

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 933**

51 Int. Cl.:

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

G01N 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09728105 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2265952**

54 Título: **Un método para detectar una sustancia química**

30 Prioridad:

02.04.2008 GB 0805954

02.04.2008 US 41845 P

16.09.2008 GB 0816930

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

14.02.2014

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:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 442 933 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

Un método para detectar una sustancia química

5 **Campo de la invención**

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

10 Un inmunoensayo es un ensayo que mide la presencia, o más normalmente la concentración, de un analito en un fluido biológico. Normalmente, implica la unión específica de un antígeno a un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, teniendo varias ventajas los anticuerpos monoclonales, que incluyen reproducibilidad de fabricación y confinamiento de unión a un epítipo de un analito. Con el fin de proporcionar una
15 medición cuantificable de la concentración de analito, se compara la respuesta con muestras convencionales de concentración conocida. Se puede determinar la concentración del anticuerpo o antígeno por medio de una variedad de métodos, aunque el más común consiste en marcar bien el antígeno o bien un anticuerpo y detectar la presencia del marcador.

20 Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos. En un inmunoensayo competitivo, el antígeno de la muestra desconocida compete con el antígeno marcado (indicador) para unirse a los anticuerpos presentes. Posteriormente, se mide la cantidad de antígeno marcado unido al sitio del anticuerpo. Claramente, la respuesta es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra desconocida. En un inmunoensayo no competitivo, también denominado ensayo inmunométrico, el antígeno de la muestra desconocida se une a un
25 anticuerpo capturado en presencia de un exceso de compuestos marcados, formando de este modo un "sándwich" y se mide la cantidad de antígeno unido en este "sándwich". A diferencia del método competitivo, los resultados del método no competitivo son directamente proporcionales a la concentración del antígeno.

30 En un inmunoensayo competitivo típico, se inmoviliza (es decir, se une a) un anticuerpo específico para un antígeno de interés en 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. Además, también se añade una cantidad conocida de antígeno indicador (es decir, marcado) a la muestra. Posteriormente, el antígeno marcado y el antígeno no marcado compiten por la unión a los anticuerpos inmovilizados sobre el soporte polimérico. Se lava
35 el soporte polimérico tras la formación de los complejos anticuerpo-antígeno. Se determina la concentración del antígeno indicador unido a la lámina. Entonces, la señal procedente del antígeno indicador es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra. Este ensayo y otras variaciones de este tipo de ensayo se conocen bien, véase, por ejemplo, "The Immunoassay Handbook, 2ª ed.". David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001.

40 Una variación de este inmunoensayo es el denominado "inmunoensayo de desplazamiento". En este ensayo, se pre-une el antígeno indicador a los anticuerpos presentes en el soporte polimérico. Posteriormente, se añade el antígeno desconocido al sistema y el antígeno desplaza el antígeno indicador a partir de la superficie del soporte. Se determina la pérdida de antígeno indicador y se iguala con la concentración del antígeno desconocido en la muestra. No obstante, la medición del desplazamiento del antígeno indicador está lejos de ser directa.

45 Por ejemplo, Giese y col. (documento US 4.801.726) describen un procedimiento similar. En un denominado inmunoensayo "transitorio", se desplaza un anticuerpo con marcaje fluorescente preunido a una columna de antígeno inmovilizado cuando se añade una alícuota de una muestra a la corriente acuosa que pasa por la columna. Si la alícuota contiene analito, se desplaza una fracción pequeña del anticuerpo indicador y se mide por vía
50 fluorimétrica en el efluente aguas abajo. Esto se diseña como inmunoensayo "repetitivo", que reutiliza la misma columna muchas veces. Este concepto se ha desarrollado para la detección continua y la detección muy intermitente de explosivos. Ligler y col. (documento US 5.183.740) describen un sistema muy similar basado en columna fluorimétrica para TNT. Este se desarrolla de manera adicional para dar lugar a un sistema basado en membranas por parte del mismo grupo (documento US 6.750.031 y Rabbany y col. Biosensors & Bioelectronics 1998,13, 939-944). En todos los casos, el inmuno-desplazamiento tiene lugar en la columna o membrana y la detección ocurre en un instrumento aguas abajo.

60 Herron y col. (documento US 6.979.567) describen el uso de un detector total fluorescente de reflexión interna en inmunoensayo competitivo, que incluye controlar el desplazamiento de un analito desde una superficie saturada. V. I. Chegel y col. Sensor Actuators B 1998, 48, 456-460 y P. T. Charles y col. Anal. Chim. Acta 2004, 525, 199-204 describen ensayos de desplazamiento que usan métodos de fluorescencia/quimiluminiscencia para detectar las especies indicadoras.

No obstante, todavía existe la necesidad en la técnica de una metodología de detección más directa.

65

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

5 proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que sea capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, y un segundo reactivo unido de forma que se puede liberar al primer reactivo y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcador está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula de polímero coloreado, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, un metal, 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, y donde bien el primer reactivo o bien el segundo reactivo tienen un sitio de unión que permite la unión de uno al otro y que es capaz de unirse preferentemente al analito o un derivado del analito;

10 exponer el transductor a la muestra permitiendo de este modo que el analito o un derivado del analito se unan al sitio de unión y desplacen el segundo reactivo;

15 irradiar la muestra con radiación electromagnética;

transducir la energía generada para dar lugar a una señal eléctrica; y

detectar la señal eléctrica.

20 La presente invención también proporciona 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 transducir un cambio en energía en una señal eléctrica;

un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor;

25 un segundo reactivo unido de forma que se puede liberar al primer reactivo y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcaje está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, 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, y donde bien el primer reactivo o bien el segundo reactivo tienen un sitio de unión que permite la unión de uno al otro y que es capaz de unirse preferentemente al analito o a un derivado del analito;

30 una fuente de radiación electromagnética; y

un detector para detectar la señal eléctrica.

35 Ahora se describe la presente invención con referencia a los dibujos, en los cuales:

La Figura 1 es un dispositivo de acuerdo con el documento WO 2004/094512;

Las Figuras 2 a 4 muestran representaciones esquemáticas del método de la presente invención;

40 La Figura 5 muestra un dispositivo de acuerdo con la presente invención; y

Las Figuras 6 y 7 muestran gráficos de cuentas frente a tiempo para dos ensayos, usando el método de la presente invención.

El método de la presente invención proporciona la detección de un analito en una muestra. Como primera etapa, el método incluye la provisión de un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica y exponer la muestra al transductor. Dichos transductores se conocen en la técnica, véase por ejemplo el documento WO 90/13017 y el documento WO 2004/090512. En este sentido, la Figura 1 muestra el principio del dispositivo 1 de detección de sustancia química apropiado para su uso en la presente invención. El dispositivo 1 se basa en la generación de calor en una sustancia 2 por 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 de poli(fluoruro de vinilideno) que tiene polos. Preferentemente, los revestimientos de electrodo 4, 5 están formados por óxido de indio y estaño que tienen un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque es posible casi cualquier espesor a partir de un límite de 1 nm por debajo del cual la conductividad eléctrica es demasiado baja y un límite superior de 100 por encima del cual la transmisión óptica es demasiado baja (no debería ser menor de 95 % T). Se mantiene una sustancia 2 sobre o en posición próxima al transductor 3 usando una técnica apropiada, que se muestra en este caso inmovilizada sobre el revestimiento 4 de electrodo superior. El reactivo puede estar en cualquier forma y se puede depositar una pluralidad de reactivos. Preferentemente, la sustancia 2 se adsorbe sobre el electrodo superior, por ejemplo, se acopla o se une covalentemente o por medio de fuerzas intermoleculares tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waal. Una característica clave de este dispositivo es que la sustancia 2 genera calor cuando se produce la irradiación por medio de 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 avalado por teoría alguna, se piensa que la sustancia 2 absorbe la luz para generar un estado excitado que posteriormente experimenta desintegración no radiativa, generando de este modo 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 entorno) aunque también se pueden generar otras formas de energía, por ejemplo, una onda de choque. No obstante, la energía, es detectada por el transductor y convertida en una señal eléctrica. El dispositivo de la presente invención se calibra para el reactivo particular objeto de medición y, además, no es necesario determinar la forma precisa de energía generada por la desintegración no radiativa. A menos que se especifique lo contrario, el término "calor" se usa en la presente memoria para hacer referencia a la energía generada por la desintegración no radiativa. La fuente de luz 6 se coloca para iluminar la sustancia 2. Preferentemente, la fuente de luz 6 se coloca 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 dentro 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 inmovilizada sobre el transductor. Preferentemente, se usa una longitud de onda de 525 nm, aunque se pueden usar otras longitudes de onda apropiadas con propiedades ventajosas descritas, por ejemplo, en el documento WO 2007/107716.

La energía generada por la sustancia 2 es detectada por el transductor 3 y convertida en una señal eléctrica. La señal eléctrica es detectada por 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 se denomina "luz de destellos". En principio, un destello individual de luz, es decir, un pulso de radiación electromagnética, sería suficiente para generar una señal a partir del transductor 3. No obstante, con el fin de obtener una señal reproducible, se usa una pluralidad de destellos de luz que, en la práctica, requieren luz de destellos. Se puede variar la frecuencia a la cual se aplican los pulsos de radiación electromagnética. En el límite inferior, el retardo temporal entre los pulsos debe ser suficiente para determinar el retardo temporal entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica. En el límite superior, el retardo de tiempo entre cada pulso no debe ser tan grande como para que se amplíe de manera no razonable el período necesario para el registro de datos. Preferentemente, la frecuencia de los pulsos es de 2-50 Hz, más preferentemente de 5-15 Hz y del modo más preferido de 10 Hz. Esto corresponde a un retardo temporal entre pulsos de 20-500 ms, 66-200 ms y 100 ms, respectivamente. Además, la denominada proporción "marca-espacio", es decir la proporción de una señal activada con respecto a una señal desactivada es preferentemente uno, aunque se pueden usar otras proporciones sin efecto negativo. Las fuentes de radiación electromagnética que producen luz de destellos con diferentes frecuencias de destello o diferentes proporciones de marca-espacio se conocen en la técnica. El detector 7 determina el retardo temporal (o "retardo de correlación") entre cada pulso de luz procedente de la fuente de luz 6 y la correspondiente señal eléctrica detectada por el detector 7 del transductor 3. El solicitante ha encontrado que este retardo temporal es una función de la distancia, d.

Se puede usar cualquier método 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 a partir del comienzo de cada pulso de luz hasta el momento en el que se detecta un máximo de señal eléctrica que corresponde 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 una señal. Además, no solo se puede detectar la señal a través del medio de intervención capaz de transmitir energía al transductor 3, sino que se pueden distinguir diferentes distancias, d, (esto se ha denominado "perfil de profundidad") y que la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la sustancia 2 en la distancia particular, d, desde la superficie del transductor 3.

La Figura 2 muestra el dispositivo 1 de la Figura 1 en un inmunoensayo de desplazamiento de acuerdo con la presente invención. En esta realización, el primer reactivo es un anticuerpo y el segundo reactivo es un analito marcado. El transductor 3 se muestra en un dispositivo vertical en la Figura 2a. Las ventajas de este dispositivo se comentan con más detalle a continuación. El transductor 3 está revestido con un primer reactivo que se muestra en la Figura 2 en forma de anticuerpo 9 (un anticuerpo de captura inmovilizado). Se ha generado el anticuerpo 9 contra el analito 10 (véase la Figura 2b) y se une selectivamente al analito 10 cuando se introduce la muestra. El transductor también tiene un analito marcado 11 (que corresponde a la sustancia 2 de la Figura 1). El analito marcado 11 incluye un marcador 12 que tiene una pluralidad de restos de analito 13 unidos al mismo, opcionalmente por medio de un enlazador 14. Se pre-incuba el anticuerpo 9 con un exceso de analito marcado 11. Posteriormente y de forma normal se cubre el transductor 3 que tiene una capa de los anticuerpos 9 con una capa conservante (no mostrada) y se seca. En este estado, se puede almacenar el transductor durante largos períodos de tiempo.

Durante el uso, como se muestra en la Figura 2b, se expone el transductor a la muestra que contiene una concentración desconocida del analito 10. El analito 10 difunde rápidamente hasta la superficie del transductor y desplaza el analito marcado 11 a partir de los anticuerpos 9, véase Figura 2c. Normalmente, el desplazamiento tiene lugar porque el analito tiene una constante de unión más elevada que el analito marcado (segundo reactivo), es decir, porque tiene una velocidad de reacción "activada" más rápida en comparación con la velocidad "activada" del analito marcado (segundo reactivo), o una tasa de reacción "desactivada" más lenta en comparación con la tasa "desactivada" del analito marcado o ambas. Se puede controlar la reacción en tiempo real usando el transductor 3

de la manera que se ha explicado anteriormente con referencia a la Figura 1. Debido a que se puede llevar a cabo el ensayo sin ningún reactivo diferente de los presentados en la superficie del transductor al comienzo del ensayo, se puede denominar el ensayo como "carente de reactivos". Preferentemente, los reactivos primero y segundo son los únicos reactivos presentes. El ensayo que se muestra en la Figura 2c es una representación esquemática del desplazamiento del analito marcado en presencia de una elevada concentración de analito en la muestra. Las Figuras 2d y 2e, respectivamente, muestran el desplazamiento a bajas concentraciones de analito. Esto conduce a analitos menos marcados 11 que se liberan desde la superficie del transductor 3. El segundo reactivo liberado desde la superficie es libre para difundir fuera de la superficie. Aunque se puede facilitar la retirada del segundo reactivo desde la superficie, por ejemplo bajo la fuerza de la gravedad/empuje, preferentemente se permite la separación del segundo reactivo de la superficie únicamente por medio de difusión.

El método de la presente invención permite la detección de la unión del analito 10 (aunque indirectamente por medio del control del desplazamiento del analito marcado 11) en tiempo real, sin etapas de separación y lavado. Esto es una ventaja significativa en la técnica. De este modo, en una realización preferida, el ensayo se lleva a cabo sin retirar la muestra del transductor 3 en ningún momento durante el ensayo. Además, no se requiere intervención adicional (por ejemplo, para separar el segundo reactivo unido y no unido) entre la exposición del transductor a la muestra y la irradiación de la muestra.

La Figura 3 muestra una realización en la que el primer reactivo es un analito inmovilizado y el segundo reactivo es un anticuerpo marcado. Se muestra el transductor 3 en un dispositivo vertical en la Figura 3a. El primer reactivo de la Figura 3a es un analito inmovilizado 15. El segundo reactivo es un anticuerpo marcado 16 (un anticuerpo indicador), que corresponde a la sustancia 2 de la Figura 1. El anticuerpo marcado 16 incluye un marcador 12 que tiene una pluralidad de anticuerpos 17 unidos al mismo. El anticuerpo 17 se ha generado contra el analito 10 y se une selectivamente al analito cuando se introduce la muestra.

Durante el uso, como se muestra en la Figura 3b, se expone el transductor a la muestra que contiene una concentración desconocida del analito 10. El analito 10 difunde rápidamente a la superficie del transductor y, debido a su mayor constante de unión o su velocidad de reacción "activada" más rápida en comparación con la velocidad de reacción "desactivada" del segundo reactivo, desplaza el analito inmovilizado 15 de los anticuerpos 17, véase la Figura 3c. Se puede controlar la reacción en tiempo real usando el transductor 3 de la manera que se explica anteriormente en la presente memoria con referencia a la Figura 1.

Se ha mostrado en referencia a las Figuras 2 y 3 que antes de la adición de la muestra, el primer reactivo inmovilizado sobre el transductor y el segundo reactivo se unen uno a otro de forma que se pueden liberar. Normalmente, la unión es a través de fuerzas intermoleculares no covalentes, por ejemplo, la unión entre un anticuerpo y un antígeno o entre ácidos nucleicos complementarios. La unión se puede liberar ya que se puede interrumpir por medio del analito o uno de sus derivados conduciendo al desplazamiento del segundo reactivo a partir del primer reactivo. El sitio de unión que permite la unión del primer reactivo al segundo reactivo puede estar presente sobre el primer reactivo, el segundo reactivo o ambos reactivos, y es capaz de preferentemente unirse al analito o un derivado del analito. La unión es preferencial ya que la presencia del analito conduce a la interrupción de la unión entre el primer reactivo y el segundo reactivo y el reactivo que tiene el sitio de unión para el analito o su derivado se une al analito o su derivado.

Aunque se ejemplifican los reactivos relevantes en las Figuras 2 y 3 por medio de los anticuerpos, es decir un anticuerpo de captura inmovilizado (Figura 2) o un anticuerpo de indicador (Figura 3), la presente invención no se encuentra limitada a los mismos. De este modo, aunque el primer reactivo de la Figura 2 y el segundo reactivo de la Figura 3 son preferentemente anticuerpos, también se pueden usar otros reactivos tales como ácidos nucleicos. En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo un inmunoensayo (desplazamiento) para detectar un analito (hapteno) en una muestra, que comprende las etapas de: proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un anticuerpo de captura inmovilizado sobre el transductor, y un analito marcado unido al anticuerpo de captura que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa; exponer el transductor a la muestra permitiendo de este modo que el analito o un derivado del analito se una al anticuerpo de captura inmovilizado del analito para unirse al anticuerpo de captura inmovilizado y desplazar el analito marcado del transductor; irradiar la muestra con radiación electromagnética; transducir la energía generada en una señal eléctrica; y detectar la señal eléctrica. Alternativamente, que comprende las etapas de: proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un analito inmovilizado sobre el transductor, y un anticuerpo marcado unido al analito inmovilizado que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa; exponer el transductor a la muestra permitiendo de este modo que el analito o un derivado del analito se una al anticuerpo marcado y desplace el anticuerpo marcado del transductor; irradiar la muestra con radiación electromagnética; transducir la energía generada en una señal eléctrica; y detectar la señal eléctrica.

El primer reactivo 9, 15 se muestra en las Figuras 2 y 3 inmovilizado sobre la superficie del transductor 3 y se adsorbe preferentemente sobre el transductor. La superficie también puede estar cubierta por revestimientos adicionales para estabilizar la superficie, por ejemplo, Stablicoat de SurModics Inc, Eden Prairie, MN, EE.UU.

5 Como se ha comentado con referencia a las Figuras 2 y 3, el marcador 12 es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa. De este modo, para detectar la presencia del marcador 12 proximal con respecto al transductor 3, se irradia la muestra con una serie de pulsos de radiación electromagnética. El transductor 3 transduce la energía generada en una señal eléctrica y la señal eléctrica es detectada por medio del detector 7.

10 El marcador 12 es un material que es capaz de interactuar con la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa. El marcador se escoge a partir de 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.

15 En el caso de una partícula magnética, la radiación electromagnética es una radiación de frecuencia de radio. Todos los otros marcadores mencionados en la presente memoria anteriormente emplean luz, que puede incluir radiación IR o UV. Las partículas de oro se encuentran disponibles comercialmente o se pueden preparar usando métodos conocidos (véase por ejemplo G. Frens, Nature, 241, 20-22 (1973)). Para una explicación más detallada de las nanopartículas, véase el documento US 6.344.272 y el documento WO 2007/141581.

20 En una realización (difusión controlada), la presente invención usa una partícula que tiene un tamaño de partícula de 20 a 1000 nm, más preferentemente de 100 a 500 nm. Por tamaño de partícula se entiende el diámetro de partícula en su punto más amplio. Preferentemente, la partícula tiene una densidad de 0,5 a 3,0 g/ml, más preferentemente de 1,5-2,0 g/ml y del modo más preferido de 1,8 g/ml. En una realización particular preferida, la partícula es una partícula de carbono que tiene el tamaño anteriormente mencionado y densidad, aunque se podrían usar otros materiales, tales como poliestireno o látex.

25 En otra realización (asistida por gravedad), 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. Preferentemente, la partícula tiene una densidad de 1,5 a 23 g/ml, más preferentemente de 15-20 g/ml y del modo más preferido de 19 g/ml. En una realización particularmente preferida, la partícula es una partícula de oro que tiene el tamaño de partícula anteriormente mencionado y densidad, aunque se podrían usar otros materiales densos, tales como osmio o iridio.

30 El marcador 12 está posición proximal con respecto al transductor cuando ha tenido lugar el episodio de unión. Es decir, el marcador está suficientemente próximo a la superficie del transductor para que el transductor sea capaz de detectar la energía generada por el marcador con la irradiación de la muestra. No obstante, la distancia actual entre el marcador y la superficie del transductor depende de un número de variables, tales como el tamaño y la naturaleza de la etiqueta, el tamaño y la naturaleza de los anticuerpos y el analito, la naturaleza del medio de muestra, y la naturaleza de la radiación electromagnética y los ajustes correspondientes 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 adapte 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.

35 Se espera que la muestra desconocida contenga el analito, pero por supuesto el ensayo de la presente invención se puede usar para determinar la presencia o ausencia del analito. Preferentemente, el analito es una molécula pequeña en la medida en que el ensayo se adapta de forma ideal para dicha molécula, aunque la presente invención no está limitada a la misma. La expresión "molécula pequeña" usada en la presente memoria es una expresión de la técnica y se usa para distinguir la molécula de macromoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Con frecuencia, se hace referencia a una molécula pequeña en el campo de los inmunoensayos como "hapteno", que es una molécula pequeña que, cuando se une a una molécula de vehículo de gran tamaño tal como una proteína, puede provocar una respuesta inmunológica e incluye moléculas tales como hormonas y fármacos sintéticos. Normalmente, 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 complejo antes de unirse al primer reactivo. Por ejemplo, el analito podría protonarse/desprotonarse con el pH de las condiciones de ensayo. De este modo, el analito que se une al primer reactivo puede ser el propio analito o un derivado de analito; ambos quedan incluidos dentro del alcance de la presente invención.

60 La muestra que puede o no contener el analito de interés generalmente es una muestra de fluido y normalmente una muestra biológica, tal como un fluido corporal, por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero u orina. La muestra puede contener partículas suspendidas y puede ser incluso sangre. Una ventaja del método de la presente invención es

que el ensayo se puede llevar a cabo sobre una muestra que no contenga partículas suspendidas sin que se produzca influencia negativa sobre los resultados del ensayo. Normalmente, la muestra está en el orden de microlitros (por ejemplo, 1-100 μl , preferentemente 1-10 μl). Con el fin de mantener una muestra fluida, preferentemente el transductor se encuentra ubicado en una cámara de muestra que tiene dos paredes laterales, una superficie superior y una superficie inferior y más preferentemente un pocillo. En una realización preferida, el transductor está integrado con la cámara, es decir, forma una de las paredes laterales, o la superficie superior o inferior que define la cámara. Claramente, el reactivo 9 y el analito 11 marcado están en las superficies interiores de la cámara para permitir el contacto con la muestra. La muestra simplemente puede quedar retenida por las fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro del conducto capilar.

En una realización de la presente invención, se puede usar gravedad para contribuir al desplazamiento del analito marcado 11 desde la superficie del transductor. Es decir, el transductor forma la superficie superior de la cámara y el analito marcado es más denso que el medio de la muestra, o el transductor forma la superficie inferior de la cámara y el marcador es menos denso que el medio de la muestra. Cuando el analito marcado es menos denso que el medio líquido de la muestra, el analito marcado se deposita hacia la superficie inferior (la base) de la cámara de la muestra bajo la influencia de la gravedad. Alternativamente, el analito marcado puede ser menos denso que el medio líquido de la muestra de manera que el analito marcado flote hacia la superficie superior de la cámara de muestra (el borde) bajo la fuerza de empuje. En otras palabras, el desplazamiento del analito marcado está asistido por la sedimentación o por medio de flotación bajo la fuerza de la gravedad/empuje. Esto se muestra con más detalle con referencia a la Figura 4.

La Figura 4a-4e muestra el ensayo de la presente invención en el que el transductor forma la superficie superior de la cámara de muestra. En la Figura 4a, el transductor 3 contiene una capa del anticuerpo inmovilizado 9 y una capa del analito marcado 11. Se añade la muestra, como se muestra en la Figura 4b, y el analito 10 difunde hacia el transductor. El desplazamiento del analito marcado 11 se muestra esquemáticamente para concentraciones de analito bajas, intermedias y elevadas en las Figuras 4c-4e. El analito marcado tiene una densidad mayor que el medio de muestra y además tiende a depositarse bajo la influencia de la gravedad.

La presente invención también proporciona un dispositivo para llevar a cabo el ensayo descrito en la presente memoria. 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 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 lleva a cabo la irradiación de la muestra y la detección de la señal eléctrica resultante. La presente invención además proporciona el uso de un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos para controlar un reactivo marcado en un inmunoensayo de desplazamiento como se describe en la presente memoria.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de biosensores activos de piezo/piropelículas

Se revistió por inmersión una película biomorfa (PVDF) de poli(fluoruro de vinilideno) piezoeléctrica con polos, revestida con óxidos de estaño e indio usada como dispositivo de detección en el siguiente ejemplo, en disolución de poliestireno (un 1 % en tolueno) en un entorno de baja humedad para proporcionar una capa de poliestireno sobre la parte superior del óxido de estaño e indio. Posteriormente, se revistió ésta en disolución de poliestreptavidina (200 $\mu\text{g/ml}$ 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 US 5.061.640).

Para preparar una superficie "de captura" se incubó la superficie de poliestreptavidina bien con antitestosterona sometida a tratamiento con biotina, proporcionando una superficie revestida con anticuerpo (C1) o bien con testosterona sometida a tratamiento con biotina proporcionando una superficie revestida con antígeno (C2). Para C1, se incubaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de anti-testosterona sometida a tratamiento con biotina (HyTest Ltd, Turku, Finlandia, Cat # 2T2-biotina, o Accurate Chemical Co, Westbury, Nueva York, EE.UU, Cat # BHS113) 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 de secar a 40 °C. Para C2, se incubaron 30 nmol/l de testosterona sometida a tratamiento con biotina 7a-C6, preparada como se ha descrito en Luppa y col, Clin. Chem. 1997, 43, 2345, 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 de secar a 40 °C.

Ejemplo 2

Preparación de conjugados de indicador marcados con carbono

- 5 Se preparó un conjugado indicador marcado con carbono esencialmente como se describe por parte de Van Doorn y col. (documento US 5.641.589). Para preparar los conjugados de indicador revestidos de anticuerpo (R1), se incubó 1 ml de Special-Black-4 RCC en concreto partículas de carbono de 150 nm (Degussa, Essen, Alemania) en 5 mmol/l de tampón de fosfato, pH 6,2 con 200 µg/ml de disolución de poliestreptavidina durante la noche a temperatura ambiente con agitación, dando como resultado una superficie revestida con estreptavidina (A1). Se lavó el
10 conjugado de carbono resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) con 10 µg/ml de anti-testosterona sometida a tratamiento con biotina (HyTest Ltd., Turku, Finlandia, Cat # 272-biotina, o Accurate Chemical Co, Westbury, Nueva York, EE.UU, Cat. # BHS 113) en PBS y se incubó posteriormente durante la noche con 1 ml de esta suspensión de partículas de carbono revestidas con estreptavidina con agitación. Se lavó el conjugado de carbono resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) tres
15 veces con 0,05 mol/l de tampón de borato a pH 8,5 y se almacenó en este tampón en oscuridad a 4 °C. Para preparar el indicador revestido con antígeno (R2), se incubó 1 ml de partículas de carbono revestidas con estreptavidina (A1) en 5 mmol/l de tampón de fosfato, a pH 6,2 con 30 nmol/l de testosterona sometida a tratamiento con 7α-C6-biotina, preparada como se describe en Lippa y col, Clin. Chem. 1997, 43, 2345, a temperatura ambiente durante la noche con agitación. Se lavó el conjugado de carbono resultante tres veces con 0,05 mol/l de tampón de borato a pH 8,5 como se ha comentado anteriormente y se almacenó en este tampón en oscuridad a 4 °C.

Ejemplo 3

Preparación de conjugados de indicador marcados con oro

- 25 Se prepararon esencialmente conjugados de indicador marcados con oro como se describe por parte de Frens G. Nature 1973, 241, 20-22 o Roth J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry en Bullock GR, Petrusz P, eds. Techniques in Immunocytochemistry, Vol. 2, Nueva York, NY, Academic Press, 1983, 216-284. Para preparar conjugados indicadores revestidos de anticuerpo (R3), se incubó 1 ml de partículas de oro de 150 nm mono-dispersadas (BBI International, Cardiff, Reino Unido) en 5 mmol/l de tampón de fosfato, se incubó a
30 pH 6,2 con 200 µg/ml de disolución de estreptavidina durante la noche a temperatura ambiente con agitación, dando como resultado una superficie revestida con estreptavidina (A2). Se lavó el conjugado de oro resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) con 10 µg/ml de anti-testosterona sometida a tratamiento con biotina (HyTest Ltd, Turku, Finlandia, Cat # 2T2-biotina, o Accurate Chemical Co., Westbury, Nueva York, EE.UU, Cat. # BHS 113) en PBS y posteriormente se incubó durante la noche con 1 ml de esta suspensión de partículas de oro revestidas con estreptavidina con agitación. Se lavó el conjugado de oro resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) tres veces con 0,05 mol/l de tampón de fosfato a pH 8,5 y se almacenó en este tampón en oscuridad a 4 °C. Para preparar el indicador revestido con antígeno (R4), se incubó 1 ml de partículas de oro revestidas con estreptavidina (A2) en 5 mmol/l de tampón de fosfato, a pH 6,2 con
40 20 nmol/l de testosterona sometida a tratamiento con 7α-C6-biotina, preparada como se describe en Lippa y col. Clin. Chem. 1997, 43, 2345, a temperatura ambiente durante la noche con agitación. Se lavó tres veces el conjugado de oro resultante con 0,05 mol/l de tampón de fosfato a pH 8,5 como anteriormente y se almacenó en este tampón en oscuridad a 4 °C.

Ejemplo 4

Preparación de película revestida con anticuerpo revestido con reactivo

- 50 Para preparar una superficie de piezopelícula revestida con anticuerpo revestido con reactivo, se incubó una pieza de piezopelícula revestida con anticuerpo (C1, descrita anteriormente) bien con carbono revestido con antígeno (R2) o con reactivo de oro revestido con antígeno (R4) (véase anteriormente) 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 de secar a 40 °C para proporcionar superficies de reacción revestidas con reactivo de carbono (C3) o revestidas con reactivo de oro (C4), respectivamente.

Ejemplo 5

Preparación de película revestida con antígeno revestido con reactivo

- 60 Para preparar una superficie de piezopelícula revestida con antígeno revestido con reactivo, se incubó una pieza de piezopelícula revestida con antígeno (C2, descrita anteriormente) bien con carbono revestido con antígeno (R1) o con reactivo de oro revestido con anticuerpo (R3) (véase anteriormente) 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 de secar a 40 °C para proporcionar superficies de reacción revestidas con reactivo de carbono (C5) o revestidas con reactivo de oro (C6), respectivamente.

Ejemplo 6

Ensayo: Ensayo de difusión simple, con indicador de carbono, y sensor de piezopelícula revestido con reactivo

- 5 Como se muestra en la Figura 5, 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 con anticuerpo (C3 o C5, descrito anteriormente) y una pieza de policarbonato transparente que bordea a la película 14. Estas películas están separadas a una distancia de aproximadamente 500 micrómetros usando una pieza espaciadora 18 de película de poliéster revestida con adhesivo sensible a la presión cortada en troquel para formar dos cámaras 19, 20 de tamaño desigual; una cámara de dimensiones aproximadas de 30 x 10 x 0,5 mm para la reacción de ensayo y una segunda cámara 20 más pequeña de dimensiones 10 x 10 x 0,5 mm para una reacción de control. Se lleva a cabo la provisión con el fin de permitir las conexiones eléctricas con las superficies de la parte superior e inferior de la piezopelícula con el fin de detectar la carga generada.
- 10
- 15 Se llevan a cabo los ensayos rellenando la cámara grande 19 (a través del orificio de llenado 21) con patrones de testosterona en PBS para proporcionar un intervalo de concentración final de 0,1-100 nmol/l. Simultáneamente se llena la cámara de control con una mezcla de reacción idéntica a la de la cámara de ensayo con el patrón de testosterona sustituido con PBS. Se sellan los orificios de entrada y salida y se conecta el dispositivo de cámaras a un instrumento de ensayo de manera que se orienta verticalmente la piezopelícula sobre la cara lateral de la cámara. Posteriormente, se ilumina la piezopelícula con luz de LED de destellos secuencialmente con cuatro LEDs (de longitud de onda 625 nm), de los cuales tres iluminan áreas diferentes de la superficie de la cámara de ensayo y uno ilumina la superficie de piezopelícula de la cámara de control. Para cada pulso de LED, se mide un voltaje a través de la piezopelícula usando un amplificador de sincronización y un convertor de analógico a digital (ADC). Se representa la señal ADC con el tiempo y la Figura 6 muestra la relación de cuentas de ADC/min frente a la concentración de testosterona. Los datos se han llevado a cero desde el punto de comienzo de la reacción de manera que únicamente se ilustran los cambios de señal.
- 20
- 25

Ejemplo 7

- 30 Ensayo: Ensayo de "difusión asistido por gravedad", de indicador de oro, y sensor de piezopelícula revestido con reactivo

Para llevar a cabo el ensayo, se fabrica una cámara de muestra como se explica en el Ejemplo 6 (C4 o C6, descrito anteriormente). Se configura el ensayo de la misma manera que en el Ejemplo 6, exceptuando que se orienta horizontalmente la piezopelícula con la piezopelícula sobre la cara superior de la cámara. Posteriormente, se ilumina la piezopelícula con luz de LED de destellos secuencialmente con cuatro LEDs (de longitud de onda apropiada para detectar indicadores de oro grandes, concretamente de 625 nm, véase el documento WO 2007/107716), de los cuales tres iluminan áreas diferentes de la superficie de la cámara de ensayo y uno ilumina la superficie de piezopelícula de la cámara de control. Para cada pulso de LED, se mide un voltaje a través de la piezopelícula usando un amplificador de sincronización y un convertor de analógico a digital (ADC). Se representa la señal ADC con el tiempo y la Figura 7 muestra la relación de cuentas de ADC/min frente a la concentración de testosterona. Los datos se han llevado a cero desde el punto de comienzo de la reacción de manera que únicamente se ilustran los cambios de señal.

35

40

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

5 proporcionar un transductor que comprende un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, y un segundo reactivo unido de forma que se puede liberar al primer reactivo y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcador está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula de polímero 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, y donde bien el primer reactivo o bien el segundo reactivo tienen un sitio de unión que permite la unión de uno al otro y que es capaz de unirse preferentemente al analito o un derivado del analito;

10 exponer el transductor a la muestra permitiendo de este modo que el analito o un derivado del analito se unan al sitio de unión y desplacen el segundo reactivo;

15 irradiar la muestra con radiación electromagnética;

transducir la energía generada para dar lugar a una señal eléctrica; y

20 detectar la señal eléctrica.

2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el primer reactivo es un anticuerpo inmovilizado y el segundo reactivo es un analito marcado.

3. Un método como se reivindica en la reivindicación anterior, donde el primer reactivo se adsorbe sobre el transductor.

4. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, donde la muestra contiene partículas suspendidas.

5. Un método como se reivindica en la reivindicación 4, donde la muestra es sangre.

6. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, donde la fuente de radiación se adapta 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.

7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, donde el método se lleva a cabo sin retirar la muestra del transductor entre las etapas de exposición de la muestra al transductor y la irradiación de la muestra.

8. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, donde el primer y segundo reactivos son los únicos reactivos presentes.

9. Un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende:

45 un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica;

un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor;

un segundo reactivo unido de forma que se puede liberar al primer reactivo y que tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcaje está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula de metal, 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, y donde bien el primer reactivo o bien el segundo reactivo tienen un sitio de unión que permite la unión de uno al otro y que es capaz de unirse preferentemente al analito o a un derivado del analito;

50 una fuente de radiación electromagnética; y

55 un detector para detectar la señal eléctrica.

10. Un dispositivo como se reivindica en la reivindicación 9, donde el primer reactivo es un anticuerpo inmovilizado y el segundo reactivo es un analito marcado.

11. Un dispositivo como se reivindica en las reivindicaciones 9 o 10, donde el primer reactivo se adsorbe sobre el transductor.

12. Un dispositivo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde la fuente de radiación se adapta para generar una serie de pulsos de radiación electromagnética y el detector se adapta para determinar el

tiempo de retardo entre cada pulso de radiación electromagnética procedente de la fuente de radiación y la generación de la señal eléctrica.

- 5 13. Un dispositivo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el primer y segundo reactivos son los únicos reactivos del dispositivo.

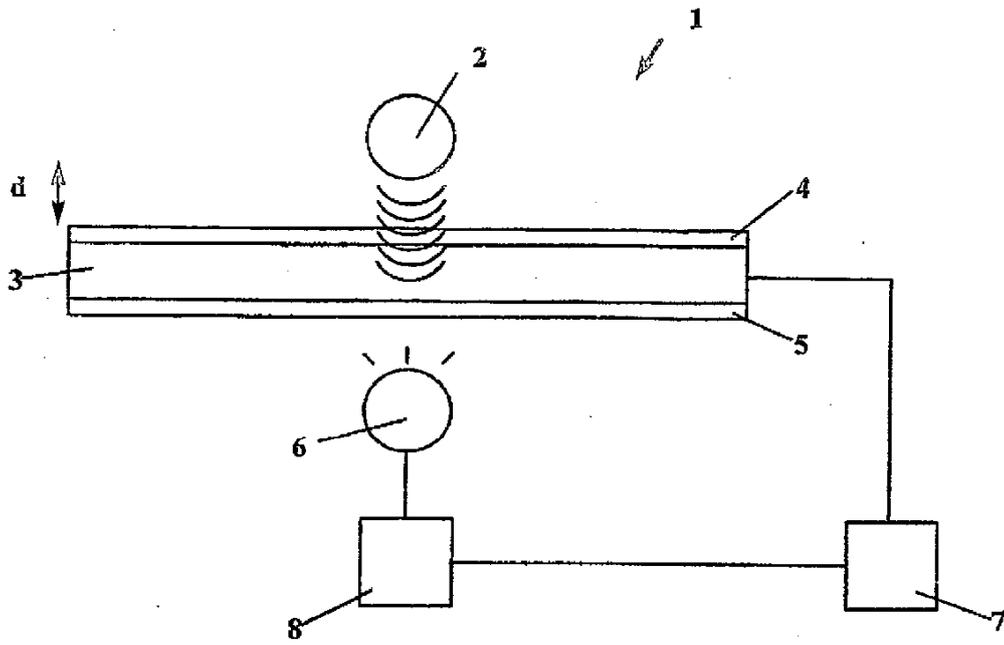


Fig. 1

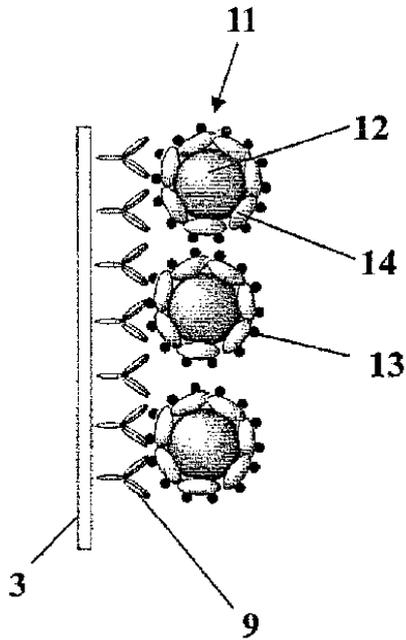


Fig. 2a

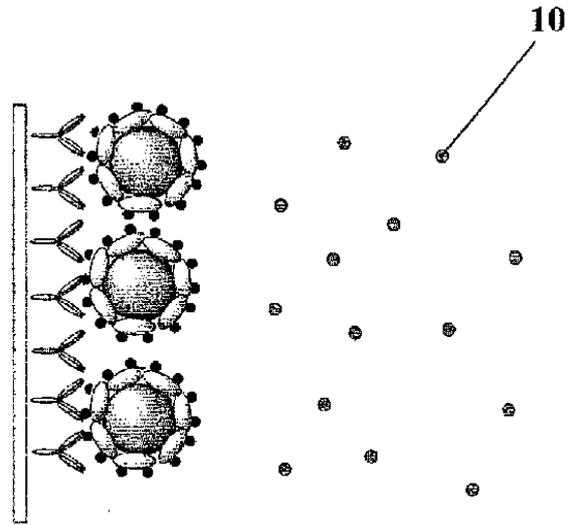


Fig. 2b

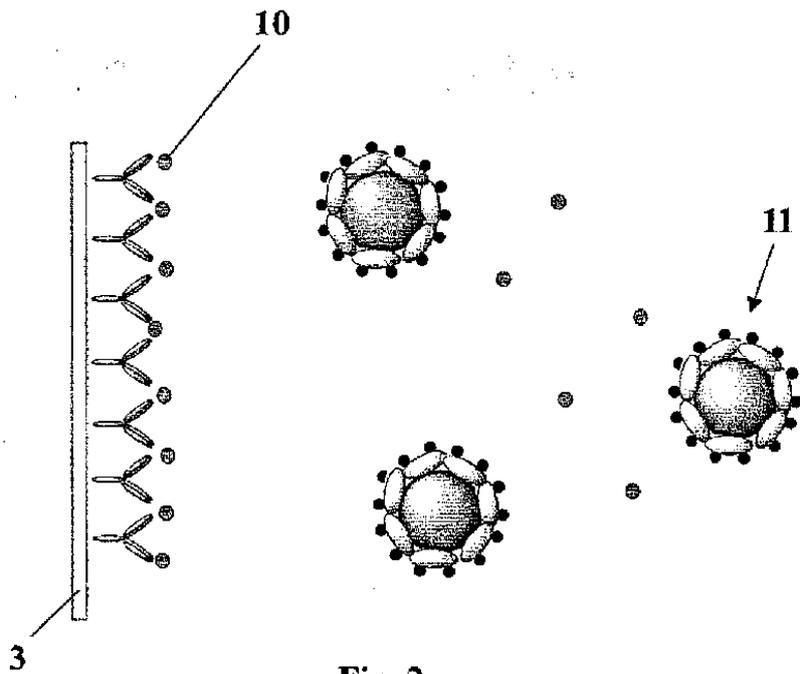


Fig. 2c

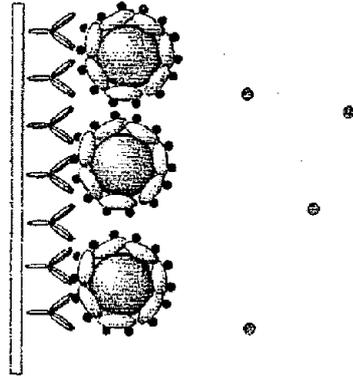


Fig. 2d

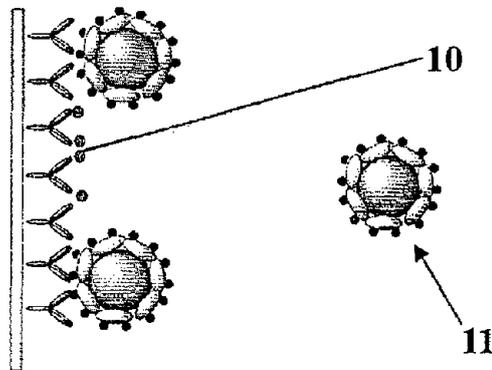


Fig. 2e

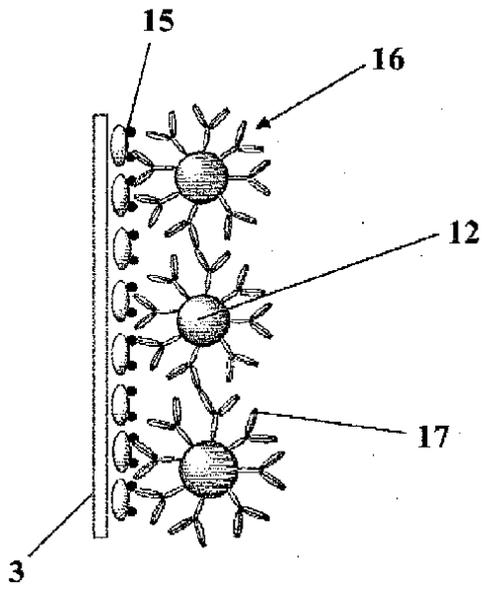


Fig. 3a

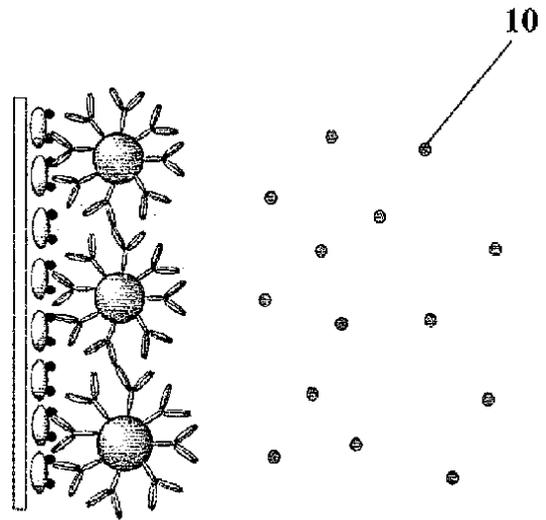


Fig. 3b

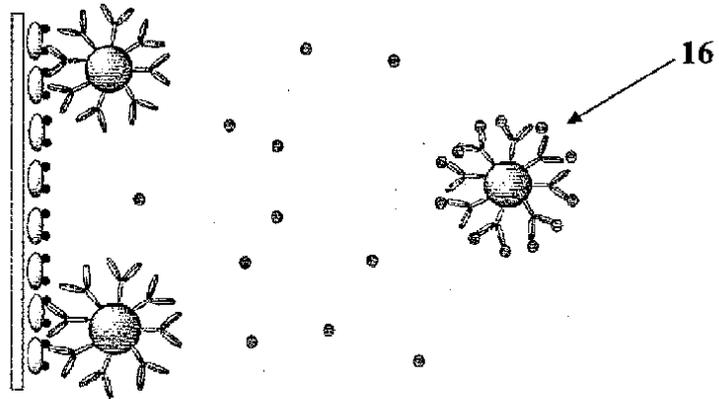


Fig. 3c

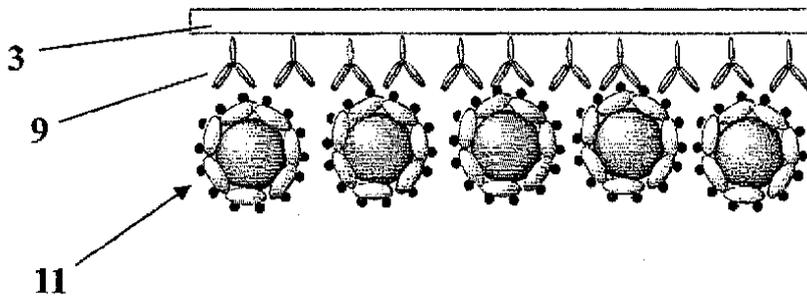


Fig. 4a

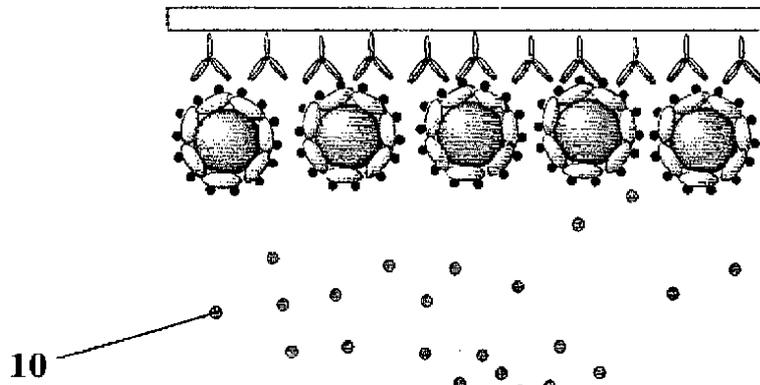


Fig. 4b

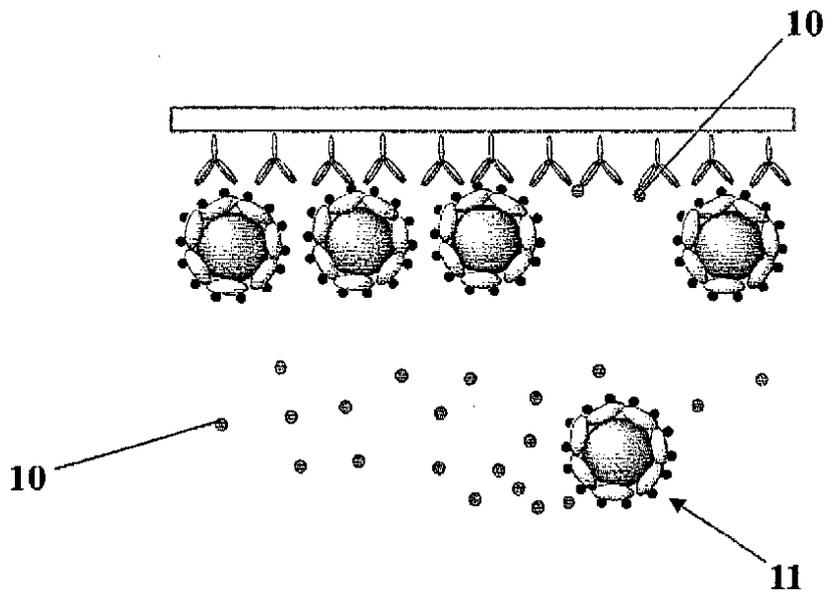


Fig. 4c

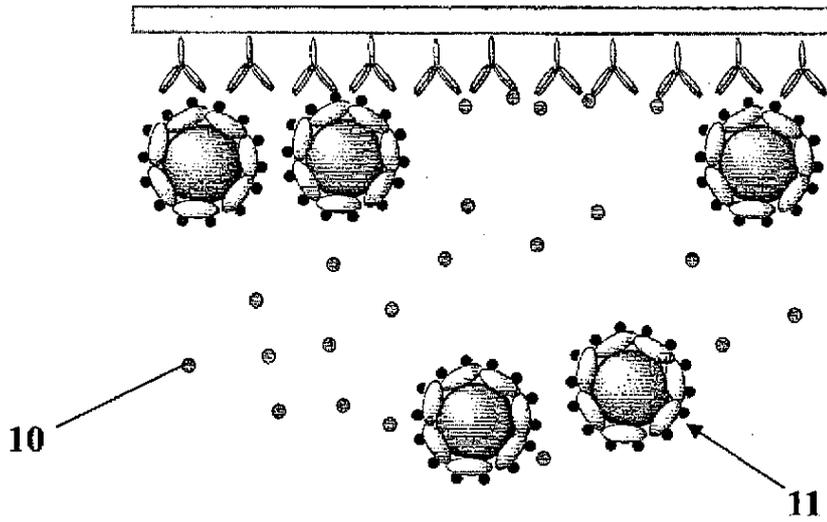


Fig. 4d

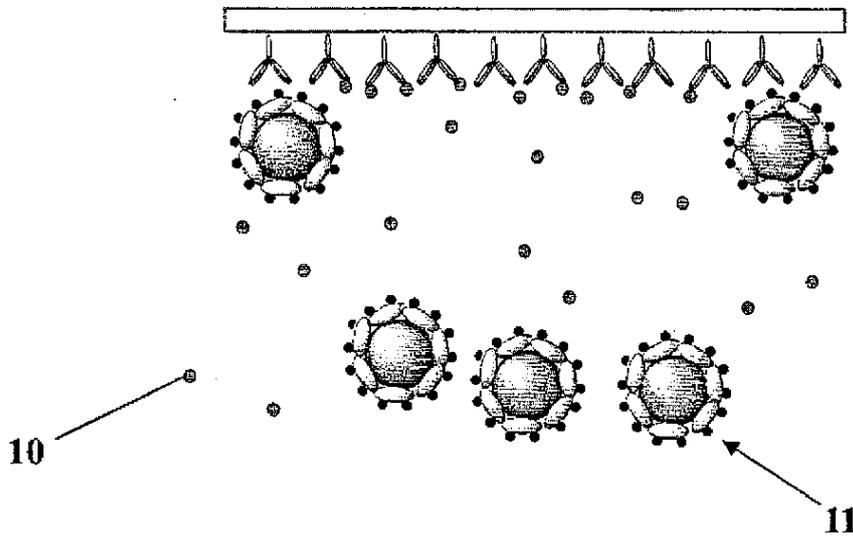


Fig. 4e

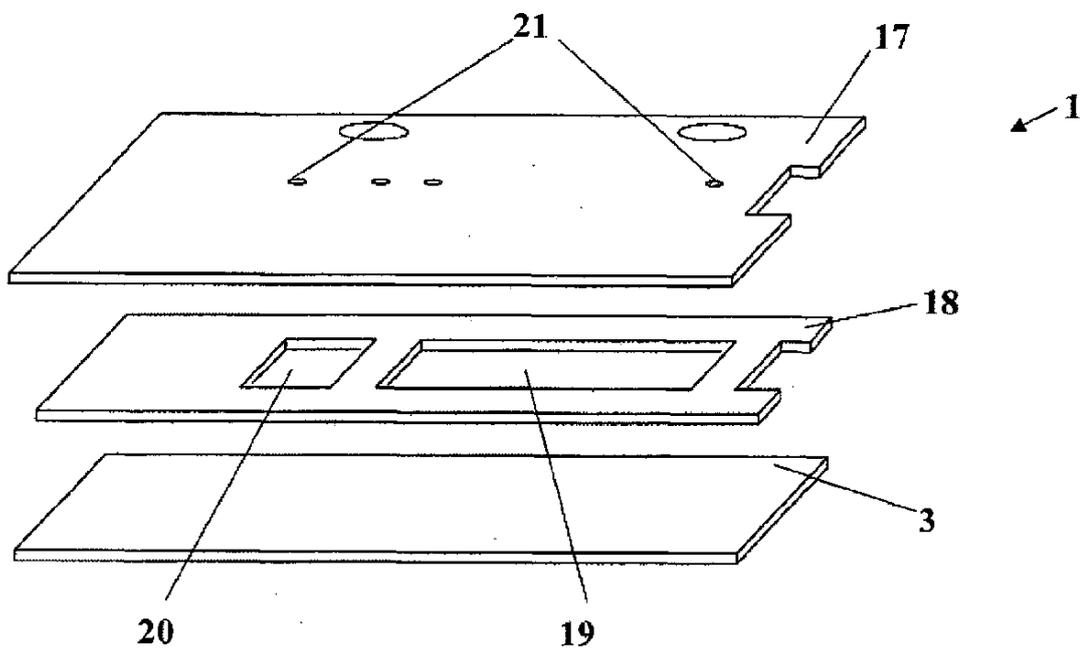


Fig. 5

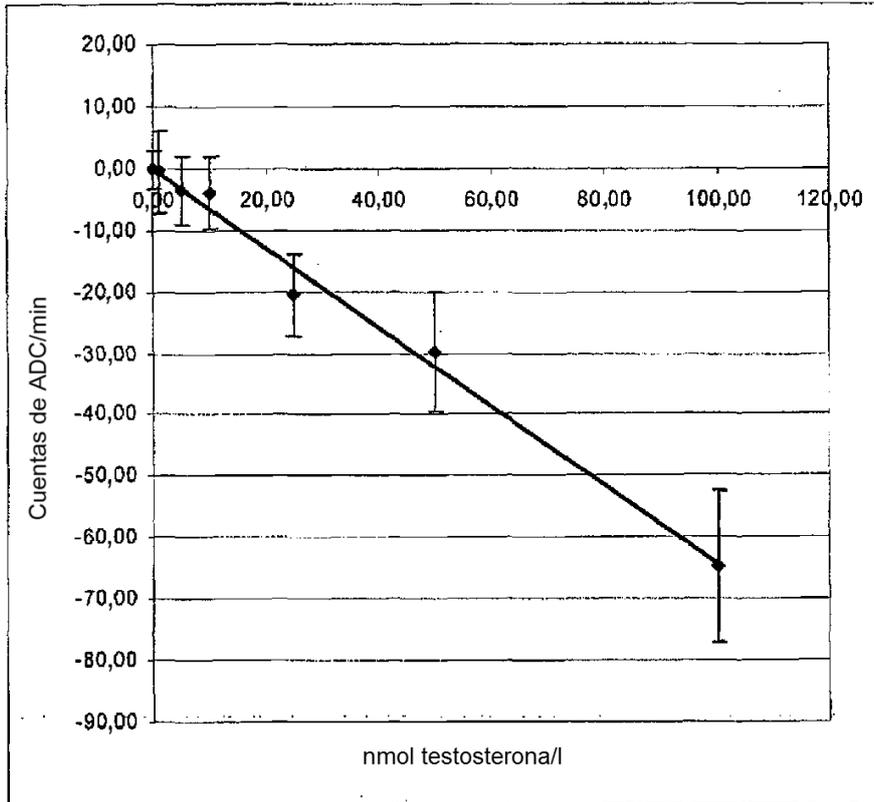


Fig. 6

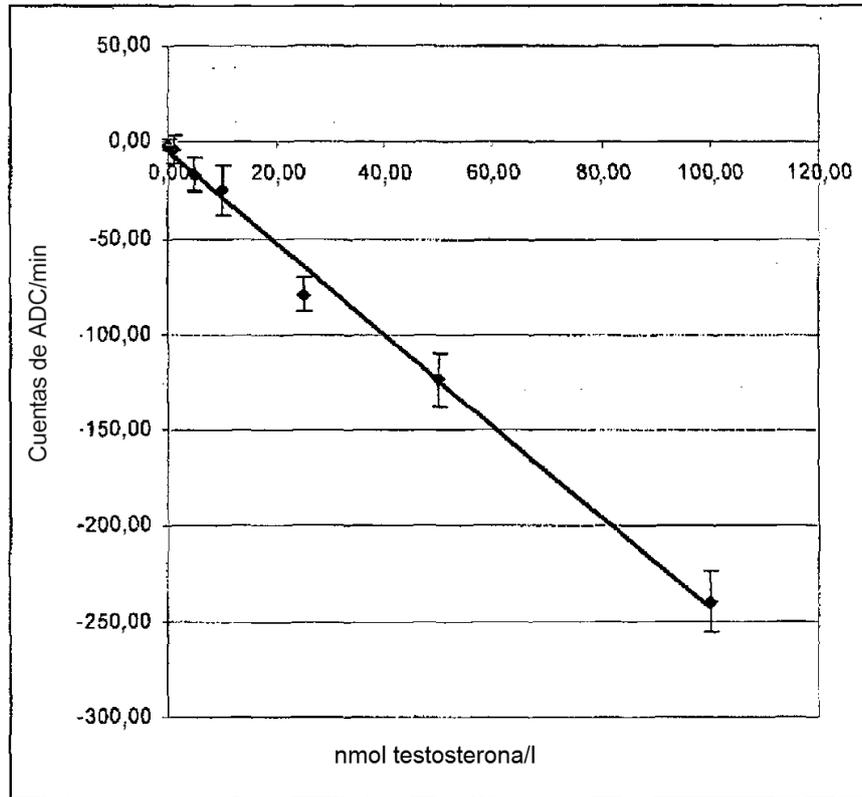


Fig. 7