exposición de la muestra al transductor e irradiación de la muestra.
9. Un kit que comprende (i) un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, que es capaz de transformar un cambio de energía en una señal eléctrica; un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al segundo reactivo en presencia del analito; (ii) un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al primer reactivo en presencia del analito y teniendo un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa y que está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones y (iii) un reactivo de enmascaramiento que es capaz de unirse al mismo primer o segundo reactivo que el analito, evitando de este modo la unión del primer reactivo al segundo reactivo.
10. Un kit según la reivindicación 9, en el que el primer y segundo reactivos son anticuerpos.
11. Un kit según las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el dispositivo además comprende una cámara de muestra y el transductor se encuentra ubicado en la cámara de muestra.
12. Un kit según la reivindicación 11, en el que el transductor está integrado con la cámara.
13. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la fuente de radiación está adaptada para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector está adaptado para determinar el retardo temporal entre cada pulso de radiación electromagnética de la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica.

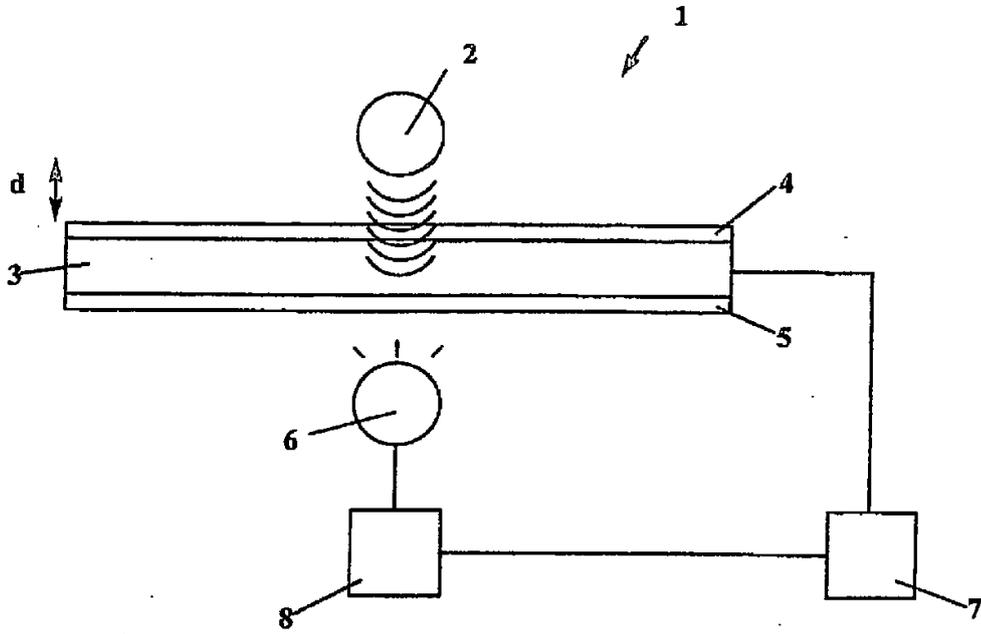


Fig. 1

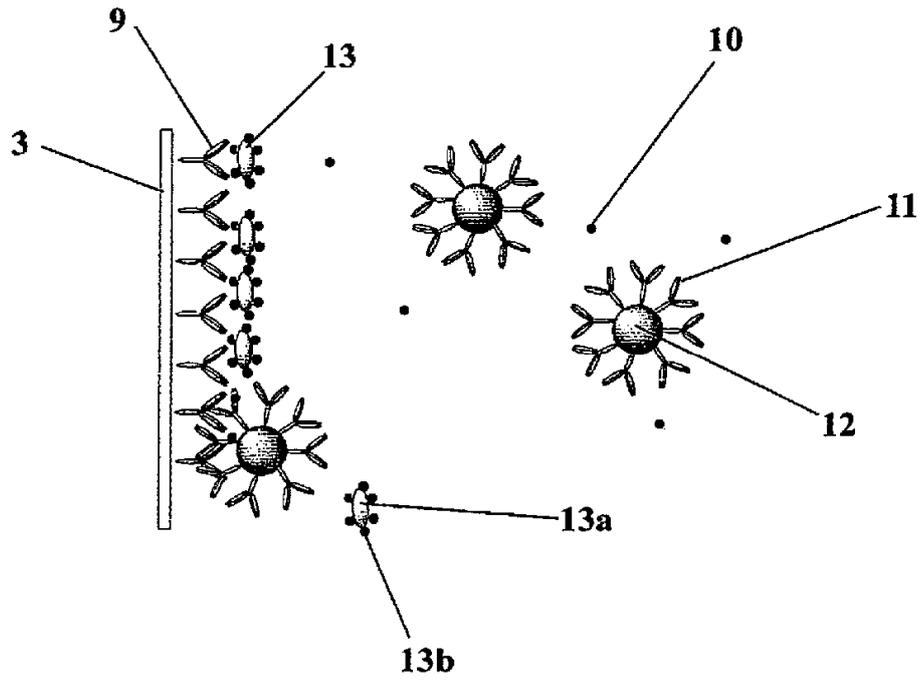


Fig. 2

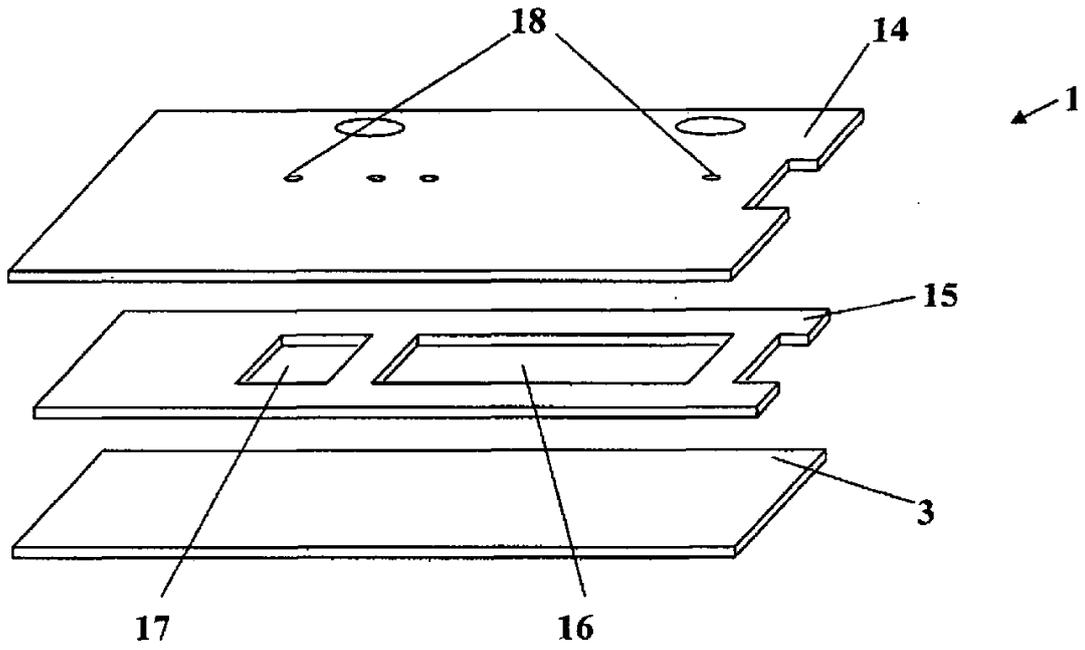


Fig. 3

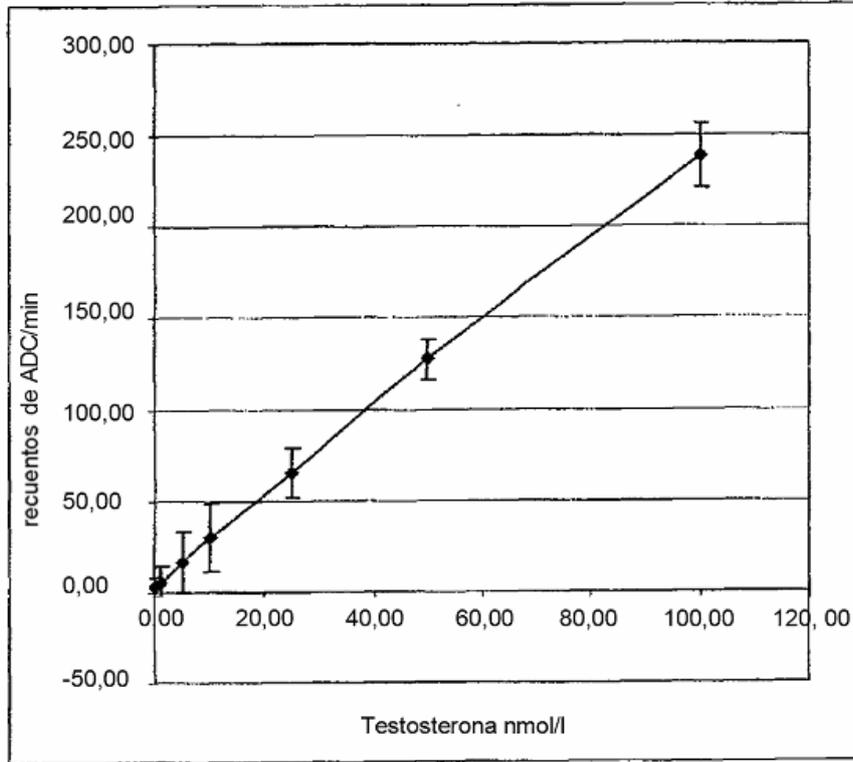


Fig. 4