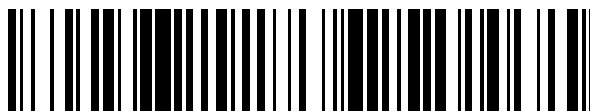


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 754**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10005425 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2390664**

54 Título: **Procedimiento para la detección electroquímica de reacciones de unión**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2013

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**ETTLINGER, JULIA;
GAJOVIC-EICHELMANN, NENAD;
MICHEEL, BURKHARD;
SCHARTE, GUDRUN y
SCHENK, JÖRG**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 410 754 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 la detección electroquímica de reacciones de unión.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección electroquímica directa altamente sensible de reacciones de unión anticuerpo-antígeno y otras interacciones bioquímicas en disolución. El procedimiento es adecuado para inmunoensayos sin lavado y sin separación en diagnóstico, especialmente para inmunoensayos automatizados y microfluidicos. El procedimiento también es adecuado para sistemas de inmunoensayo y tiras reactivas económicas para un solo uso.

10 Los inmunoensayos utilizan la reacción antígeno-anticuerpo para la detección específica de las concentraciones más bajas de un analito en medios complejos tales como la sangre, el suero, la orina o alimentos. En el diagnóstico clínico, la analítica medioambiental y de alimentos, los inmunoensayos son herramientas irrenunciables desde hace décadas para la detección de las concentraciones más bajas de hormonas, metabolitos, proteínas, biomarcadores, toxinas, pesticidas, bacterias patógenas y virus. Muchos de los analitos clínicamente diagnósticos más importantes sólo son económica y rápidamente medibles con inmunoensayos, ya que no hay ningún procedimiento analíticamente químico alternativo que ofrezca una combinación equivalente de alta sensibilidad (detección de concentraciones nanomolares o más bajas) y alta especificidad (detección del analito en presencia de sustancias interferentes similarmente químicamente construidas). Procedimientos alternativos tales como la cromatografía (por ejemplo, HPLC, cromatografías de gases) requieren una preparación de muestras de frecuentemente varias etapas, por ejemplo, mediante extracción y derivatización química.

20 Desde la invención del inmunoensayo hace 50 años por Rosalyn Yalow y Salomon Berson se han desarrollado múltiples modos de realización diferentes que designan distintos formatos de inmunoensayo. La diferencia fundamental de formatos heterogéneos, tales como el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, "enzyme linked immunosorbent assay"), y formatos homogéneos se realiza mediante el estado de agregación del anticuerpo utilizado para la detección: en los ensayos heterogéneos, el anticuerpo (raramente el antígeno) se inmoviliza sobre una superficie (tubo de reacción, placa de microtitulación, tiras reactivas), todas las etapas de reacción tales como etapas de lavado y separación, así como la detección, también se realizan sobre la superficie. En los formatos homogéneos no se inmoviliza ningún componente de unión, no se necesita ninguna etapa de lavado y separación, la detección también se realiza en disolución.

30 Otra posibilidad de diferenciación resulta del procedimiento de detección utilizado. Como la reacción de unión de anticuerpo-antígeno no puede ponerse directamente de manifiesto, uno de los componentes de unión debe acoplarse químicamente a un marcador o "marca" ("label") molecular (excepción: biosensores sensibles a la masa basados en resonancia de plasmones superficiales, acoplador de rejilla, microbalanza de cristal de cuarzo (Quartz-Crystal Microbalance), ondas acústicas de superficie ("Surface acoustic waves") y técnicas similares miden directamente la reacción de unión molecular en tiempo real cuando uno de los componentes de unión está inmovilizado sobre la superficie sensible. Sin embargo, estos procedimientos sólo se utilizan hasta la fecha en aplicaciones de investigación, no en la analítica rutinaria). Una marca ("label") adecuada debe presentar una alta "actividad específica", es decir, por molécula de marca deben producirse en la medida de lo posible muchos eventos de señalización. A las marcas más frecuentemente utilizadas pertenecen isótopos radiactivos (radioinmunoensayo, "RIA"), colorantes fluorescentes (fluoresceína, rodamina, etc.), nanopartículas semiconductoras fluorescentes ("puntos cuánticos" ("Quantum dots")), nanopartículas poliméricas ("perlas de látex" ("Latex beads"), inmunoensayo de aglomeración) y enzimas tales como peroxidasa, junto con un sustrato enzimático colorimétrico, fluorógeno o quimioluminiscente (ELISA). Los isótopos radiactivos poseen la mayor actividad específica, que hace posible incluso la detección de una sola molécula de marca ("label"). Debido al riesgo para la salud que se deriva de la radiactividad, los altos requisitos asociados a la misma en el laboratorio ("laboratorio de isótopos") y los altos costes para la eliminación de residuos, cada vez se sustituyen más los inmunoensayos radiactivos por procedimientos alternativos tales como el ELISA.

45 Otra diferencia entre distintos inmunoensayos resulta del tipo de anticuerpo utilizado. Los anticuerpos son proteínas complejamente construidas con regiones constantes que determinan la estructura y están compuestas similarmente en todas las clases de anticuerpos, y regiones altamente variables que se unen a los sitios de unión a antígeno. Los sueros policlonales originariamente utilizados que contienen múltiples anticuerpos con especificidad y afinidad variable se sustituyen en muchas aplicaciones con anticuerpos monoclonales que sólo contienen exactamente una entidad de anticuerpo ("clon") con especificidad y afinidad perfectamente definidas. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse teóricamente en cantidades discretionales con propiedades idénticas. Además, para muchos análisis también se utilizaron los llamados fragmentos de anticuerpo, que pueden prepararse a partir de anticuerpos completos mediante digestión enzimática. Los anticuerpos monocatenarios son fragmentos de anticuerpos recombinantes que pueden prepararse mediante procedimientos de ingeniería genética. En los formatos de inmunoensayo conocidos pueden utilizarse fundamentalmente todos los tipos de anticuerpos y ligandos moleculares derivados de los mismos.

A los analitos clínicos más conocidos que se detectan con inmunoensayos pertenecen hCG (prueba de embarazo), hormonas tiroideas tales como TSH (enfermedades de la glándula tiroides), hormonas esteroideas (endocrinología, fertilidad) y PSA (biomarcador para carcinoma de próstata).

En resumen, puede decirse que los inmunoensayos basados en anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales figuran entre los procedimientos analítico-químicos más importantes de la biotecnología, diagnóstico clínico, analítica medioambiental y de alimentos, y poseen un alto valor comercial.

En el estado de la técnica se han descrito múltiples procedimientos para realizar un inmunoensayo. La mayoría de los inmunoensayos heterogéneos requieren varias etapas de trabajo manual tales como, por ejemplo, procesos de pipeteado, dilución de muestras, procesos de lavado que deben seguir un protocolo temporal preciso. Por tanto, generalmente se necesita personal experto y un laboratorio especialmente equipado para el mismo para realizar correctamente aquellos ensayos. Los aparatos de detección necesarios ("lector de ELISA", de "ELISA-Reader", lector de placas de microtitulación, analizador de inmunoensayos) son caros y no son portátiles. Así, por ejemplo, en las memorias de patente [patentes US4016043A, US3839153A] se han descrito protocolos para la realización de una prueba de ELISA. El experto aprecia fácilmente que procesos de análisis complejos sólo pueden realizarse por personal experto y sólo en un entorno de laboratorio adecuado. La automatización de aquellos procesos es muy compleja y requiere máquinas automáticas altamente complejas.

Para la utilización *in situ* se ha impuesto el formato de inmunoensayo de flujo lateral heterogéneo (inmunoensayo con "tiras reactivas"). La patente US6156271A describe una moderna variante de este formato de ensayo. Esta prueba transcurre por sí sola después de la adición de la disolución de muestra, y la detección se realiza puramente visualmente (lectura por el usuario de la presencia de una o dos bandas coloreadas sobre la tira reactiva). Es evidente que un procedimiento de lectura de este tipo no puede proporcionar resultados cuantitativos (es decir, mediciones de concentración precisas), sino que sólo son posibles una respuesta sí/no o una respuesta semi-cuantitativa (la concentración se encuentra por debajo/por encima de un valor umbral determinado).

El experto sabe que los inmunoensayos homogéneos son por el contrario especialmente adecuados para realizar inmunoensayos rápidos, cuantitativos y completamente automatizados. En los inmunoensayos homogéneos, la generación de señales se realiza simultáneamente a la reacción de unión. A diferencia de los inmunoensayos heterogéneos anteriormente descritos, los inmunoensayos homogéneos están la mayoría de las veces constituidos por una o pocas operaciones de dosificación, un tiempo de incubación y la etapa de detección. En el caso ideal sólo es necesario la mezcla de la muestra y de una mezcla de reactivos preparada antes de que pueda medirse un valor final (llamadas pruebas de "mezcla y medición", "Mix-and-Measure"). A una mezcla de 1:1, es decir, las mismas proporciones en volumen de muestra y mezcla de reactivos, la dosificación es posible con alta precisión con los medios más sencillos.

Para el experto es fácilmente evidente que un inmunoensayo homogéneo también permite la duración de análisis más corta posible, ya que la medición es posible inmediatamente después de alcanzar el equilibrio de unión entre anticuerpo y antígeno.

Una desventaja de los inmunoensayos homogéneos es que se necesita un mayor coste químico-sintético para acoplar la reacción de unión con la generación de señales.

En la patente US4960693 A se describe la síntesis de un conjugado de anticuerpo-fragmento de enzima 1, de manera que sólo después de la unión del conjugado de antígeno-fragmento de enzima 2 se forma la enzima funcional ("holoenzima"). La síntesis química de aquellos conjugados es estéricamente exigente y no es igualmente de adecuada para todos los tipos de analitos. Además, debido al acoplamiento con la reacción enzimática, se necesita un tiempo de reacción adicional, de manera que no pudo imponerse este principio.

Un enfoque más universal y químicamente más sencillo para analitos de bajo peso molecular es el inmunoensayo de polarización fluorescente tal como se ha descrito, por ejemplo, en la patente EP0200960A. A este respecto se sintetiza un conjugado de analito (aquí: estriol) y un colorante fluorescente, principalmente fluoresceína. La disolución de medición se ilumina con luz de excitación polarizada lineal. La luz fluorescente emitida no está polarizada (despolarizada) mientras que el conjugado está presente libre en disolución. Sólo después de la unión sobre el anticuerpo se limita la velocidad de rotación del conjugado en tanto que la luz fluorescente emitida también esté polarizada. Así puede medirse el equilibrio de unión en tiempo real. La desventaja de este procedimiento es el alto coste en aparatos para la detección, ya que para la detección se necesitan una fuente de luz monocromática polarizada y dos detectores de fluorescencia equipados con filtros de polarización. Por tanto, este principio sólo pudo imponerse en aplicaciones de laboratorio especiales, pero no en el diagnóstico rutinario y en la utilización *in situ*. Además, sólo es adecuado para analitos de bajo peso molecular. Para analitos de proteína se necesita un procedimiento adicional.

Una detección técnicamente más sencilla de analitos de bajo peso molecular se realizó en el procedimiento de Sellrie y col. en el ejemplo de un inmunoensayo de criptato de europio (Abr: EuKr) [patente US2008199972A].

5 Aquí se sintetiza un conjugado de EuKr-fluoresceína, pudiendo estar un ligador lo más corto posible, que está constituido por uno a como máximo tres grupos metileno, entre el EuKr y la fluoresceína. Además del anticuerpo anti-EuKr se utiliza adicionalmente un anticuerpo anti-fluoresceína que después de la unión a fluoresceína apaga su fluorescencia. El principio de generación de señales se basa en que por motivos estéricos el conjugado sólo puede unirse a uno de ambos anticuerpos. El equilibrio de unión y, por tanto, la intensidad de fluorescencia dependen de la concentración de EuKr libre y puede medirse directamente en tiempo real. Una ventaja de estos sistemas es que sólo se necesita un detector de fluorescencia convencional. La desventaja es que también es sólo adecuado para analitos de bajo peso molecular y que la síntesis de conjugados es químicamente exigente.

10 Otro procedimiento de inmunoensayo homogéneo alternativo para analitos de bajo peso molecular, que también se basa en el principio del apagado de la fluorescencia dependiente de la unión, se publicó por Coille y col. y, en forma modificada, por Tan y col. [I. Coille, S. Reder, S. Bucher y G. Gauglitz, *Biomol. Eng* 18 (2002) 273-280 / Chongxiao Tan, Nenad Gajovic-Eichelmann, Walter F.M. Stöcklein, Rainer Polzius, Frank F. Bier, *Analytica Chimica Acta* 658 (2010) 187-192]. Aquí, el analito, tetrahidrocannabinol, se acopla a una proteína, albúmina de suero bovino, que lleva adicionalmente sobre la superficie varias moléculas extintoras de la fluorescencia. El anticuerpo anti-tetrahidrocannabinol está conjugado con una molécula fluorescente. La fluorescencia se apaga cuando el anticuerpo se une al conjugado. Si la muestra de análisis contiene tetrahidrocannabinol libre, el anticuerpo se une a éste, y fluoresce de nuevo. La ventaja de este procedimiento es, al igual que en Sellrie y col., que puede utilizarse el sencillo sistema de medida para la medición de fluorescencia. Aquí también es desventajosa la síntesis químicamente exigente del conjugado de analito-extintor y del conjugado de anticuerpo-fluoróforo.

20 Aunque la técnica de medición de la fluorescencia se utiliza muy frecuentemente en las ciencias biológicas, es una técnica de medición compleja y, por tanto, cara. Detectores económicos y compactos, por ejemplo, para la utilización *in situ*, se implementan más bien con otros procedimientos de detección. Los aparatos de medición técnicamente más sencillos y los más integrados hacen posible procedimientos de detección electroquímica y se han impuesto, por ejemplo, en el sector de los biosensores de usar y tirar para glucosa en comparación con todos los procedimientos de medición óptica. Por tanto, desde hace muchos años se han hecho esfuerzos por realizar inmunoensayos homogéneos basados en un principio de detección electroquímica sencillo.

30 La condición previa para un inmunoensayo homogéneo con detección electroquímica es la disponibilidad de un procedimiento electroanalítico sensible y de una marca ("label")/marcador activo para rédox con alta actividad específica. Los procedimientos amperimétricos y voltamétricos son procedimientos sensibles y adecuados. La actividad específica de la marca ("label")/marcador rédox depende sobre todo de la constante de velocidad de la transferencia electrónica heterogénea con el electrodo y del potencial de detección. Entre los expertos domina una opinión consenso de que es óptimo un potencial de detección en el intervalo de -200 mV a +200 mV (contra electrodo de referencia de plata/cloruro de plata, de ahora en adelante abreviado contra Ag/AgCl) para mediciones en disoluciones biológicas tales como la sangre. La constante de transferencia electrónica es una función de la estructura química de la marca ("label") rédox/marcador, así como del coeficiente de difusión y del material del electrodo utilizado. El experto conoce múltiples mediadores rédox que presentan propiedades electroquímicas favorables y, por tanto, son marcas ("labels")/marcadores fundamentalmente adecuados para un inmunoensayo. Para la utilización en medios biológicos, los mediadores rédox no deben reaccionar con constituyentes de la muestra, deben ser estables y suficientemente solubles en agua en el estado oxidado y reducido. A éstos pertenecen, por ejemplo, moléculas orgánicas tales como hidroquinona/quinona, p-aminofenol, moléculas de sándwich orgánicas/inorgánicas tales como ferroceno y complejos inorgánicos tales como, por ejemplo, hexacianoferrato (II/III) o di-bipiridina de osmio. La solubilidad en agua del ferroceno y di-bipiridina de osmio es mala, de manera que aquí se utilizan principalmente derivados solubles en agua.

45 La patente US2007/054317 describe moléculas rédox basadas en osmio solubles en agua con las propiedades favorables anteriormente mencionadas y formatos de inmunoensayo electroquímicos y geometrías de electrodos distintos, por ejemplo, electrodos interdigitales con los que pueden detectarse sensiblemente las moléculas rédox solubles en agua mencionadas. Además, los formatos de ensayo descritos en la patente US2007/054317 no aventajan el estado de la técnica mediante la utilización de los nuevos mediadores rédox y conjugados de anticuerpo y antígeno que se basan en éstos, especialmente no se describe ningún nuevo formato de inmunoensayo homogéneo altamente sensible.

50 La patente EP1331482A1 describe un procedimiento de inmunoensayo electroquímico, utilizándose conjugados de ferroceno y otros mediadores rédox con el analito. Para la detección se utiliza un biosensor enzimático, por ejemplo, un sensor de glucosa, conduciendo la liberación del conjugado de ferroceno-analito a una modulación de la señal electroquímica del sensor de glucosa. Una desventaja de la química de acoplamiento descrita es que se utiliza una proteína tal como albúmina de suero humano para preparar un conjugado muy soluble en agua. El experto sabe que no es posible sintetizar conjugados de proteína-mediador rédox con una relación estequiométrica exactamente definida. Por tanto, la característica de la prueba de lote a lote siempre es distinta. El experto también sabe que un procedimiento de señalización indirecto de este tipo también trae consigo que inhibidores de la muestra puedan tanto modular la reacción enzimática como el conjugado de mediador rédox-

analito. Sería más robusto un procedimiento en el que el conjugado de mediador rédox modulara directamente la señal electroquímica.

Según un principio de este tipo, el ensayo electroquímico homogéneo para ácido hipúrico está construido en un chip microfluídico de Sung y col. [Sung Ju Yoo, Young Bong Choi, Jong Il Ju, Gun-Sik Tae, Hyug Han Kim y Sang-Hoon Lee. *Analyst* 134 (2009), 2462-2467]. Se sintetiza un conjugado de ferroceno-ácido hipúrico y se utiliza un anticuerpo anti-ácido hipúrico. El conjugado y el anticuerpo unido a la partícula polimérica se añaden en cantidad exactamente definida a la muestra. Si una muestra no contiene ácido hipúrico libre, el conjugado se une a la partícula cargada con anticuerpo y se separa por centrifugación de ésta. En un experimento voltamétrico, al potencial de oxidación del ferroceno, en el sobrenadante circula una corriente correspondientemente pequeña. Si, por el contrario, la muestra contiene ácido hipúrico libre, entonces el anticuerpo unido a la partícula se une preferiblemente al mismo, el conjugado permanece en la centrifugación en disolución y en el experimento voltamétrico circula una corriente correspondientemente mayor (al potencial de oxidación del ferroceno). Este ensayo y todos los que siguen este principio presentan desventajas graves que prácticamente no permiten una utilización en el diagnóstico.

En primer lugar, el potencial de oxidación del ferroceno (+400 mV frente a Ag/AgCl) es demasiado alto para la detección selectiva en sangre y suero sanguíneo. En segundo lugar, no es aceptable una etapa de centrifugación para la mayoría de las aplicaciones *in situ*. En tercer lugar, este procedimiento es muy poco sensible a pesar de la etapa de separación (centrifugación). Así, Sung y col. han medido como la concentración más pequeña aproximadamente 10 mg/ml de ácido hipúrico, que se corresponde con una concentración de 55 mM. Sin embargo, analitos de inmunoensayo típicos deben medirse en el intervalo nanomolar de concentración (o por debajo), es decir, un millón de veces más sensible.

Un ensayo electroquímico homogéneo que progresa sin etapa de separación fue presentado por Di Gleria y col. [Katalin Di Gleria, H. Allen, O. Hill, Calum J. McNeil, *Anal. Chem.* 1988, 58, 1203-1205]. Aquí también se añade a la muestra un conjugado de ferroceno y analito, lidocaína, así como el anticuerpo anti-analito. Como principio de detección se utiliza una reacción enzimática para el conjugado de ferroceno-antígeno como mediador rédox. Si la muestra no contiene analito libre, el conjugado se une al anticuerpo y la reacción enzimática, aquí glucosa oxidasa, se retrasa, la corriente amperométrica será menor. La desventaja de este formato es que no es suficientemente sensible para un inmunoensayo típico. Así, en suero se consiguió un límite de detección inferior de aproximadamente 5 μ M, aproximadamente 1000 veces superior que en inmunoensayos típicos.

Se describió una variante de este inmunoensayo rédox homogéneo en la que el conjugado de mediador rédox se mide directamente electroquímicamente. Aquí también sólo se alcanzaron límites de detección insuficientes.

Este ensayo y todos los que siguen un principio similar (es decir, la modulación de la constante de difusión mediante la unión a anticuerpo) presentan graves desventajas que dificultan una utilización en el diagnóstico. La desventaja principal es la baja selectividad, ya que la modulación de la constante de difusión sólo trae consigo una baja modulación de señales: incluso cuando el conjugado activo para rédox esté completamente unido por el anticuerpo, todavía puede medirse una señal amperométrica o voltamétrica significativa. Sería deseable que el conjugado unido a anticuerpo apenas produjera señal electroquímica.

Lo mismo rige para el principio de modulación de una reacción enzimática debido a la escasez de mediador rédox después de la unión a un anticuerpo. Incluso este formato sólo puede detectar concentraciones micromolares (o superiores).

En conjunto, puede decirse que inmunoensayos electroquímicos homogéneos que se basan en la modulación de la constante de difusión de un conjugado de bajo peso molecular o la modulación de una reacción enzimática debido a la escasez de mediador rédox después de la unión de un anticuerpo no son suficientemente sensibles para medir concentraciones en el intervalo nanomolar (o inferior) tales como son típicas para analitos de inmunoensayo. Por este motivo, a pesar del económico sistema de detección, ninguno de estos ensayos pudo encontrar una aplicación comercial significativa.

Wei y col. describen en *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier Advanced Technology, tomo 24, nº 9, pág. 2909-2914 (2009), el desarrollo de un inmunoensayo electroquímico marcado con rédox.

Ghindils y col. en *Analytical Letters*, tomo 28, nº 1, pág. 1-11 (1995), y Sapin y col. en *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, tomo 45, nº 3, pág. 416-418 (2007), revelaron respectivamente anticuerpos marcados con rédox que se unían específicamente a un marcador rédox (ferroceno o rutenio) e inhibían en gran medida la actividad rédox del marcador rédox unido a los mismos.

La patente US 2004/0020791 A1 describe un inmunoensayo heterogéneo usando anticuerpos de marcador rédox en el que en un modo de realización un conjugado de anticuerpo biespecífico que se une a un marcador rédox

inmovilizado sobre una fase sólida se utiliza para la detección.

Forrow y col. revelan en *Bioconjugate Chemistry*, tomo 15, nº 1, pág 137-144 (2004), un procedimiento para la realización de inmunoensayos homogéneos con detección electroquímica en disolución, sin embargo sin uso de un conjugado de anticuerpo biespecífico.

5 En vista de lo anterior, el objetivo de la presente invención se basa en proporcionar un nuevo procedimiento mejorado para la realización de un inmunoensayo en disolución que ya no presente las desventajas mencionadas del estado de la técnica y ofrezca especialmente una sensibilidad claramente mejorada.

Este objetivo se alcanza según la invención con el procedimiento según la reivindicación 1. Modos de realización más especiales y otros aspectos de la invención son objeto de las posteriores reivindicaciones.

10 El procedimiento según la invención para la realización de formatos de inmunoensayo competitivo homogéneos con detección electroquímica se caracteriza porque dos conjugados distintos se combinan como reactivos con la muestra o la mezcla de muestra/tampón, comprendiendo un conjugado un marcador rédox y una molécula de analito y comprendiendo el segundo conjugado un anticuerpo anti-marcador rédox o un fragmento del mismo que se une específicamente y una molécula que se une específicamente al analito.

15 El analito puede ser en principio cualquier molécula detectable en un inmunoensayo u otro ensayo de unión para la que existe un componente de unión específico. El analito puede ser de bajo peso molecular, es decir, presentar una masa molar de aproximadamente ≤ 1000 Dalton, o ser de mayor peso molecular y de alto peso molecular. Ejemplos de analitos de mayor peso molecular y de alto peso molecular son ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. Analitos especialmente preferidos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular y proteínas/péptidos, por ejemplo, hormonas, enzimas, biomarcadores, sustancias activas y perjudiciales biológicas, y otras sustancias fisiológica o metabólicamente relevantes.

20 La molécula que se une específicamente a los analitos puede ser un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo, un aptámero, un péptido, un ácido nucleico o un quelante, normalmente orgánico, que se une específicamente al analito (por ejemplo, en un sitio de unión especial o estructura de coordinación) y no es un anticuerpo (en la bibliografía también se denomina "molécula anfitriona" para una "molécula huésped"). Preferiblemente se trata de un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo.

25 Además, el procedimiento según la invención se caracteriza porque la presencia del analito libre en la muestra permite o promueve la unión del marcador rédox al anticuerpo anti-marcador rédox o al fragmento del mismo que se une específicamente, inhibiéndose ("apagándose" o "extinguiéndose") mediante esta unión la actividad rédox del marcador rédox unido, por lo que se genera o modifica una señal detectable. El procedimiento según la invención es o contiene un ensayo competitivo.

30 Una configuración de procedimiento adecuada es, por ejemplo, del siguiente modo: se disuelven en tapón un conjugado de anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo anti-analito y un anticuerpo anti-marcador rédox, y el conjugado de marcador rédox-analito. Una parte de la molécula del conjugado se une al conjugado de anticuerpo biespecífico, la mayor parte de las mismas al extremo anti-analito del conjugado de anticuerpo biespecífico, ya que el anticuerpo anti-analito, especialmente bajo las condiciones estéricas del conjugado, posee preferiblemente una constante de afinidad claramente mayor que la del anticuerpo anti-marcador rédox. Por tanto, el extremo del marcador rédox del conjugado prácticamente no se une y así la medición electroquímica (por ejemplo, amperometría o voltametría) está libremente accesible y se mide una alta corriente de reducción. Si ahora se añaden moléculas de analito libre de la muestra, éstas desplazan el extremo de analito del conjugado de analito-marcador rédox de los sitios de unión del anticuerpo para el analito. Sólo ahora pueden unirse los extremos del marcador rédox del conjugado a la parte de anticuerpo anti-marcador rédox del conjugado de anticuerpo biespecífico, por lo que se inhibe ("apaga") la actividad rédox del marcador rédox unido, y se mide una señal electroquímica reducida.

45 El procedimiento según la invención aventaja ampliamente el estado de la técnica ya que por primera vez se aplica el principio del "apagado" de una señal por la unión anticuerpo-antígeno (análogamente al apagado de la fluorescencia o extinción de la fluorescencia) a la detección electroquímica directa. Los inmunoensayos por extinción de fluorescencia pertenecen a los inmunoensayos homogéneos más sensibles y más rápidos, ya que la señal se genera en tiempo real proporcionalmente a la unión anticuerpo-antígeno. Una característica de señal de este tipo también se ha realizado ahora por primera vez en una detección electroquímica.

50 Como marcadores activos para rédox (en analogía con el fluoróforo) pueden utilizarse según la invención ferroceno (o derivados discretionales del ferroceno), complejos de osmio-di-bipiridilo y otros complejos basados en osmio, complejos de rutenio-bipiridilo y otros complejos basados en rutenio, p-aminofenol, hexacianoferrato (II/III), hidroquinonas/quinonas, u otros mediadores rédox, especialmente otros marcadores conocidos y adecuados para inmunoensayos. El "apagado" de la actividad rédox del ferroceno, o de otro mediador rédox, no era posible hasta la

55

5 fecha en el estado de la técnica bajo las condiciones de un inmunoensayo. Aunque en trabajos tales como el de Nielson y col. [Roger M. Nielson, Joseph T. Hupp, Inorg. Chem. 1996, 35, 1402-1404] se describió que los calixarenos, que forman una débil unión con el ferroceno, pueden apagar completamente la actividad rédox de ferrocenos, sólo a concentraciones de aproximadamente 10 mM y superiores. Concentraciones tan altas de un extintor de rédox son completamente inadecuadas para inmunoensayos.

10 Sorprendentemente se encontró que anticuerpos monoclonales que fueron generados por uno de los inventores para la unión de ferroceno presentaban una característica de apagado de este tipo. Un nuevo anticuerpo monoclonal especialmente eficaz se une exclusivamente a la forma oxidada del ferroceno, el catión ferrocenio (o ferricinio), llamado de ahora en adelante ferrocenio. La actividad rédox del ferrocenio unido se apaga completamente de esta manera, ya no puede reducirse más en estado unido sobre un electrodo (carbón vidriado, metal noble). El anticuerpo que se une a ferrocenio se utiliza en los ejemplos de realización del procedimiento según la invención como extintor de rédox (en analogía con el extintor de fluorescencia).

15 Sin embargo, en el marco del procedimiento según la invención también puede utilizarse cualquier otro anticuerpo que se una al mediador rédox utilizado en la prueba y de esta manera inhiba su actividad rédox (apague). A este respecto, para la invención es irrelevante si el anticuerpo se une al estado oxidado o al reducido del mediador rédox. Sin embargo, en algunas aplicaciones ofrece ventajas especiales un anticuerpo que se une al mediador oxidado, como en el caso del anticuerpo anti-ferrocenio que se aplica por primera vez en la invención descrita. El motivo es el menor potencial de detección que puede utilizarse para la reducción del marcador rédox (en el ejemplo de aplicación se detecta a +100 mV frente a Ag/AgCl, en el caso de la oxidación debería detectarse a +250 a +400 mV, lo que tendría como consecuencia señales inespecíficas elevadas en suero sanguíneo).

20 Estos anticuerpos de marcador rédox con acción extintora y estos conjugados de anticuerpo biespecífico completos se usan en la presente invención. Los anticuerpos de marcador rédox con acción extintora utilizados según la invención pueden inhibir ampliamente la actividad rédox del marcador rédox unido, preferiblemente hasta más del 80%, más preferiblemente más del 90%, todavía más preferiblemente más del 95%, o inhibirla completamente ("apagarla" o "extinguirla").

25 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente solicitud también comprenderá en principio fragmentos que se unen específicamente del mismo, mientras que del contexto no se deduzca claramente algo distinto.

30 Con un anticuerpo anti-ferrocenio descrito aquí por primera vez puede realizarse un inmunoensayo competitivo para la detección de ferrocenio (o ferroceno) que, sin embargo, no tendría gran importancia técnica. El procedimiento presenta una elevada utilidad técnica y un alto valor comercial sólo cuando con él puedan detectarse analitos discretos con el inmunoensayo electroquímico. Para este fin, la formación del inmunocomplejo de ferrocenio-anti-ferrocenio con un anticuerpo monoclonal discrecional debe poder acoplarse de manera que la unión del analito diana al anticuerpo complementario tenga como consecuencia una modulación de la unión ferrocenio-anti-ferrocenio. El elegante enfoque descrito por Sellrie y col. [patente US2008199972A] del acoplamiento de dos inmunorreacciones mediante un conjugado de ambos antígenos que están unidos con un ligador muy corto, de manera que sólo puedan unirse respectivamente el anticuerpo anti-pesticida o el anticuerpo anti-fluoresceína, no puede utilizarse en el caso del procedimiento según la invención, ya que los conjugados de ferroceno que se acoplan con sustancias de bajo peso molecular generalmente no son solubles en agua. Para la utilidad práctica debió prepararse un conjugado de ferroceno-analito que presentaba una solubilidad en agua suficientemente alta. El experto conoce varias moléculas de ligador solubles en agua que pueden utilizarse para la síntesis de bioconjugados. Los ligadores de polietilenglicol (sinónimo: ligadores de poli(óxido de etileno), PEG, PEO) pertenecen a los ligadores solubles en agua más frecuentemente utilizados debido a la buena solubilidad en agua, la baja unión no específica a proteínas y superficies y la disponibilidad de una pluralidad de longitudes de cadena y funciones químicas. Los ligadores de polietilenglicol (sinónimo: ligadores de poli(óxido de etileno)) son moléculas lineales que pueden presentar funciones acoplables en uno o varios extremos, por ejemplo, grupos carboxilo, grupos amino, grupos tiol, etc. La solubilidad en agua de los ligadores de polietilenglicol es muy alta, y aumenta al aumentar la longitud de cadena del ligador.

35 40 45 50 55 Para la preparación de los conjugados utilizados en el procedimiento según la invención se utiliza un ligador soluble en agua bifuncional de longitud de cadena suficiente, por ejemplo, un ligador de PEG de 400-30.000 Da con dos funciones acoplables terminales, preferiblemente un ligador de diamino-PEG de 2000 Da, para acoplar en un extremo ferroceno, u otro mediador rédox adecuado y, en el otro extremo los analitos diana. Mediante la utilización de ligadores de PEG de longitud suficiente también pueden ponerse a disposición de la prueba analitos insolubles en agua. Igualmente pueden utilizarse ligadores homobifuncionales que presentan en ambos extremos la misma función de acoplamiento tales como ligadores heterobifuncionales que presentan dos funciones de acoplamiento diferentes.

En estudios de unión con el conjugado de ferroceno-analito en presencia de anticuerpo anti-ferrocenio libre,

anticuerpo anti-analito libre y conjugado ferroceno-analito se mostró que no se realizó ninguna modulación suficiente de la señal del ferroceno por el analito. También se mostró que el conjugado de ferroceno-analito debía mantenerse en estado oxidado durante la duración total del análisis para alcanzar señales medibles. Se descubrió sorprendentemente que en algunos tampones ácidos el ferroceno permanecía permanentemente en estado oxidado. En el procedimiento según la invención, el ensayo se realiza preferiblemente a valores de pH entre pH 1 y pH 7, con especial preferencia entre pH 4 y pH 5. Sales tampón adecuadas son, por ejemplo, fosfato, MES, HEPES, TRIS, bistris, acetato, glicilglicina, glicina.

Se ha encontrado ahora un nuevo principio sorprendentemente sencillo para acoplar la reacción de unión de ferroceno-anti-ferroceno con la reacción de unión de analito-anti-analito. Para esto se preparó un conjugado de anticuerpo biespecífico acoplado el anticuerpo anti-ferroceno en relación estequiométrica (1:1) con el anticuerpo anti-analito, usándose un ligador más corto de como máximo 10 unidades de metileno de longitud. Así pudo conseguirse por primera vez en un inmunoensayo electroquímico la característica de apagado de señales deseada anteriormente descrita.

El principio de funcionamiento, explicado en el ejemplo de un inmunoensayo de progesterona competitivo, es a este respecto del siguiente modo: el conjugado de anticuerpo biespecífico, constituido por un anticuerpo anti-progesterona y un anticuerpo anti-ferroceno, y el conjugado de ferroceno-progesterona se disuelven en tampón. Una parte de las moléculas del conjugado se une al conjugado de anticuerpo biespecífico, la mayor parte de las mismas al extremo anti-progesterona del conjugado de anticuerpo biespecífico (ya que este anticuerpo posee una mayor constante de afinidad). El extremo de ferroceno del conjugado prácticamente no se une, ya que el ligador de PEG es demasiado corto para esto, y además debería adoptar una conformación doblada energéticamente desfavorable. Por tanto, el extremo de ferroceno está libremente accesible para la medición electroquímica (amperometría o voltametría) y se mide una alta corriente de reducción. Si ahora se añaden moléculas de progesterona libre de la muestra, éstas desplazan el extremo de progesterona del conjugado de progesterona-ferroceno de los sitios de unión del anticuerpo para progesterona. Sólo ahora pueden unirse los extremos de ferroceno del conjugado a la parte de anticuerpo anti-ferroceno del conjugado de anticuerpo biespecífico, y se mide una señal electroquímica reducida (ilustración véase Fig. 1).

Al añadir un exceso de conjugado de anticuerpo biespecífico en comparación con conjugado de ferroceno-analito, la mayoría de los restos de ferroceno son unidos por el conjugado de anticuerpo y la señal electroquímica se reduce casi a cero, es decir, se apaga. Sin embargo, el experto sabe que la concentración de anticuerpo o la concentración de anticuerpo biespecífico en el inmunoensayo se elige de manera que resulte una sensibilidad máxima para progesterona, de manera que el conjugado de anticuerpo se añada en exceso a un ensayo altamente sensible. En este caso, la señal (completa) electroquímica tampoco se apaga completamente a alta concentración de progesterona. Se ha mostrado que un ensayo de progesterona es el más sensible cuando la señal electroquímica sólo puede apagarse a aproximadamente el 50% por la adición de progesterona (véase Fig. 2).

La característica de apagado de la señal alcanzada todavía no se había mostrado hasta la fecha en inmunoensayos electroquímicos, porque no estuvo a disposición ninguna molécula extintora correspondiente.

Los anticuerpos anti-ferroceno utilizados según la invención son un ejemplo de un molécula extintora rédox de este tipo. Sin embargo, es igualmente posible preparar anticuerpos análogos que se unan a otros marcadores rédox y apaguen su señal. La utilización de aquellos anticuerpos en un conjugado de anticuerpo biespecífico también es parte de la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para la realización de inmunoensayos homogéneos directos en disolución con detección electroquímica sensible, caracterizado porque pueden medirse concentraciones nanomolares de analitos de bajo peso molecular o de alto peso molecular, porque ninguno de los reactivos está inmovilizado, no tiene lugar ninguna etapa de separación y lavado y la reacción de unión se detecta electroquímicamente en tiempo real.

La aplicación técnica del procedimiento según la invención es especialmente sencilla, ya que puede utilizarse con distintas técnicas electroanalíticas que son conocidas para el experto, no exige ningún tipo de modificación de los electrodos de medición (por ejemplo, modificación química, membranas, recubrimiento con películas delgadas, estructuración lateral, etc.) y es prácticamente discrecionalmente escalable (disminución de las dimensiones de los electrodos, reducción del volumen de análisis). Como el principio de generación de señales, es decir, el apagado de la actividad rédox de un mediador rédox discrecional, puede aplicarse a todas las técnicas de medición electroanalíticas conocidas tales como, por ejemplo, amperometría, voltametría, coulometría, valoración amperométrica, valoración coulométrica, potenciometría, espectroscopía de impedancia, etc., el procedimiento según la invención puede combinarse con todos estos procedimientos para nuevas aplicaciones de inmunoensayo. Así, en algunos casos, la amperometría puede ser el procedimiento de elección, por ejemplo, para conseguir un sistema completo lo más económicamente posible, o para utilizar detectores amperométricos existentes (por ejemplo, aparatos de medición de biosensores de glucosa) para la utilización de inmunoensayos. Dependiendo del

caso de aplicación y analito deseado es posible variar la técnica de electroanálisis sin tener que desarrollar de nuevo en principio el inmunoensayo.

5 La variabilidad y aplicabilidad técnica del nuevo principio de inmunoensayo se muestra especialmente clara cuando se utiliza en sistemas de análisis microfluídicos (sistemas de laboratorio en un chip, "Lab-on-a-Chip"). Esto es, en especial, fácilmente posible, ya que se trata de un inmunoensayo homogéneo, sin componentes inmovilizados y sin etapas de separación. Los reactivos pueden incorporarse de manera líquida o seca en el sistema de laboratorio en un chip ("Lab-on-a-Chip"), de modo que se liberan por la adición de la muestra y se inicia el ensayo. La señal de medida puede medirse continuamente, o sólo al principio y al final del análisis (después de alcanzar el equilibrio de unión). No es necesario ningún tipo de sincronización de los transcurso, etapas de dosificación y lavado o centrifugación para conseguir el resultado del análisis. A diferencia de muchos procedimientos de medición ópticos (por ejemplo, fotometría, medición de fluorescencia) la relación señal con respecto a ruido de procedimientos electroanalíticos tampoco empeora con la miniaturización, es decir, para electrodos miniaturizados no deben desarrollarse nuevos y complejos detectores y amplificadores.

10 El alto valor del nuevo procedimiento también se muestra en que con él es posible realizar inmunosensores de un solo uso altamente sensibles para un solo uso como, por ejemplo, en la prueba de embarazo actualmente habitual según el principio de inmunoensayo de flujo lateral. La electrónica necesaria para la detección (por ejemplo, un circuito de conmutación amperométrico) puede integrarse en un aparato portátil económico (por ejemplo, un aparato de medición de tiras reactivas de glucosa) o incluso realizarse como electrónica de un solo uso (por ejemplo, un circuito impreso o un circuito de conmutación altamente integrado).

15 Igualmente, los nuevos procedimientos también son adecuados para analizadores de laboratorio que realizan paralelamente completamente automáticamente un número distinto de inmunoensayos. Aquí surte efecto el corto tiempo de análisis del procedimiento según la invención de 1 a 5 minutos.

20 En un modo de realización especial del procedimiento según la invención, los reactivos necesarios se añaden en forma soluble y una detección electroquímica del acontecimiento de unión se realiza en tiempo real.

25 En otro modo de realización especial, todos los reactivos necesarios se añaden a la muestra como mezcla preparada y se realiza una detección electroquímica del acontecimiento de unión en tiempo real (principio de mezcla y medida, "Mix-and-measure").

30 En otro modo de realización especial, todos los reactivos necesarios se ponen a disposición como reactivos secos en un recipiente de reacción adecuado (por ejemplo, tubo Eppendorf, placa de microtitulación, sistema de laboratorio en un chip ("Lab-on-a-Chip"), tiras reactivas) y se disuelven primero mediante la adición de la muestra y dado el caso tampón, por lo que se caracteriza el inicio del análisis.

35 En todavía otro modo de realización especial especialmente favorable, el inmunoensayo se realiza en un sistema de análisis microfluídico (laboratorio en un chip, "Lab-on-a-Chip").

En un modo de realización típico, el inmunoensayo se realiza en un analizador completamente automatizado.

Otra mejora del procedimiento según la invención puede conseguirse siempre que en lugar de un electrodo sencillo se use para la detección un electrodo estructurado, por ejemplo, un electrodo interdígital con el que puede elevarse todavía más la selectividad del análisis mediante la llamada recirculación rédox.

40 Otra modificación ventajosa del procedimiento según la invención consiste en que en lugar de una reacción rédox electroquímica sencilla (por ejemplo, reducción del ferroceno en ferroceno) se utiliza una reacción cíclica enzimáticamente catalizada (por ejemplo, reducción electroquímica seguida de reoxidación enzimática de ferroceno), una llamada recirculación enzimática, con la que puede elevarse todavía más la sensibilidad del análisis.

45 El procedimiento según la invención es especialmente adecuado para mediciones en el intervalo de concentración nanomolar bajo y aproximadamente 1000 veces más sensible que los inmunoensayos electroquímicos homogéneos conocidos hasta la fecha sin etapas de separación. Esta enorme mejora de la sensibilidad se consigue por el nuevo principio de señales anteriormente descrito, en el que la actividad rédox del conjugado activo para rédox puede apagarse completamente (en lugar de sólo reducir la constante de difusión tal como en los procedimientos conocidos hasta la fecha) después de la unión al anticuerpo.

50 A este respecto, el procedimiento de medición electroquímica es técnicamente igual de sencillo que en el procedimiento anteriormente mencionado, ya que se realiza una medición amperométrica o voltamétrica sencilla en electrodos sin recubrir convencionales (por ejemplo, electrodos de carbón vidriado). Las etapas de manipulación manuales se limitan a la adición de reactivos, así como la adición de la disolución de prueba, no se necesita una etapa de separación. El procedimiento según la invención también hace posible un análisis según el principio de

mezcla y medida ("Mix-and-measure"), y es notablemente adecuado para la automatización. A este respecto, el procedimiento según la invención es muy escalable, es decir, aplicable a volúmenes miniaturizados, por ejemplo, en aplicaciones microfluídicas (laboratorio en un chip, "Lab-on-a-Chip"). Debido a esta característica y al bajo potencial de detección, el procedimiento según la invención de normalmente +100 mV (frente a Ag/AgCl) es adecuado para la medición directa de analitos de bajo peso molecular tales como, por ejemplo, hormonas esteroideas, así como de analitos de elevado peso molecular tales como, por ejemplo, hCG o marcadores de proteína en muestras biológicas complejas tales como, por ejemplo, la sangre.

Por tanto, el procedimiento según la invención es adecuado para múltiples inmunoensayos comercialmente representativos y puede sustituir procedimientos de detección actuales que son técnicamente complejos (y, por tanto, caros) o difíciles de miniaturizar y de automatizar. Es adecuado para aplicaciones en el diagnóstico clínico, analítica medioambiental y de alimentos y, debido a la buena capacidad de miniaturización y sencillez técnica, especialmente para aplicaciones fuera del laboratorio (aplicaciones *in situ*, análisis de punto de cuidado ("Point-of-Care")), sensores de un solo uso, inmunoensayos de laboratorio en un chip ("Lab-on-a-Chip"). Por tanto, el procedimiento según la invención dispone del potencial para sustituir en muchas aplicaciones convencionales caros sistemas de detección tales como, por ejemplo, detectores de fluorescencia o detectores de polarización de fluorescencia.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Representación esquemática del inmunoensayo según la invención en el ejemplo de detección de progesterona

Fig. 2: Curva de dosis-efecto para la medición amperométrica de progesterona según el procedimiento según la invención

Los siguientes ejemplos no limitativos explicarán más detalladamente la invención.

EJEMPLO 1

Inmunoensayo de progesterona competitivo directo en suero sanguíneo

Aparato: celda con agitación electroquímica de 1 ml de volumen de trabajo, potencióstato en el modo amperométrico

Tampón: tampón acetato, pH 4,4

Muestra: suero humano sin diluir,

Calibrador: suero humano sin diluir, mezclado con 2 ng/ml, 4 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml de progesterona

Etapas de procedimiento:

- Llenar la celda de medición electroquímica con 450 μ l de tampón acetato a pH 4,4
- Polarizar el electrodo de trabajo a + 100 mV (frente a Ag/AgCl)
- Añadir 10 μ l de conjugado de anticuerpo biespecífico (concentración final aproximadamente 0,1 μ g/ml)
- Añadir 10 μ l de conjugado de marcador rédox-progesterona (concentración final aproximadamente 100 nM)
- Añadir 30 μ l de H₂O₂/peroxidasa (concentración final H₂O₂ 5 mM, peroxidasa 0,02 nM)
- Medir la señal base
- Añadir 500 μ l de suero humano (o 500 μ l de calibrador)
- Medir la señal final 180 s después de la adición de suero

La evaluación se realiza mediante una curva de dosis-efecto previamente medida o mediante un calibrado de 2 puntos.

EJEMPLO 2

Inmunoensayo de progesterona competitivo directo en saliva

Aparato: celda con agitación electroquímica de 1 ml de volumen de trabajo, potenciostato en modo amperométrico

5 Tampón: tampón acetato, pH 4,4

Muestra: saliva humana diluida 1:5,

Calibrador: saliva humana diluida 1:5, mezclada con 2 ng/ml, 4 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml de progesterona

Etapas de procedimiento:

- 10
- Llenar la celda de medición electroquímica con 450 µl de tampón acetato a pH 4,4
 - Polarizar el electrodo de trabajo a + 100 mV (frente a Ag/AgCl)
 - Añadir 10 µl de conjugado de anticuerpo biespecífico (concentración final aproximadamente 0,1 µg/ml)
 - Añadir 10 µl de conjugado de marcador rédox-progesterona (concentración final aproximadamente 100 nM)
 - Añadir 30 µl de H₂O₂/peroxidasa (concentración final H₂O₂ 5 mM, peroxidasa 0,02 nM)
- 15
- Medir la señal base
 - Añadir 500 µl de saliva humana diluida 1:5 (o 500 µl de calibrador)
 - Medir la señal final 180 s después de la adición de saliva

La evaluación se realiza mediante una curva de dosis-efecto previamente medida o mediante un calibrado de 2 puntos.

20 EJEMPLO 3

Inmunoensayo de coriongonadotropina humana competitivo directo (hCG) en orina

Aparato: celda con agitación electroquímica de 1 ml de volumen de trabajo, potenciostato en modo amperométrico

25 Tampón: tampón acetato, pH 4,4

Muestra: suero humano sin diluir,

Calibrador: suero humano sin diluir, mezclado con 10 mUI/ml, 20 mUI/ml, 40 mUI/ml, 100 mUI/ml, 200 mUI/ml de hCG

Etapas de procedimiento:

- 30
- Llenar la celda de medición electroquímica con 450 µl de tampón acetato a pH 4,4
 - Polarizar el electrodo de trabajo a + 100 mV (frente a Ag/AgCl)
 - Añadir 10 µl de conjugado de anticuerpo biespecífico (concentración final aproximadamente 0,3 µg/ml)
 - Añadir 10 µl de conjugado de marcador rédox-hCG (concentración final aproximadamente 200 nM)
 - Añadir 30 µl de H₂O₂/peroxidasa (concentración final H₂O₂ 5 mM, peroxidasa 0,02 nM)
- 35
- Medir la señal base
 - Añadir 500 µl de suero humano (o 500 µl de calibrador)
 - Medir la señal final 180 s después de la adición de suero

ES 2 410 754 T3

La evaluación se realiza mediante una curva de dosis-efecto previamente medida o mediante un calibrado de 2 puntos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la realización de formatos de inmunoensayo competitivo homogéneos con detección electroquímica en disolución, caracterizado porque dos conjugados distintos se combinan como reactivos con la muestra o una mezcla de tampón de muestra, comprendiendo un conjugado un marcador rédox y una molécula de analito y comprendiendo el segundo conjugado un anticuerpo anti-marcador rédox o un fragmento del mismo que se une específicamente y una molécula que se une específicamente al analito, y porque la presencia de analito libre en la muestra permite o promueve la unión del marcador rédox al anticuerpo anti-marcador rédox, inhibiéndose (“extinguiéndose”) mediante esta unión la actividad rédox del marcador rédox unido, por lo que se genera o modifica una señal detectable.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el marcador rédox se selecciona del grupo de ferroceno y derivados de ferroceno, complejos de osmio-di-bipiridilo y otros complejos basados en osmio, complejos de rutenio-bipiridilo y otros complejos basados en rutenio, p-aminofenol, hexacianoferrato (II/III), quinonas y otros marcadores rédox conocidos para inmunoensayos electroquímicos.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el marcador rédox es ferroceno y el anticuerpo anti-marcador rédox es un anticuerpo anti-ferroceno, preferiblemente monoclonal.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la molécula que se une específicamente al analito representa un anticuerpo anti-analito, un aptámero, un péptido, un ácido nucleico o un quelante que se une específicamente al analito.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la molécula que se une específicamente al analito es un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque ambos conjugados comprenden moléculas de ligador solubles en agua, especialmente ligadores de PEG.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque los reactivos necesarios se añaden en forma soluble y una detección electroquímica del evento de unión se realiza en tiempo real.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque todos los reactivos necesarios se añaden como mezcla preparada a la muestra y una detección electroquímica del evento de unión se realiza en tiempo real.
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque todos los reactivos necesarios se ponen a disposición como reactivos secos en un recipiente de reacción adecuado y se disuelven mediante la adición de la muestra y, dado el caso, tampón, por lo que se caracteriza el inicio del análisis.
- 45 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el inmunoensayo se realiza en un sistema de análisis microfluídico (laboratorio en un chip, “Lab-on-a-Chip”) y/o en un analizador completamente automático.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque en lugar de un electrodo sencillo para la detección se utiliza un electrodo estructurado, por ejemplo, un electrodo interdigital.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque en lugar de una sencilla reacción rédox electroquímica se utiliza una reacción cíclica enzimáticamente catalizada.

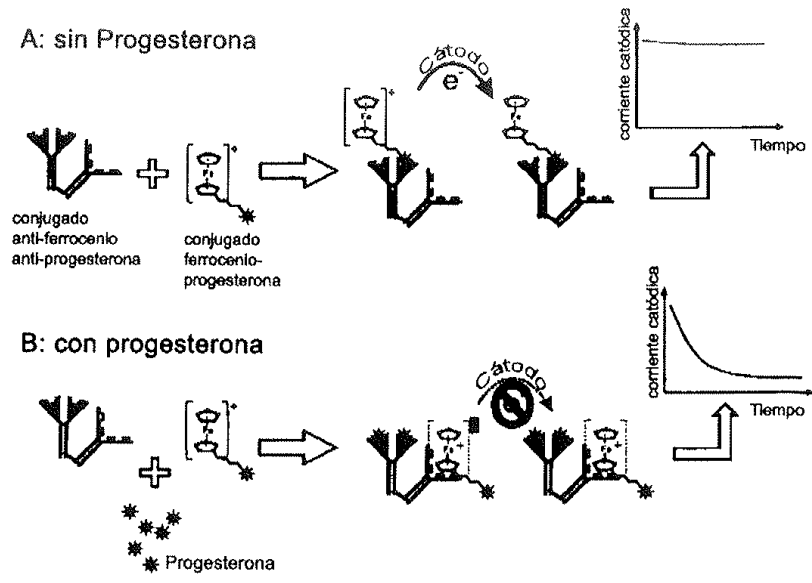


Fig. 1

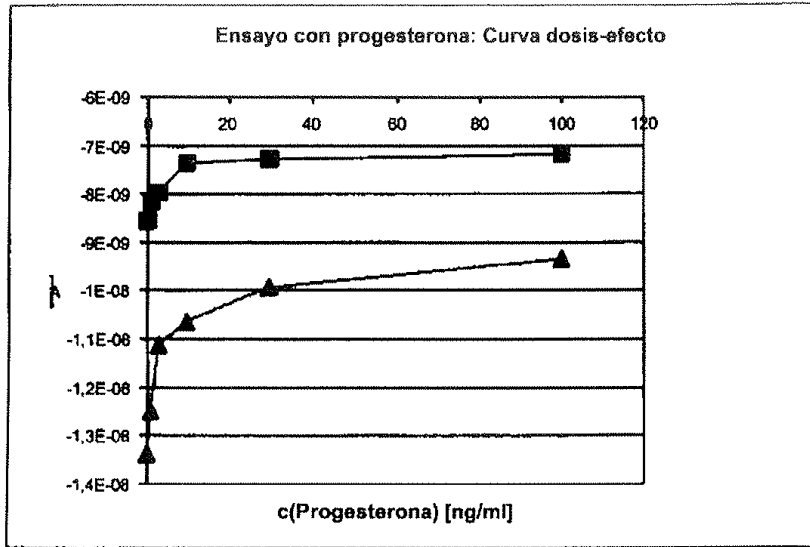


Fig. 2

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

5

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- US 4016043 A [0008]
- US 3839153 A [0008]
- US 6156271 A [0009]
- US 4960693 A [0013]
- EP 0200960 A [0014]
- US 2008199972 A [0015] [0045]
- US 2007054317 A [0019]
- EP 1331482 A1 [0020]
- US 20040020791 A1 [0030]

10

Literatura no especificada en la descripción de la patente

- I. COILLE; S. REDER; S. BUCHER; G. GAUGLITZ. *Biomol. Eng.*, 2002, vol. 18, 273-280 [0016]
- CHONGXIAO TAN; NENAD GAJOVIC-EICHELMANN; WALTER F.M. STÖCKLEIN; RAINER POLZIUS; FRANK F. BIER. *Analytica Chimica Acta*, 2010, vol. 658, 187-192 [0016]
- SUNG JU YOO; YOUNG BONG CHOI; JONG IL JU; GUN-SIK TAE; HYUG HAN KIM; SANG-HOON LEE. *Analyst*, 2009, vol. 134, 2462-2467 [0021]
- KATALIN DI GLERIA; H. ALLEN; O. HILL; CALUM J. MCNEIL. *Anal. Chem.*, 1988, vol. 58, 1203-1205 [0023]
- WEI et al. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Advanced Technology, 2009, vol. 24, 2909-2914 [0028]
- GHINDILS et al. *Analytical Letters*, 1995, vol. 28 (1), 1-11 [0029]
- SAPIN et al. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, vol. 45 (3), 416-418 [0029]
- FORROW et al. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, vol. 15 (1), 137-144 [0031]
- ROGER M. NIELSON; JOSEPH T. HUPP. *Inorg. Chem.*, 1996, vol. 35, 1402-1404 [0040]

15