

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 065**

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 09727395 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2265951**

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

30 Prioridad:

**02.04.2008 GB 0805950**

**02.04.2008 US 41823 P**

**16.09.2008 GB 0816924**

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

**17.02.2014**

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 2 443 065 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 una 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 anticuerpos policlonales o monoclonales, que tienen varios beneficios, incluyendo reproducibilidad de fabricación y contención de la unión de un epítipo de un analito. Con el fin de proporcionar una medición cuantificable de la concentración de analito, se compara la respuesta con muestras convencionales de concentración conocida. Se puede determinar la concentración del anticuerpo por medio de una variedad de métodos, aunque uno de los más comunes es marcar bien el antígeno o bien el 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 compite con el antígeno marcado para unirse a los anticuerpos, que normalmente se inmovilizan sobre una fase sólida. Posteriormente, se mide la cantidad de antígeno marcado unido al sitio del anticuerpo, normalmente por medio de separación y medición del antígeno marcado unido a la fase sólida. Claramente, la respuesta será inversamente proporcional a la concentración del antígeno en la muestra desconocida. En un principio de ensayo análogo, el anticuerpo marcado en disolución compite con un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida y que está presente en la muestra, aportando una proporcionalidad inversa similar. En un inmunoensayo no competitivo, también denominado como ensayo inmunométrico, el antígeno de la muestra desconocida se une a un exceso de anticuerpos inmovilizados (los anticuerpos de "captura") y se mide la cantidad de antígeno unido. A diferencia del método competitivo los resultados del método no competitivo son directamente proporcionales a la concentración del antígeno. En el denominado ensayo inmunométrico de "dos sitios", también denominado "ensayo sándwich", el antígeno se une al sitio del anticuerpo de captura, y posteriormente se introduce el anticuerpo marcado que se une al antígeno unido al anticuerpo de captura. A continuación, se mide la cantidad de anticuerpo marcado en el sitio.

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

45 Los inmunoensayos de este tipo funcionan particularmente bien para analitos de masa molecular grande, principalmente porque se pueden abordar dos o más epítopos; las áreas de complementariedad entre analito y anticuerpo son relativamente grandes y tienen lugar diferencias relativamente grandes entre los analitos, por ejemplo, en al menos un amino ácido de los péptidos. Con los inmunoensayos de moléculas pequeñas, la ausencia de dos epítopos prohíbe la formación de un "sándwich". Esto proporciona motivación para el desarrollo de técnicas adicionales.

50 Una técnica de inmunoensayo relativamente nueva es el denominado inmunoensayo de "anticuerpo anti-complejo" que está diseñada para mejorar la especificidad y la sensibilidad de detección de una molécula pequeña (véase C.H. Self y col., Clin. Chem. 1994, 40, 2035-2041; *ibid* 1994, 40, 2035-2041; y L.A. Winger y col., J. Immunol. Methods 1996, 199, 185-191). Este inmunoensayo también tiene la ventaja de que proporciona una relación directa entre la concentración de analito y la señal, en lugar de la relación inversa que comúnmente se aprecia en los inmunoensayos competitivos.

60 El protocolo se basa en la capacidad para aumentar los anticuerpos secundarios con respecto al complejo formado cuando el analito de molécula pequeña se une a un anticuerpo primario generado de forma específica que se inmoviliza (se une a) sobre un soporte. Por medio de la selección cuidadosa del segundo anticuerpo, se puede escoger la reactividad frente a un epítipo formado en la unión del anticuerpo primario y el antígeno. Por tanto, la unión al complejo es selectiva ya que el indicador marcado no se puede unir al anticuerpo de captura "no ocupado" o al analito libre ya que no se genera el epítipo hasta que tiene lugar el primer episodio de unión. Se ha comprobado que esto es muy sensible y específico pero, como actualmente se pone en práctica, requiere un número de etapas de lavado, del modo más importante para eliminar el exceso de marcador no unido antes de la determinación de la cantidad de analito marcado presente. Esto se suma significativamente a la complejidad del ensayo y limita sustancialmente la aplicabilidad de la técnica.

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

5 proporcionar 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, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, exponer la muestra al transductor, de manera que se permita que el analito o un derivado del analito se una al primer reactivo para formar un complejo primer reactivo-analito;  
 10 introducir un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente al complejo primer reactivo-analito, donde el segundo reactivo tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde se escoge el marcador a partir de una partícula de carbono, una partícula polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones;  
 15 irradiar la muestra con radiación electromagnética;  
 transducir la energía generada en una señal eléctrica; y  
 detectar la señal eléctrica.

20 De este modo, el segundo reactivo marcado (el indicador) puede únicamente unirse al complejo del primer reactivo (reactivo de captura inmovilizado) y al analito. No tiene lugar la unión del indicador a la superficie del transductor en ausencia del analito, como el inmunoensayo inmunométrico de dos sitios convencional. No obstante, en este caso el indicador únicamente requiere un epítipo individual (generado a partir del complejo analito-primer reactivo) en lugar de los dos requeridos para el ensayo de sándwich convencional, lo que facilita de este modo la detección de una molécula pequeña. Como resultado del uso de un transductor que tiene una película piezo/piroeléctrica, se logra el beneficio de ser capaz de detectar la unión del segundo reactivo (marcado) en tiempo real sin etapas de separación y lavado.

30 La presente invención también proporciona un estuche que comprende: (i) un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, una fuente de radiación electromagnética, y un detector para detectar la señal eléctrica; y (ii) un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente a un complejo formado entre el primer reactivo y el analito o el derivado del analito, donde el segundo reactivo tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por medio de la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcador está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula polimérica colorada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones.

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

45 La Figura 1 es un dispositivo de acuerdo con el documento WO 2004/094512;  
 La Figura 2 muestra una representación esquemática del método de la presente invención;  
 La Figura 3 muestra un dispositivo de acuerdo con la presente invención; y  
 La Figura 4 muestra un gráfico de cuentas frente a tiempo, usando el método de la presente invención.

50 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 unida al 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 unida al transductor. La longitud de onda de iluminación depende del marcador usado; por ejemplo, para marcadores de oro de 40 nm la longitud de onda preferida es de 525 nm y para marcadores de carbono la longitud de onda es de 650 nm.

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 de manera ventajosa en determinadas situaciones. 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. Los solicitantes han 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 donde se detecta un máximo de señal eléctrica que corresponde a la absorción de calor por parte del detector 7.

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 la incorporación del dispositivo 1 de la Figura 1 en un inmunoensayo de anti-complejo de acuerdo con la presente invención. El transductor 3 se muestra en un dispositivo vertical, aunque son posibles otras orientaciones e incluso son ventajosas en determinadas circunstancias. 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). La muestra también contiene un analito 10 y un segundo anticuerpo 11 unido a un marcador 12 (que corresponde a la sustancia 2 de la Figura 1).

El primer reactivo 9 tiene un sitio de unión (un paratopo) que es capaz de unirse al analito 10 o un derivado del analito. El analito o un derivado del analito se une al primer reactivo para formar un complejo primer reactivo-analito. Se forma una región (epitopo) en el complejo primer reactivo-analito por medio de la unión del primer reactivo al analito 10 o uno de sus derivados. El segundo reactivo 11 tiene un sitio de unión (paratopo) que es capaz de unirse selectivamente a la región formada de este modo sobre el complejo primer reactivo-analito y además cuando se añade el segundo reactivo 11, se une al complejo. La unión es selectiva porque la región formada en el complejo primer reactivo-analito no está presente hasta que tiene lugar el primer episodio de unión. En una realización

preferida, se introducen simultáneamente la muestra y el segundo reactivo.

El primer anticuerpo 9 se ha generado contra el analito 10 y se une selectivamente al analito 10 cuando se introduce la muestra. Por medio de la elección cuidadosa del segundo anticuerpo 11, se puede escoger la reactividad contra un epítipo formado en la unión del primer anticuerpo 9 y el analito 10, es decir, el segundo reactivo 11 tiene un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente al complejo 13 primer reactivo-analito. De este modo, el segundo anticuerpo 11 puede únicamente unirse al complejo 13 del primer anticuerpo 19 y el analito 10. No puede tener lugar unión alguna del segundo anticuerpo 11 en ausencia del analito 10 y además la señal obtenida a partir del marcador 12 unido al segundo anticuerpo 11 es directamente proporcional a la concentración de analito. No obstante, debido a que el segundo anticuerpo 11 reconoce un epítipo en el complejo, el ensayo no requiere que estén presentes dos epítopos separados en el analito 10, lo que facilita la detección de moléculas pequeñas. De manera importante, el método de la presente invención permite la detección de la unión del segundo anticuerpo 11 al complejo 13 primer reactivo-analito en tiempo real, sin etapas de separación o 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 entre las etapas de exposición de la muestra al transductor 3 e irradiación de la muestra. Además, no se requiere intervención adicional (por ejemplo, para separar el segundo reactivo unido y no unido) entre la exposición del transductor a la muestra y la irradiación de la muestra.

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

Aunque el primer y segundo reactivos se ejemplifican en la Figura 2 por medio de un primer y segundo anticuerpo, la presente invención no está limitada a ello. De este modo, aunque el primer y segundo reactivos son preferentemente anticuerpo, también se pueden usar otros anticuerpos, tales como ácidos nucleicos. En una realización preferida, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo un inmunoensayo de anticuerpo anti-complejo para detectar un analito (en ocasiones denominado como "hapteno", que es una molécula pequeña que, cuando se une a un vehículo grande tal como una proteína, puede exhibir una respuesta inmunológica) en una muestra, que comprende las etapas de: proporcionar 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 anticuerpo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer anticuerpo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, exponer la muestra al transductor permitiendo, de este modo, que el analito o un derivado del analito se una al primer anticuerpo para formar un complejo primer anticuerpo-analito; introducir un segundo anticuerpo, teniendo el segundo anticuerpo un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente al complejo primer reactivo-analito, donde el segundo anticuerpo tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber radiación electromagnética para generar energía por medio de desintegración no radiativa; irradiar la muestra con radiación electromagnética; transducir la energía generada en una señal eléctrica; y detectar la señal eléctrica. El primer anticuerpo se genera con respecto al analito o uno de sus derivados, y el segundo anticuerpo se genera con respecto al complejo, de manera que contiene un epítipo presente en el complejo formado entre el primer anticuerpo y el analito o uno de sus derivados, pero no está presente ni el primer anticuerpo ni el analito/uno de sus derivados cuando se toma por separado.

El primer reactivo 9 se muestra en la Figura 2 unido a 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, Stabilcoat de SurModies Inc, Eden Prairie, MN, EE.UU.

Como se ha comentado con referencia a la Figura 2, el segundo reactivo 11 tiene un marcador 12 unido al mismo. El marcador 12 es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa. De este modo, para detectar la presencia del marcador 12 en situación proximal con respecto al transductor 13, 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 el detector 7.

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

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

US 6.344.272 y el documento WO 2007.141581. Las partículas de carbono están comercialmente disponibles, por ejemplo, a partir de Degussa, Essen, Alemania y los métodos para su conjugación con proteínas y moléculas pequeñas se conocen en la técnica, por ejemplo, por medio de Van Doom y col. (documento US 5641689).

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

10 El marcador 12 está en 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 medio del marcador tras la irradiación de la muestra. La distancia actual entre el marcador y la superficie del transductor, no obstante, depende de un número de variables, tales como el tamaño y la naturaleza del marcador, el tamaño y la naturaleza del primer y segundo anticuerpos y el analito, la naturaleza del medio de muestra, y la naturaleza de la radiación electromagnética y los correspondientes ajustes 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 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, 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.

20 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 30 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.

35 La muestra que puede o no contener el analito de interés generalmente es una muestra de fluido y normalmente una muestra biológica (además acuosa), tal como un fluido corporal, por ejemplo, sangre, plasma, saliva, suero u orina. La muestra puede contener partículas suspendidas y puede incluso ser 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  $\mu$ l, preferentemente 1-10  $\mu$ l). Con el fin de mantener una muestra fluida, preferentemente el transductor se encuentra ubicado en una cámara de muestra y más preferentemente un pocillo. En una realización preferida, el transductor está integrado con la cámara, es decir, forma una de las paredes que definen la cámara. La muestra simplemente puede quedar retenida por las fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro del conducto capilar.

45 La presente invención también proporciona un estuche para llevar a cabo el ensayo descrito en la presente memoria. El estuche comprende un dispositivo para detectar un analito en una muestra sustancialmente como se ha descrito con referencia la Figura 1. El dispositivo comprende 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, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, una fuente de radiación electromagnética y un detector para detectar la señal eléctrica. El estuche comprende además el segundo reactivo. En una realización preferida, el segundo reactivo se una de forma que se puede liberar a una de las superficies interiores de la cámara antes de su uso. Por unido de forma que se puede liberar se entiende que el segundo reactivo se une a la superficie, por ejemplo, secándose sobre la superficie, pero se libera cuando se introduce la muestra. En una realización preferida, el dispositivo consiste esencialmente en las características descritas anteriormente. Por "esencialmente" se entiende que no se requieren otras características para llevar a cabo el ensayo.

60 El dispositivo puede adoptar la forma de lector portátil manual y 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.

65 La presente invención además proporciona el uso de un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos para detectar un episodio de unión en un inmunoensayo de anticuerpo anti-complejo. El inmunoensayo de anticuerpo de anti-complejo es el ensayo que implica la unión del segundo anticuerpo al complejo

del primer anticuerpo y el analito o derivado del analito.

### Ejemplos

#### 5 Ejemplo 1

Preparación de biosensores activos de piezo/piropelícula

10 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 los siguiente ejemplos, 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 µg/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).

15 Para preparar una superficie "de captura" se incubó la superficie de poliestreptavidina con antitestosterona (M1) sometida a tratamiento con biotina, proporcionando una superficie revestida con anticuerpo (C1). Se incubaron 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 # 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.

#### 25 Ejemplo 2

Preparación de anticuerpos secundarios

30 Se generaron anticuerpos (M2) monoclonales secundarios, reactivos contra el complejo anticuerpo (M1)-testosterona esencialmente como se describe en C.H. Seffl y col, Clin. Chem. 1996, 42, 1527-1531 y se sometió a tratamiento con biotina por medio de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se prepara una disolución de anticuerpo de 5 mg/ml en PBS (NaCl 150 mmol/l, fosfato 20 mmol/l, pH 7,5) por medio de disolución de anticuerpo liofilizado, o por medio de dilución. Si esta disolución contiene otras proteínas o Tris u otros agentes interferentes, se purifica por medio de diálisis o filtración de gel. Posteriormente, se prepara una disolución de NHS-biotina a 20 mmol/l en DMSO anhidro y se añaden 15 µl de la disolución de NHS-biotina al anticuerpo (1 ml). Se incubaba durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se somete a diálisis el anticuerpo contra PBS que contiene azida de sodio (un 0,01 %). Se puede diluir el anticuerpo sometido a tratamiento con biotina hasta 1 mg/ml con azida de sodio de un 0,1 % y un 20 % de glicerol, para el almacenamiento a -20 °C o + 4 °C. El nivel de tratamiento con biotina debería estar dentro del intervalo de 1-3 biotinas por IgG. Esto se puede estimar por medio de cuantificación de las biotinas o para tasas elevadas de tratamiento con biotina, por medio de la cuantificación de aminos.

#### 40 Ejemplo 3

Preparación de conjugados de indicador

45 Se prepararon conjugados de indicador marcados con carbono esencialmente como se describe por parte de Van Doom y col. (documento US 5.641.689). Para preparar los conjugados (R1) de indicador revestido con anticuerpo, se incubó 1 ml de partículas de carbono de 15 nm Special Black-5 RCC (Degussa, Essen, Alemania) en tampón de fosfato de 5 mmol/l, pH 6,2 con 200 µg/l de disolución de poliestreptavidina durante la noche a temperatura ambiente con agitación, dando como resultado una superficie revestida con estreptavidina (A1). Se lavó el conjugado de carbono resultante (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión). A continuación, se incubaron 10 µg/ml de anticuerpos (M2) monoclonales secundarios sometidos a tratamiento con biotina, reactivos frente al complejo anticuerpo de captura (M1)-testosterona, en PBS durante la noche con 1 ml de suspensión de partículas de carbono revestidas con estreptavidina con agitación. Se lavó el conjugado de carbono resultante (C2) (por medio de centrifugación, formación de microgránulos y resuspensión) 3 veces con tampón de borato de 0,05 mol/l a pH 8,5 y se almacenó en este tampón en la oscuridad a 4 °C.

#### 55 Ejemplo 4

60 Ensayo - Sensor piezo/piropelícula revestido de anticuerpo

65 Como se muestra en la Figura 3, se fabricó un sensor 1 para llevar a cabo el ensayo. Se fabrica el sensor 1 a partir de una piezopelícula 3 revestida con anticuerpo (C1, descrito en la presente memoria anteriormente) y una pieza de policarbonato transparente que bordea la película 14. Las películas se separan una distancia de aproximadamente 500 micras usando un espaciador 15 formado por una pieza de película de poliéster revestida con adhesivo sensible a la presión cortada con troquel para formar dos cámaras 16, 17 de tamaño desigual; una cámara 16 de

dimensiones aproximadas de 30 x 10 x 0,5 mm para la reacción de ensayo y una segunda cámara 17 más pequeña de dimensiones 10 x 10 x 0,5 cm para una reacción de control. La provisión se lleva a cabo de forma que se permitan las conexiones eléctricas con las superficies superior e inferior de la piezopelícula con el fin de detectar la carga generada.

5 Los ensayos se llevan a cabo por medio de llenado de la cámara grande 16 (a través del orificio de llenado 18) con una mezcla de 0:1 mol/l de tampón Tris, que contiene 0,150 mol/l de MgCl<sub>2</sub> y un 0,075 % de disolución de Tween  
10 20, que contiene partículas de carbono coloidales de 150 nm (a una concentración final de un 0,0025 % de sólidos) revestidas con anticuerpo sometido a tratamiento con biotina (C2, como se ha descrito anteriormente en la presente memoria), reactivo frente al complejo anticuerpo de captura (M1)-testosterona, y patrones de testosterona en PBS para proporcionar un intervalo de concentración final de 0,1-100 nmol/l. Se llena simultáneamente la cámara de control 17 con una mezcla de reacción idéntica a la de la cámara de ensayo con el patrón de testosterona sustituido con PBS. Se sellan la entrada y la salida y se conecta el dispositivo de cámaras a un instrumento de ensayo de  
15 manera que la piezopelícula 3 esté orientada verticalmente 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 diferentes áreas de la superficie de la cámara de ensayo y uno ilumina la superficie de la 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 conversor de analógico a digital (ADC). Se representa la señal ADC con el tiempo y la Figura 4 muestra la relación de cuentas de ADC/min frente a la concentración de testosterona.  
20



## REIVINDICACIONES

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

5 proporcionar 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, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, exponer la muestra al transductor permitiendo de este modo que el analito o un derivado del analito se unan al primer reactivo para formar un complejo primer reactivo-analito;

10 introducir un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente al complejo primer reactivo-analito, donde el segundo reactivo tiene un marcador unido al mismo que es capaz de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por medio de desintegración no radiativa, donde el marcador está seleccionado entre una partícula de carbono, una partícula de polímero coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones;

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 y segundo reactivos son anticuerpos.

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

4. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, donde la el transductor está ubicado en una cámara de muestra.

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

6. Un método como se reivindica en la reivindicación 6, donde la muestra es sangre.

7. 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.

8. 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 e irradiación de la muestra .

9. Un estuche que comprende: (i) un dispositivo para detectar un analito en una muestra que comprende un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos que es capaz de transducir un cambio de energía en una señal eléctrica, un primer reactivo inmovilizado sobre el transductor, teniendo el primer reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse al analito o un derivado del analito, una fuente de radiación electromagnética y un detector para detectar una señal eléctrica; y (ii) un segundo reactivo, teniendo el segundo reactivo un sitio de unión que es capaz de unirse selectivamente a un complejo formado entre el primer reactivo y el analito o el derivado del analito, donde el segundo reactivo 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 polimérica coloreada, una molécula de colorante, una enzima, una molécula fluorescente, una partícula metálica, una molécula de hemoglobina, una partícula magnética, una nanopartícula que tiene un material de núcleo no conductor y al menos una capa de cubierta metálica, un eritrocito y sus combinaciones.

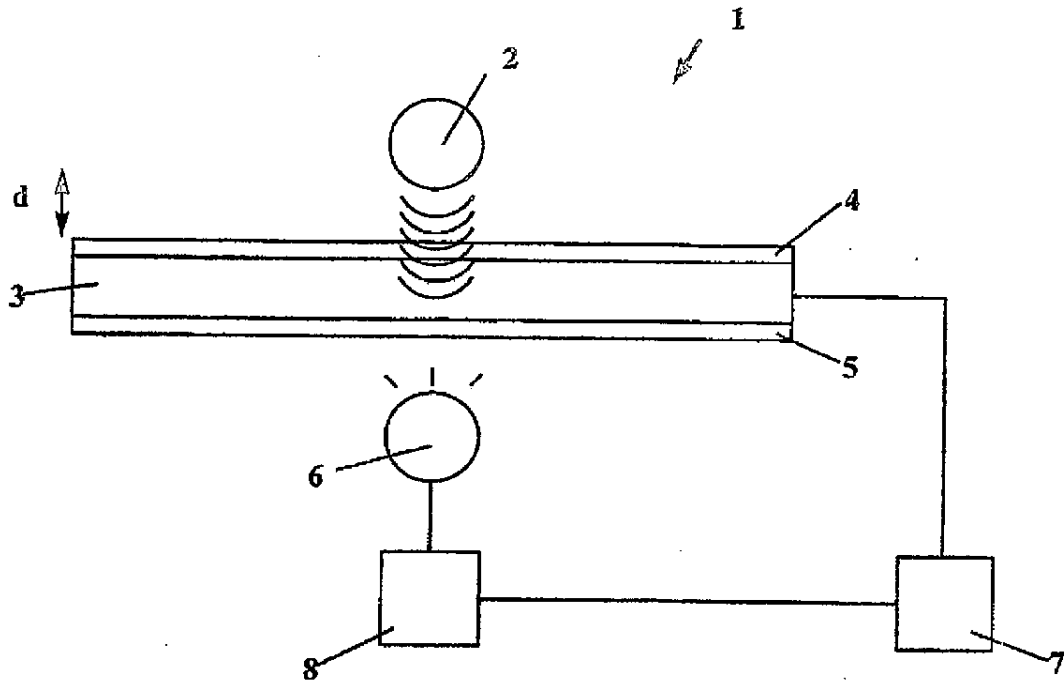
10. Un estuche como se reivindica en la reivindicación 9, donde el primer y segundo reactivos son anticuerpos.

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

12. Un estuche como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde el dispositivo además comprende una cámara de muestra y el transductor está ubicado en la cámara de muestra.

13. Un estuche como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, 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.



**Fig. 1**

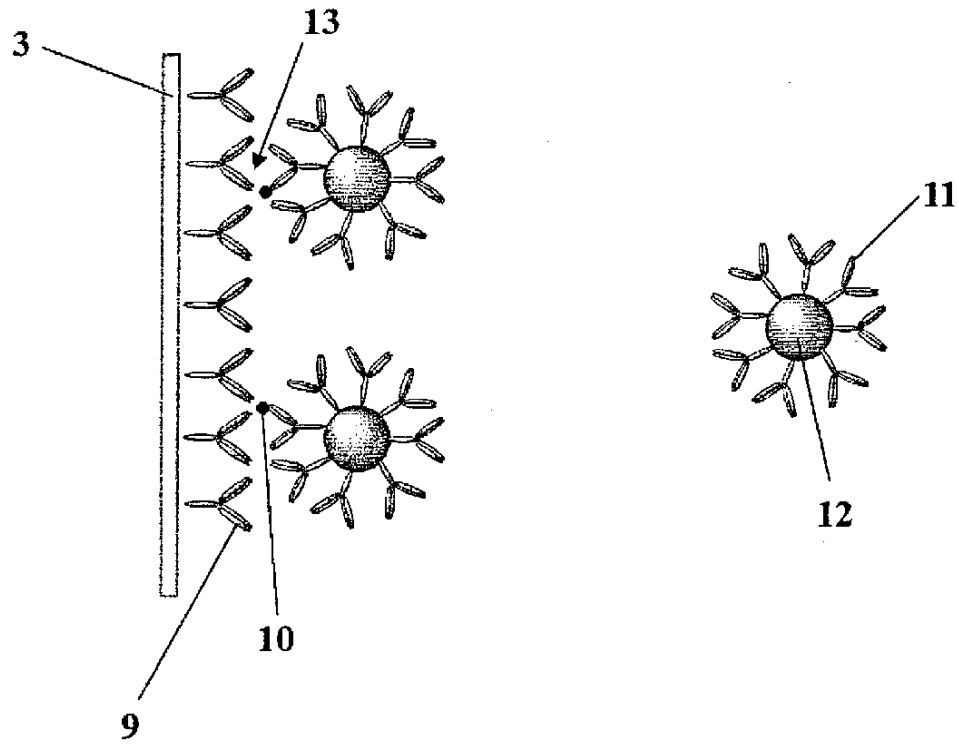
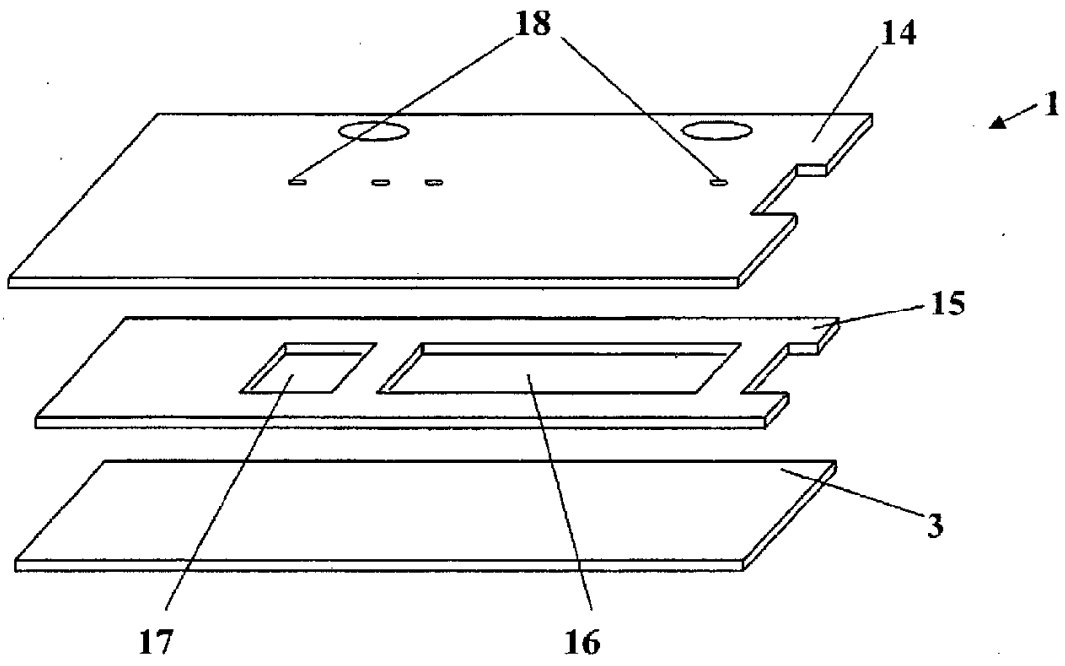
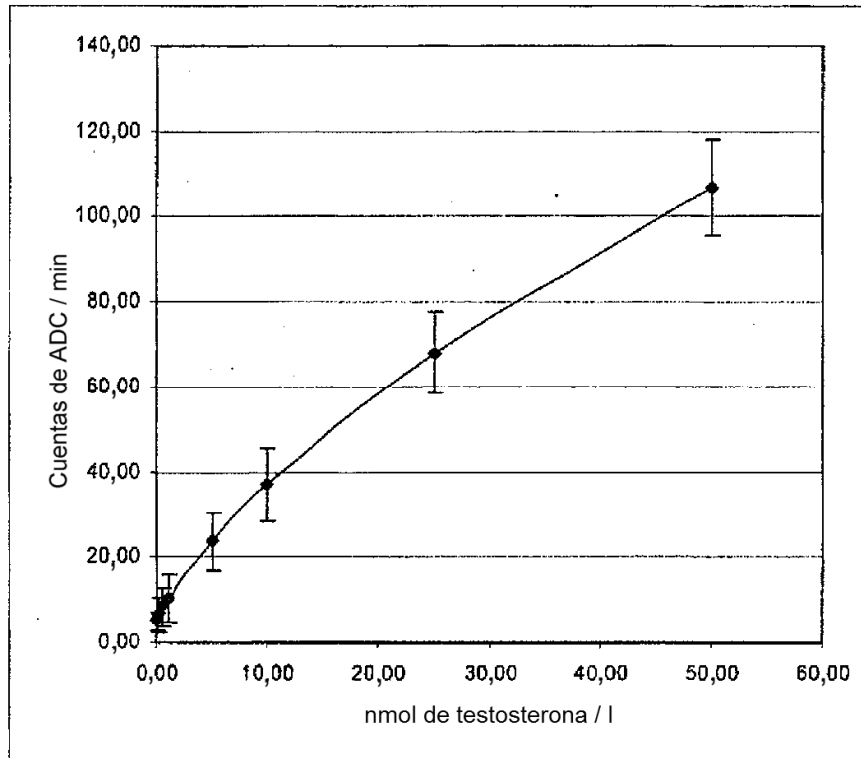


Fig. 2



**Fig. 3**



**Fig. 4**