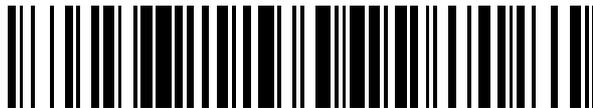


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 790**

21 Número de solicitud: 201330398

51 Int. Cl.:

G01N 33/534 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.03.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.09.2014

71 Solicitantes:

DROPSSENS, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Asturias - Edif. CEEI
33428 Llanera (Asturias) ES

72 Inventor/es:

HERNÁNDEZ SANTOS, David;
FANJUL BOLADO, Pablo y
ORDAX IBÁÑEZ, Mónica

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **Procedimiento para la detección magneto-electroquímica sin lavados de un analito en una muestra**

57 Resumen:

La invención describe un procedimiento rápido, simple y eficaz para la detección magneto-electroquímica de un analito en una muestra eliminando todo paso de lavado, que comprende la incubación de dicha muestra en presencia de partículas magnéticas y de un elemento de reconocimiento ligado a un enzima en que dicho elemento de reconocimiento y dichas partículas magnéticas son capaces de interaccionar independientemente con dicho analito, la aplicación del electrodo al resultado de esta etapa de incubación en presencia de al menos un imán, la adición de un sustrato electroquímico de dicho enzima para obtener un compuesto con capacidad óxido-reductora, la medición electroquímica en la superficie del electrodo de dicho compuesto con capacidad óxido-reductora o de al menos un producto de una reacción redox generada por dicho compuesto en presencia de los componentes de la muestra, los reactivos añadidos en la incubación y del sustrato electroquímico, y la determinación de la presencia del analito evaluando el resultado de la etapa anterior respecto de una referencia.

ES 2 498 790 A1

DESCRIPCIÓN**PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN MAGNETO-ELECTROQUÍMICA SIN
LAVADOS DE UN ANALITO EN UNA MUESTRA**

5

Campo de la Invención

La presente invención refiere a un método para la detección de un analito de tipo biológico y/o químico con aplicación en sensores electroquímicos y nanotecnología en los campos de clínica y biomedicina, bioseguridad e higiene, ambiental, agroalimentario, industrial, farmacológico y biotecnológico en general.

10

Antecedentes

Los ensayos de afinidad han sido ampliamente utilizados para la detección y cuantificación de analitos por su especificidad, sensibilidad y versatilidad. Se basan en la utilización de elementos de reconocimiento dirigidos a la captura del componente de interés analítico de una muestra, o analito. Resulta además imprescindible el uso de indicadores que señalen que las reacciones de reconocimiento implicadas en el ensayo de afinidad han transcurrido con éxito. Para ello se utilizan “marcas” o reactivos ya marcados, destacando el uso de enzimas debido a su simplicidad, potencialidad y la alta sensibilidad que ofrecen en el desarrollo de metodologías analíticas.

15

20

Entre los enzimas más utilizados en la técnica como marcaje se encuentra la fosfatasa alcalina (AP), gracias a su constante tasa de reacción durante prolongados períodos de tiempo y a la formación de conjugados marcados estables. Existe una amplia variedad de sustratos cromogénicos, fluorogénicos y quimioluminiscentes disponibles para este enzima.

25

Una de las vías más recientes de aplicación del enzima AP en analítica surgió con la utilización de sustratos electroquímicos como el 3-indoxil fosfato (3-IP). Su hidrólisis por el enzima AP genera un compuesto indoxílico intermedio que actúa como agente reductor. De esta forma y como se ilustra en la Fig.1, la utilización conjunta del 3-IP con una fuente de plata en forma iónica (Ag^+) en presencia de AP provoca la formación simultánea de plata metálica (Ag^0) (P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, M.B. González-García, A. Costa-García, Anal. Chem., 2007, 79, 5272-5277). Esta plata metálica precipita y se deposita en las zonas adyacentes al marcaje.

30

35

El uso de ensayos de afinidad se ha visto limitado en múltiples ocasiones por la imperiosa necesidad de obtener resultados rápidos para un elevado número de muestras, por motivo de diagnóstico y/o bioseguridad. En consecuencia, han ido cobrando gran importancia los métodos de alto caudal y rendimiento que permitan a los laboratorios la realización de rastreos intensivos de manera rápida y fiable. Surgen entonces en el mercado todo un abanico de kits analíticos que aprovechan distintas tecnologías para aportar rapidez y sencillez de análisis. No obstante, se mantienen en ellos una serie de etapas de lavado que requieren un cierto nivel de manipulación y suponen un consumo relevante de tiempo. Esta es una de las principales limitaciones que presentan los ensayos de afinidad, en general.

Los lavados juegan un papel clave en el éxito analítico de un ensayo ya que minimizan las posibles reacciones inespecíficas, al tiempo que facilitan las reacciones de reconocimiento. Su limitación reside en la operatividad, ya que suponen el grueso del consumo de tiempo y carga de trabajo del ensayo.

Entre las metodologías analíticas que han conseguido alcanzar con éxito la eliminación de lavados se encuentran las técnicas "FPIA" o "Fluorescent Polarization Immunoassay" (Abbott Laboratories, ILL, USA; Enzo Life Sciences Inc., NY, USA; BMG LABTECH GmbH, Germany; K. Nielsen, D. Gall, J. Immunoassay Immunochem., 2001, 22, 183-201), la "MSD-ECL" o "Meso Scale Discovery Electrochemiluminescence" (Meso Scale Diagnostics, Llc, MD, USA; I. Thompson, J. McGiven, J. Sawyer, R. Thirlwall, N. Commander, J. Stack, Clin. Vaccine Immunol., 2009, 16, 765-771), y la "AlphaLISA" o "Amplified Luminiscent Proximity Homogeneous Assay" (PerkinElmer Inc., MA, USA; M. Bielefeld-Sévigny, Assay Drug Dev. Technol., 2009, 7, 90-92).

Por otro lado, en los últimos años se ha aprovechado el magnetismo y sus propiedades para llevar a cabo reconocimientos y lavados de manera eficaz, simple y rápida. Existe en la técnica una amplia gama de partículas magnéticas (MBs) de diferentes cuerpos magnéticos, tamaños, recubrimientos y funcionalizaciones, que juegan un importante papel en los ensayos de afinidad ya que pueden comprender elementos de reconocimiento de afinidad universal como proteínas A o G, estreptavidina, o grupos químicos como carboxilo o tosilo; y/o elementos de alto reconocimiento específico como anticuerpos o sondas de ADN.

El uso de MBs aporta una serie de ventajas por sus propiedades como microesferas magnéticas de baja toxicidad y alta biocompatibilidad:

- elevada superficie activa para la captura del analito;
- facilitación de las reacciones de afinidad al transcurrir en suspensión en lugar de en una fase sólida;
- incremento de penetrabilidad en la matriz de la muestra, permitiendo un mayor acceso al analito;
- versatilidad en cuanto a los posibles volúmenes de muestra a analizar, entre microlitros y litros; y
- facilidad, eficacia y control en la ejecución de los sucesivos pasos de afinidad y etapas de lavado mediante la aplicación externa de campos magnéticos regulados ya sea de manera manual o incluso automatizada.

Estas características son las responsables de que los ensayos de afinidad magnéticos resulten métodos rápidos, sencillos y fiables. El uso de MBs se ha extendido a todo tipo de ensayos de afinidad, separaciones celulares y/o purificaciones sean éstos de carácter inmunológico, genético o proteico, con fines de diagnóstico o terapéuticos, y empleando todo tipo de marcas, si bien las de carácter lumínico o enzimático son las más frecuentes.

El aprovechamiento de las propiedades magnéticas de las MBs supuso una notable ganancia en la rapidez, operatividad y eficacia de los lavados. Así, la técnica ha desarrollado numerosos sistemas de flujo continuo y equipos de lavado automatizados con el objeto de disminuir al máximo el tiempo invertido y el grado de participación del usuario, aunque a cambio de elevados costes de adquisición y/o mantenimiento (G. Wu, *Assay Development: Fundamentals and Practices*, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA, 2010). No se consiguió su total supresión hasta fechas recientes.

Entre el grupo de técnicas sin lavado que emplean MBs están la “xMAP” o “Luminex Multianalyte Profiling” (Luminex Co., TX, USA; RT. Carson, D.A.A. Vignali, *J. Immunol. Methods.*, 1999, 227, 41-52), la “FRET” o “Fluorescence Resonance Energy Transfer” (Life Technologies Ltd., UK; BioTek, VT, USA; Innova Biosciences Ltd., UK; S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Akimoto, K. Kikuchi, 2012, *J. Am., Chem., Soc.*, 134, 1623-1629), y finalmente la “Nanoplex Direct” de reciente aparición (Oxonica, CA, USA; Becton Dickinson & Co., NJ, USA).

Todas estas tecnologías de “no lavado” existentes en la técnica, utilicen o no el magnetismo, se basan en un sistema de detección de tipo óptico. Son sistemas de fluorescencia, espectrofotometría o de quimioluminiscencia. Ello supone un coste significativo no sólo en cuanto al equipo de medición, sino también en los propios reactivos marcados con moléculas luminiscentes, espectro-activas o fluorescentes, e incluso en el material accesorio, ya que muchos de los plásticos de uso frecuente en laboratorio son autofluorescentes. Además, toda tecnología basada en la emisión de luminiscencia y fluorescencia presenta una serie de inconvenientes metodológicos que se acentúan cuando se suprimen los lavados. El más común de ellos es su elevada susceptibilidad a múltiples condiciones ambientales, que puede reducir o aumentar la señal inespecíficamente ocasionando falsos resultados tanto positivos como negativos. También son numerosos los interferentes físico-químico-biológicos de la matriz de una muestra que pueden influir en la dispersión de la luz y/o emitir un cierto grado de luminiscencia de forma basal, y existen ciertas limitaciones en la muestra en cuanto al tamaño del analito y/o su complejidad por su influencia en la orientación y reactividad de las moléculas luminiscentes empleadas como “marca”. Incluso el propio analista es un factor relevante en la consecución exitosa, reproducible y fiable de este tipo de técnicas lumínicas, siendo significativo en el resultado final su experiencia y destreza.

El problema que plantea la técnica por tanto es encontrar un sistema de análisis sin lavados que evite los inconvenientes de la detección óptica. La solución que aporta la presente invención es un procedimiento magneto-electroquímico que comprende la medición de la capa sólida de un producto redox sobre la superficie de un electrodo y que optimiza la eficacia de la detección, haciendo prescindibles dichas etapas de lavado.

Descripción

La presente invención es un procedimiento analítico magneto-electroquímico que permite la total eliminación de etapas de lavado en la detección de un analito.

La preparación previa del analito dependerá de las características físico-químico-biológicas de la muestra. El analito podrá adicionarse directamente embebido en la matriz o, en muestras que presenten alguna complejidad o dificultad operativa, irá contenido en una disolución reguladora, medio de cultivo o solución de cualquier tipo

de acuerdo a procedimientos previos de enriquecimiento, concentración, filtración, purificación, extracción y otros similares.

5 La invención es un procedimiento para la detección magneto-electroquímica sin lavados de un analito en una muestra, que comprende las etapas de: incubación de dicha muestra en presencia de partículas magnéticas (MBs) y de un elemento de reconocimiento ligado a un enzima, en que dicho elemento de reconocimiento y dichas partículas magnéticas son capaces de interactuar independientemente con dicho analito; aplicación del electrodo al resultado de esta incubación en presencia de un imán; adición de un sustrato electroquímico de dicho enzima para obtener un compuesto con capacidad óxido-reductora; medición electroquímica sobre la superficie del electrodo de dicho compuesto con capacidad óxido-reductora o de al menos un producto de una reacción redox generada por dicho compuesto en presencia de los componentes de la muestra, los reactivos añadidos en la incubación y del sustrato electroquímico; y determinación de la presencia del analito evaluando el resultado de la etapa anterior respecto de una referencia. En una realización más restrictiva de la invención el procedimiento consiste en las etapas descritas.

20 La invención comprende la posibilidad de añadir otras etapas de incubación, otro tipo de reactivos, un número determinado de absorciones tras cada incubación, adición de aceleradores o inhibidores de reacciones químicas en el electrodo o aplicación de un pre-tratamiento electroquímico previo a la medición.

25 En el alcance de la presente invención se define "muestra", típicamente una muestra química o preferiblemente biológica, como una unidad de dosificación extraída del entorno que entre sus componentes puede contener el analito a detectar. La definición comprende muestras positivas, muestras sospechosas de contener dicho analito, análisis rutinarios y rastreos analíticos intensivos con carácter de inspección que incluyen muestras susceptibles de contener el analito pero asintomáticas. En una realización más preferible de la invención, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, suero o plasma, o bien un cultivo o enriquecimiento bacteriano.

35 En el alcance de la presente invención se define "enriquecimiento bacteriano" como el cultivo de las bacterias de interés en caldos de elevada riqueza nutritiva y/o selectiva con ingredientes que propician un elevado crecimiento y/o componentes químicos que

inhiben o dificultan el crecimiento de ciertos microorganismos que pudieran actuar como interferentes.

5 En el alcance de la presente invención se define "partículas magnéticas" o MBs como partículas esencialmente esféricas de naturaleza magnética. Pueden ser nanopartículas (< 1 μm diámetro) o micropartículas (1-1000 μm diámetro), y pueden presentar típicamente un recubrimiento con activadores de interacción y/o elementos de reconocimiento anclados a su superficie.

10 En el ámbito de la presente invención se define "analito" como el compuesto de interés analítico que posibilita ser identificado y cuantificado por un proceso de medición, en este caso de carácter magneto-electroquímico. Este analito es típicamente un compuesto químico o bioquímico independientemente del tipo de muestra.

15 En el alcance de la presente invención se define un "elemento de reconocimiento" como una molécula capaz de reconocer e interactuar con alguna de las otras moléculas participantes en el procedimiento de la invención mediante una reacción de afinidad biológica o química.

20 En el alcance de la presente invención se dice que dos elementos están "ligados" si existe una unión entre ellos resultado de una reacción de afinidad biológica o química, sea de manera directa o indirecta a través de un elemento intermediario de conexión. Los elementos pueden estar ligados típicamente por enlaces covalentes o por cualquier tipo de enlace o unión no covalente.

25 En el alcance de la presente invención, se define "interaccionar" a la generación de una unión específica y activa entre dos compuestos, sea de forma directa o indirecta. El resultado de una interacción específica entre dos compuestos de la invención resulta típicamente en dichos compuestos ligados.

30 En el alcance de la presente invención se define "sustrato electroquímico" como un compuesto o compuestos entre los cuales al menos uno es capaz de reaccionar con el enzima para generar un producto con capacidad óxido-reductora. En una realización de la invención, dicho producto con capacidad óxido-reductora genera una cadena de reacciones redox con otro compuesto de dicho sustrato electroquímico o bien con un
35 compuesto presente en la disolución.

En el alcance de la presente invención se define un “compuesto con capacidad óxido-reductora” típicamente como un elemento, grupo químico o compuesto que suministra electrones de su estructura química al medio aumentando su estado de oxidación, o bien capta electrones del medio incorporándolos a su estructura química y aumentando su estado de reducción.

El procedimiento de la invención puede incluir en la mezcla de primera etapa de incubación un activador o facilitador de la interacción analito vs. elemento de reconocimiento, así como un inhibidor o reductor de las uniones inespecíficas o no afines que pudieran ocurrir.

El procedimiento de la invención comprende la introducción del electrodo en la mezcla resultado de la primera etapa de incubación, típicamente en un tubo de ensayo, o bien que sea una gota de dicha mezcla lo que se aplica sobre el electrodo para la medición.

En el alcance de la presente invención se define como un “activador de la interacción” un compuesto o elemento que posibilita o facilita la interacción directa o indirecta entre los compuestos que participan en dicha interacción. Un “inhibidor de uniones inespecíficas” será cualquier compuesto que dificulte o elimine uniones no recíprocas entre uno o más compuestos en las que no intervienen reacciones de afinidad biológica o química. Existen en la técnica disoluciones o reactivos identificados como “potenciadores” que posibilitan o al menos facilitan las uniones específicas, es decir activas o recíprocas, que se desea que sucedan entre los distintos componentes con afinidad biológica de una mezcla, e “inhibidores” de las inespecíficas. Es muy frecuente su utilización en inmunoensayos.

La primera etapa de incubación se realiza bajo diferentes condiciones de agitación en función de la presencia de MBs, que a su vez vendrá determinada por el formato de incubaciones adoptado de acuerdo a la complejidad del bioensayo. Esta incubación podrá ser única o realizarse en dos o más subetapas simultáneas y/o consecutivas según las reacciones de reconocimiento. También puede ser variable la combinación de reactivos posible por cada etapa de incubación. La combinación de diferente número, tipo y tiempos de incubación, tipos de movimiento, ángulos de inclinación y velocidades se debe optimizar para aprovechar al máximo toda la superficie activa de las MBs.

Así, en una realización del procedimiento de la invención, la primera etapa de incubación comprende una incubación previa de la muestra con dichas MBs. En otra realización de la invención, la primera etapa de incubación comprende una incubación previa de la muestra con dicho elemento de reconocimiento ligado a un enzima. En otra realización dicha ligación se produce durante la incubación, de forma que el elemento de reconocimiento ligado al enzima se obtiene durante la incubación con la muestra de dicho elemento de reconocimiento y dicho enzima. En otra realización preferible más, dicho elemento de reconocimiento está ligado al enzima por una molécula portadora de dicho enzima. Más preferiblemente aún, dicho enzima es la fosfatasa alcalina (AP).

Dependiendo de cada ensayo el elemento de reconocimiento será único o de captura del analito, o funcionará como secundario o sucesivos. La mejor realización de un marcado indirecto con AP comprende una reacción de afinidad de carácter estable y no covalente como vehículo intermedio de marcaje (biotina-estreptavidina/avidina-AP, IgG-AntiIgG-AP, Digoxigenina-Anti-Digoxigenina-AP, etc). De forma que en el alcance de la presente invención se define una “molécula portadora del enzima” como un compuesto que lleva ligado un enzima y es capaz de mantener la capacidad enzimática de este último.

En otra realización, dicha interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito en la primera etapa de incubación comprende al menos un segundo elemento de reconocimiento. Este segundo elemento de reconocimiento puede interactuar con el primer elemento de reconocimiento ligado a un enzima o puede estar ligado al analito, de forma que en otra realización más, dicho analito está ligado a un elemento de reconocimiento.

En otra realización del procedimiento de la invención, las MBs presentan adheridos activadores de interacción. En otra realización preferible, las MBs están ligadas a un elemento de reconocimiento, muy preferiblemente por grupos tosilo.

En una realización preferible del procedimiento de la invención, dichas MB presentan un tamaño de entre 2,5 y 3 μm , preferiblemente de 2,8 μm . Sin embargo, el tamaño óptimo de las MBs para cada ensayo dependerá de la viscosidad de la muestra o matriz en la que se encuentra contenido el analito. A su vez el tamaño de las MBs

condiciona el tiempo de aplicación del imán, que será mayor cuanto menor el tamaño de dichas MBs. En la realización más preferible del procedimiento de la invención el tiempo óptimo de imán es de 3 minutos.

5 En el alcance de la presente invención se define “tiempo de imán” o tiempo de campo magnético al tiempo necesario para que las MBs presentes en disolución o en gota se posicionen sobre la superficie de trabajo del electrodo. Dicho tiempo dependerá de la viscosidad de la muestra, del tamaño de las MBs y su concentración, y de la fuerza magnética del imán empleado. Este tiempo de imán se puede aplicar en distintos momentos del procedimiento dependiendo de la existencia o no de etapas adicionales de incubación y absorción.

10 En otra realización de la invención dicho elemento de reconocimiento está seleccionado entre el grupo compuesto por un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico ADN o ARN, un enzima y preferiblemente el enzima de un fago, un péptido, un polímero, un principio activo y un microorganismo o una parte del mismo. Realizaciones más particulares comprenden inmunoglobulinas monoclonales, oligonucleótidos tiolados, endolisinas de bacteriófagos, oligopéptidos con dominios de unión afines a ciertos elementos o compuestos, polímeros de impresión molecular (MIP), intercalantes de ADN usados en quimioterapia y células de bacterias con reacciones metabólicas de interés (extremófilas, sulfato-reductoras, nitrificadoras, metanogénicas, etc.)

15 En el alcance de la presente invención se define “principio activo” como el ingrediente activo de un fármaco. Se trata de una sustancia química purificada con influencia o efecto directo en prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación o cura de una enfermedad, para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado, o bien para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos (*U.S. Food and Drug Administration, FDA, U.S. Department of Health & Human Services*).

20 En una realización muy preferible de la invención, el electrodo está situado encima del imán. En otra realización preferible el electrodo está en posición esencialmente vertical. En otra realización más, el imán está integrado en el electrodo. En estas realizaciones las partículas magnéticas atraídas hacia el electrodo van a definir la superficie en la que se mida el compuesto redox indicativo positivo de la reacción.

Otra realización del procedimiento de la invención comprende una etapa de absorción previa a la adición del sustrato electroquímico. Esta absorción del líquido sobrante, que no se seca, permite minimizar interferentes físico-químico-biológicos que pudieran estar presentes en la muestra o matriz, el exceso de reactivos y/o las posibles uniones inespecíficas; todos ellos, acontecimientos no deseados que podrían dificultar y/o interferir en la medición.

En el alcance de la presente invención se define “absorción” como la reducción del volumen de gota aplicado sobre el electrodo, o del volumen de disolución en la que se introduce el electrodo, una vez transcurrido el tiempo óptimo de imán para que las “partículas magnéticas” queden posicionadas sobre dicho electrodo.

En una realización preferible de la invención el sustrato electroquímico comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata iónica. El compuesto indoxílico es preferiblemente 3-indoxil fosfato (3-IP) o cualquier otro sustrato fosforilado susceptible de ser defosforilado por el enzima AP. La fuente de plata iónica es preferiblemente nitrato de plata (AgNO_3) o cualquier otra sal o compuesto químico que libere iones Ag^+ en disolución.

Como disoluciones reguladoras más frecuentes para mantener la actividad óptima del enzima AP a un pH básico o alcalino y potenciar además su reactividad se emplean aminoalcoholes. El de uso más frecuente el tris(hidroximetil)-aminometano conocido comúnmente como Tris, aunque en la presente invención puede usarse cualquier otra que resulte favorable para el enzima de marcaje. Se utilizará un pH entre 5,5 – 8,5 para las reacciones biológicas previas y pH entre 7 – 10,5 para la reacción enzimática.

El tiempo de medición de la señal en la superficie del electrodo dependerá de la viscosidad de la muestra o matriz, tamaño y concentración de MBs, concentración de enzima y sustrato electroquímico, y de llevar a cabo una posible absorción previa. Para la realización de la invención que incluye partículas magnéticas entre 2,5 y 3 μm la medición de la señal después de una absorción se puede realizar hasta en un tiempo máximo de 5 minutos a partir de la adición del sustrato electroquímico. La eliminación previa del enzima o molécula portadora del enzima que no ha interactuado minimiza posibles falsos positivos y permite así este tiempo de reacción para el depósito del compuesto o producto con capacidad óxido-reductora en la superficie del electrodo. En caso de que el procedimiento no incorpore dicha etapa

previa de absorción el tiempo máximo de medición será de 3 min, preferiblemente de 2 min. Un tiempo superior provocaría falsos positivos por contabilizar también el producto producido por el enzima que no haya interactuado y que por tanto está libre en disolución por encima de la superficie del electrodo.

5

En el alcance de la presente invención se define “superficie del electrodo” como la zona delimitada por el espacio comprendido entre el electrodo y la superposición de partículas magnéticas dispuestas sobre dicho electrodo en presencia de un campo magnético. Su amplitud depende, por tanto, del tamaño y concentración de las partículas magnéticas empleadas.

10

Como dispositivo de medición electroquímica se emplean potencióstatos. La presente invención cubre cualquier realización en cuanto al tipo de electrodo y equipamiento capaz de medir un proceso electroquímico que transcurra en dicho electrodo. En una realización preferible, la medición de la señal se realiza por voltamperometría cíclica (CV) o voltampería de onda cuadrada (SWV).

15

El empleo de multi-potencióstatos con varios canales de conexión junto con multi-electrodos con varias zonas sensoras por plataforma electrónica permite la detección multi-analito por ensayo aumentando el grado de rendimiento, la versatilidad y la potencialidad de la metodología “no lavado” de invención.

20

En el alcance de la presente invención, la “referencia” respecto a la cual se evalúa la medición del compuesto o producto con capacidad óxido-reductora en la superficie del electrodo puede ser un control negativo basado en la ausencia de analito, un control positivo con concentración y pureza de analito tales que el resultado sea consistentemente positivo, un calibrado con unos datos de respuesta de medición frente a unos valores de concentración de analito o cualquier otra medición o dato válido como valor comparativo.

25

Una primera realización de producto muy preferible de la invención es un kit analítico que contiene los agentes reactivos y dispositivos necesarios para la detección electroquímica de un analito en una muestra, cuyas instrucciones de uso especifican que dicha detección electroquímica se realiza sin etapas de lavado. Otra realización más es un kit que contiene los reactivos y dispositivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento según la reivindicación 1.

30

35

Otra realización muy preferible es un kit analítico sin lavados para la detección de un analito en una muestra, que incluye un elemento de soporte y unos agentes reactivos, dichos agentes reactivos dispuestos en al menos dos formulaciones que comprenden entre las dos un elemento de reconocimiento ligado a un enzima o a una molécula portadora de un enzima, partículas magnéticas y un sustrato electroquímico, dicho elemento de soporte comprende un electrodo y un imán, y cuyas instrucciones de uso indican que la detección se realiza sin necesidad de ninguna etapa de lavado. Dicho enzima es preferiblemente la fosfatasa alcalina. Dicho elemento de reconocimiento es preferiblemente un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico ADN o ARN, o un enzima de un fago.

En una realización muy preferible del kit de la invención dicho electrodo es un electrodo serigrafiado de carbono. En otra realización preferible el electrodo es un electrodo serigrafiado de oro, y en otra realización más es un electrodo serigrafiado de platino.

La metodología analítica objeto de invención aporta no sólo una importante reducción en el número de pasos operativos necesarios para llegar al resultado final, sino que también y de forma novedosa en lo que se refiere a un método de detección electroquímico la eliminación de toda etapa de lavado.

El fundamento electroquímico que posibilita la supresión de lavados viene determinado en la realización más preferible de la invención por la reducción de la plata iónica coligada a la actividad enzimática de AP empleada como marcaje del bioensayo (Fig 1). La participación de MBs y la aplicación de un campo magnético en la zona sensora de un electrodo provocan un efecto de concentración de AP en dicha zona, y por tanto de depósito de plata metálica, que será tanto mayor por unidad de tiempo cuanto más analito haya en la muestra. La aplicación de un tiempo corto de actividad enzimática permitirá restringir la medición a la plata metálica producida sobre la superficie del electrodo y generada por el enzima o molécula portadora del enzima unido al analito, que a su vez está unido a las MBs que se encuentran sobre el electrodo, discriminando así la plata metálica producida por el enzima que no está unido al analito pero sí en disolución. Esto evita la necesidad de hacer ningún lavado.

35

La eliminación de lavados alcanzada con la metodología de invención supone un extraordinario avance en rapidez, sencillez y reproducibilidad. Esto es debido al menor grado de participación del usuario y sobre todo a la facilidad de manejo inherente al procedimiento desde la incubación a la medición.

5

Las tecnologías de “no lavado” de la técnica cuya detección está basada en procesos ópticos suelen suponer un coste significativo, no sólo en cuanto al equipo de medición sino también en los propios reactivos marcados e incluso en el material accesorio no autofluorescente. Por el contrario, la metodología electroquímica de “no lavado” de la presente invención conlleva un equipamiento de medición electrónico de adquisición y mantenimiento más económicos. La facilidad de manejo de este equipamiento electrónico y su reducido tamaño permite agilizar además tanto la tarea del analista como el flujo de trabajo del laboratorio, y el soporte de detección que constituyen los electrodos aporta notables ventajas adicionales al tratarse de elementos miniaturizados, de bajo coste y con carácter desechable.

10
15

Toda tecnología basada en la emisión de luminiscencia y fluorescencia presenta una serie de inconvenientes metodológicos que se acentúan al suprimir los lavados. El más común es su elevada susceptibilidad a múltiples condiciones ambientales, que puede reducir o aumentar la señal inespecíficamente, además de ejercer una notable influencia en el ruido de fondo. También son numerosos los interferentes físico-químico-biológicos de la matriz de una muestra que pueden influir en la dispersión de la luz y/o emitir un cierto grado de luminiscencia de forma basal. Por ello, el analista representa un papel clave a la hora de optimizar y llevar a cabo estos ensayos lumínicos de manera reproducible y fiable siendo relevante su grado de formación, experiencia y destreza. Este riesgo no interviene en la metodología electroquímica de “no lavado” de la presente invención, mientras que sí se mantienen las ventajas en cuanto a simpleza, operatividad y rapidez atribuibles a las tecnologías lumínicas. Además, el empleo de multi-potenciostatos y multi-electrodos puede aportar a la metodología de invención la potencialidad de detección multi-analito con las mismas ventajas en coste, simpleza y operatividad y fiabilidad que la uni-analito.

20
25
30

Así, las principales ventajas tecnológicas del método electroquímico de “no lavado” de la presente invención con respecto a la técnica se pueden resumir en rapidez, sencillez y operatividad, fondos controlables, coste asequible de equipamiento, equipamiento de manejo sencillo y dimensiones reducidas con carácter portátil,

35

electrodos de carácter miniaturizado y desechable, y versatilidad. Esta versatilidad se manifiesta en su potencialidad para multitud de analitos y numerosas posibilidades de MBs, para multitud de elementos de reconocimiento con opciones de anclaje a MBs, en que es adaptable al marcaje usual con AP sea de manera directa o indirecta de un elevado número de anticuerpos, y proteínas, así como de ADN y ARN, y en la potencialidad de detección multi-analito por ensayo. Además se pueden establecer cribados primarios pre-selectivos: mezcla de MBs ligadas con elementos de reconocimiento frente a diferentes analitos enmarcados en un mismo grupo en cuanto a motivos comunes de diagnóstico o bioseguridad, o rastreos intensivos y específicos por el empleo de multi-electrodos y multi-potenciostatos que permiten medir por separado aunque en un único ensayo un número amplio de analitos. Todo lo cual supone un avance tecnológico definitivo sobre la técnica.

El Ejemplo 1 ilustra la metodología de “no lavado” más sencilla en conformidad con el procedimiento operativo mostrado en la Fig. 2. Puede servir de modelo para aquellos bioensayos simples con escaso número de reactivos, matrices poco complejas y/o elevada concentración de analito. Comparativamente el tiempo total de análisis para el mismo inmunoensayo electroquímico no magnético, esto es, sin emplear ningún tipo de partícula magnética en el transcurso del mismo y con etapas de lavado según el Ejemplo 2, alcanza las 3 h de ensayo, con 4 etapas de incubación y 3 ciclos de lavado (Fig. 4). El tiempo de análisis por muestra se reduce por tanto en la presente invención en más de un 60%. Los resultados de reproducibilidad, rango de calibrado lineal y sensibilidad son similares en los dos ejemplos.

Un segundo modelo inmunológico se muestra en los Ejemplos 3 y 6, que ilustran más de una etapa de incubación. Se recomienda particularmente para aquellos bioensayos con mayor número de reactivos, matrices complejas y/o escasa concentración de analito. El procedimiento operativo básico de ambos se ilustra en la Fig. 5.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Reacción enzimática de la fosfatasa alcalina empleando como sustrato 3-indoxil fosfato en presencia de iones de plata.

Figura 2: Fases operativas generales de la metodología de “no lavado” con detección magneto-electroquímica objeto de la invención;

- A) Preparación y adición de analito y reactivos;
- B) Incubación;

- C) Aplicación del electrodo al resultado de la incubación en presencia de un imán;
- D) tiempo de actuación de imán para que las MBs se posicionen sobre la superficie del electrodo;
- 5 - E) adición del sustrato electroquímico ($3\text{-IP} + \text{Ag}^+$);
- F) tiempo de actividad enzimática de AP en oscuridad; y
- G) medición electroquímica.

10 **Figura 3:** Voltamperogramas cíclicos obtenidos con la metodología magneto-electroquímica de “no lavado” para un modelo inmunológico IgG/Anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina (AP), y diferentes concentraciones de este anticuerpo marcado a) $1,52 \times 10^{-11}$ M; b) $3,81 \times 10^{-11}$ M; c) $7,62 \times 10^{-11}$ M; d) $1,14 \times 10^{-10}$ M; e) $1,52 \times 10^{-10}$ M.

15 **Figura 4:** Esquema general de un inmunoensayo electroquímico no magnético para un modelo IgG y Anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina (AP) y empleando 3-indoxil fosfato y una fuente de iones de plata como sustrato electroquímico.

20 **Figura 5:** Metodología de “no lavado” con detección magneto-electroquímica y dos etapas previas de incubación.

Figura 6: Ilustración de un paso de absorción adicional incluido en la metodología de “no lavado” con detección magneto-electroquímica.

25 **Figura 7:** Metodología de “no lavado” con detección magneto-electroquímica y medición electroquímica en disolución.

Modos de Realización Preferente

30 Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Detección de anticuerpos IgG. Modelo inmunológico de dos componentes.

35 *Ligación de IgG (analito) a MBs:* se emplearon partículas paramagnéticas de $2,8 \mu\text{m}$ de diámetro funcionalizadas con grupos tosilo (Dynabeads, Invitrogen). Se ligaron a ellas anticuerpos tipo IgG₁ de ratón (AbD Serotec) a razón de $100 \mu\text{g}$ de anticuerpo/ 5

mg MB en presencia de 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), de acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen.

5 *Incubación (y pasos posteriores en Fig 2):* en un microtubo de plástico se incubaron 25 μg de MBs ligadas con IgG_1 (MB-IgG) con un anticuerpo anti-ratón conjugado con el enzima AP (Anti-IgG-AP; Sigma-Aldrich) a una concentración de $1,59 \times 10^{-10}$ M. Este segundo anticuerpo reconoce al anticuerpo IgG_1 ligado a las MBs. En ambos casos los reactivos se disolvieron en reguladora Tris- HNO_3 0,1 M a pH 7,2 (Trizma Base, Sigma-Aldrich; Ácido nítrico 65%, Merck) a un volumen total de 312,5 μl . Se incubó 1h a 800
10 rpm de movimiento vibratorio bidimensional y temperatura ambiente.

15 *Reacción enzimática:* se depositó una gota de 35 μl sobre la fase sensora de un electrodo serigrafiado de carbono no modificado con un imán dispuesto debajo de la misma. A los 3 min de actuación del campo magnético se adicionaron sobre esa gota 15 μl de 3-IP 1 mM y AgNO_3 0,4 mM en Tris- HNO_3 0,1 M a pH 9,8. Pasado ese tiempo se aplicaron 2 min de actividad enzimática de AP en condiciones de oscuridad.

20 *Medición electroquímica o registro de la señal analítica:* se realizó mediante dos técnicas electroquímicas diferentes, CV y SWV. Cuando se utilizó CV, el electrodo se sometió a un barrido anódico desde $-0,04$ V a $+0,4$ V, con una velocidad de barrido de 50 mV/s. En el caso de SWV, se realizó el mismo barrido anódico con una frecuencia de 25 Hz y una amplitud de pulso de 60 mV. Se realizaron ensayos de intervalos lineales de detección (cinco concentraciones de Anti-IgG-AP), de reproducibilidad (tres repeticiones por concentración de Anti-IgG-AP, cinco concentraciones de Anti-IgG-AP, tres días distintos consecutivos), y además de estabilidad del anticuerpo anclado a las MBs una vez ha sido ligado (mediciones bimensuales durante un año desde la fecha de ligación de IgG_1 a las MBs). Tanto con CV como con SWV se consiguió un
25 calibrado lineal entre $1,52 \times 10^{-10}$ M y $1,52 \times 10^{-11}$ M de Anti-IgG-AP para 25 μg de MBs, asumiendo un valor intermedio de éxito de ligación de acuerdo a las instrucciones del fabricante de MBs (5 μg IgG_1/mg MB). En la Fig. 3 se muestra una representación de los voltamperogramas obtenidos con CV para el rango de calibrado lineal mencionado. La desviación estándar de la repetitividad (RSD) para una concentración de Anti-IgG-AP situada en el centro del intervalo lineal fue inferior al 10% con CV, y al 15% con SWV. La sensibilidad medida como la pendiente de la recta de calibrado fue mayor con SWV que con CV (99,7 vs. 98,7 %). En condiciones de
30
35

refrigeración, el anticuerpo IgG₁ permaneció anclado a las MBs de forma estable y funcional durante un periodo de un año. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 5 min.

Ejemplo 2: Detección de anticuerpos IgG por inmunoensayo electroquímico no magnético y con lavados.

5

Para valorar los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 se planteó ese mismo análisis por un inmunoensayo estándar en la técnica (V. Escamilla-Gómez et al. "Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen on a screen-printed-electrochemical dual sensor", Biosens. Bioelectron., 2009, 24, 2678-2683). Se emplearon los mismos reactivos y el mismo fundamento electroquímico. Las concentraciones por tanto de IgG-AP, 3-IP y AgNO₃ fueron $1,59 \times 10^{-10}$ M, 1 mM y 0,4 mM, respectivamente. La excepción fue la concentración de $6,7 \times 10^{-8}$ M para el anticuerpo IgG₁ para conseguir una adsorción óptima sobre un electrodo en lugar de sobre MBs. Como se ilustra paso por paso en la Fig. 4, al tratarse de un inmunoensayo electroquímico no magnético no se emplearon MBs, sino que los anticuerpos (Reactivo 1) fueron adsorbidos directamente sobre el electrodo. Tras este paso se realizó una primera etapa de lavado que comprendió típicamente un lavado y tres aclarados posteriores. A continuación se adicionó caseína 3% como bloqueante o inhibidor de adsorciones inespecíficas. Tras otra etapa de lavado, se adicionó el anticuerpo conjugado con el enzima AP y que reconoce al primer anticuerpo (Reactivo 2). Después de una etapa de lavado más se procedió a la adición del sustrato electroquímico, y transcurridos 24 minutos de actividad enzimática de AP se realizó la medición electroquímica mediante CV. Los resultados de calibrado y reproducibilidad fueron similares a los obtenidos en el Ejemplo 1: calibrado lineal entre $1,52 \times 10^{-10}$ M y $1,52 \times 10^{-11}$ M de Anti-IgG-AP y una RSD inferior al 10% para una concentración de Anti-IgG-AP situada en el centro del intervalo lineal. El tiempo de análisis total empleado fue de 3 h.

10

15

20

25

Ejemplo 3: Detección de apolipoproteína A1, principal componente polipeptídico del colesterol HDL. Modelo inmunológico de cuatro componentes.

30

Ligación de IgG a MBs: se emplearon partículas paramagnéticas de 2,8 µm de diámetro funcionalizadas con grupos tosilo (Dynabeads, Invitrogen). Se ligaron a ellas los anticuerpos de captura "HDL-110" tipo IgG₁ de ratón (AbD Serotec) añadiendo 100 µg de este anticuerpo/ 5 mg MB en presencia de 1,2 M (NH₄)₂SO₄ (Merck), de acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen.

35

Incubación (y pasos posteriores en Fig 5): en un microtubo de plástico se incubó el analito (apolipoproteína A1 purificada o “Apo-A1”), con el anticuerpo secundario IgG “HDL-44” marcado con biotina (IgG-Biot) (Mabtech) a una concentración de $2,55 \times 10^{-8}$ M, y con el enzima AP conjugado con estreptavidina (St-AP) (Mabtech) a $1,66 \times 10^{-9}$ M. Todos los reactivos se disolvieron en reguladora Tris-HNO₃ 0,1 M a pH 7,2 a un volumen total de 300 µl, siendo de 250 µl el volumen de analito y de 25 µl el de cada reactivo. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con movimiento vibratorio bidimensional.

Incubación: se adicionaron 40 µg de MBs ligadas con IgG “HDL-110” y disueltas en el mismo Tris. El volumen total de disolución en el microtubo fue de 320 µl. Esta incubación también fue de 30 min a temperatura ambiente, pero con agitación mixta (ciclos sucesivos de movimiento orbital, recíproco y vibratorio).

Reacción enzimática: se depositó una gota de 35 µl sobre la fase sensora de un electrodo serigrafado de carbono no modificado con un imán dispuesto debajo de la misma. A los 3 min de actuación del campo magnético se adicionaron sobre esa gota 15 µl de 3-IP 1 mM y AgNO₃ 0,4 mM en Tris-HNO₃ 0,1 M a pH 9,8. Pasado ese tiempo se aplicaron 2 min de actividad enzimática de AP en condiciones de oscuridad.

Medición electroquímica o registro de la señal analítica: se empleó la técnica SWV con las mismas condiciones de voltaje, frecuencia y amplitud de pulso empleadas en el Ejemplo 1. Se realizó la misma tipología de ensayos: intervalos lineales de detección, reproducibilidad y estabilidad del anticuerpo anclado a las MBs. Se consiguió un calibrado lineal entre $1,43 \times 10^{-10}$ M y $1,07 \times 10^{-9}$ M de Apo-A1 para 40 µg MBs, considerando un valor intermedio de éxito de ligación (5 µg IgG/mg MB). La RSD para una concentración intermedia de Apo-A1 fue inferior al 15%. La sensibilidad medida como la pendiente de la recta de calibrado fue similar a la del Ejemplo 1 con la misma técnica SWV (99,7-99,9 %). El anticuerpo IgG “HDL-110” permaneció anclado a las MBs de manera estable y operativa durante un año. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 5 min.

Ejemplo 4: Inclusión en el método de análisis de un paso intermedio de absorción.

Se realizó una repetición del Ejemplo 3 hasta llegar a la etapa de la reacción enzimática, con la única variación de una concentración de AP igual a $1,25 \times 10^{-9}$ M.

Reacción enzimática: Se depositó una gota de 35 μl sobre la fase sensora de un electrodo serigrafiado de carbono no modificado con un imán dispuesto debajo de la misma. A los 3 min de actuación del campo magnético sobre la gota depositada sobre la fase sensora del electrodo, se absorbió dicha gota antes de adicionar el sustrato electroquímico, sin ningún tipo de lavado ni aclarado posterior (Fig. 6). A los 3 min de actuación del campo magnético se adicionaron sobre esa gota 15 μl de 3-IP 1 mM y AgNO_3 0,4 mM en Tris- HNO_3 0,1 M a pH 9,8. Pasado ese tiempo se aplicaron 5 min de actividad enzimática de AP en condiciones de oscuridad.

Medición electroquímica: Se realizó según el Ejemplo 3. Esta etapa de absorción permitió alcanzar un notable incremento en la sensibilidad de la detección cuantitativa del analito, con un valor de entre $3,56 \times 10^{-12}$ M y $1,07 \times 10^{-9}$ M ApoA1. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 8 min.

Ejemplo 5: Medición magneto-electroquímica en disolución.

Ligación de IgG a MBs: Se emplearon partículas paramagnéticas de 2,8 μm de diámetro funcionalizadas con grupos tosilo (Dynabeads, Invitrogen). Se ligaron a ellas los anticuerpos de captura "HDL-110" tipo IgG_1 de ratón (AbD Serotec) añadiendo 100 μg de este anticuerpo/ 5 mg MB en presencia de 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck), de acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen.

Incubación (y pasos posteriores en Fig 7): En un microtubo de plástico se incubó el analito (apolipoproteína A1 purificada o "Apo-A1"), con el anticuerpo secundario IgG "HDL-44" marcado con biotina (IgG -Biot) (Mabtech) a una concentración de $2,55 \times 10^{-8}$ M, y con el enzima AP conjugado con estreptavidina (St-AP) (Mabtech) a $1,66 \times 10^{-9}$ M. Todos los reactivos se disolvieron en reguladora Tris- HNO_3 0,1 M a pH 7,2 a un volumen total de 300 μl , siendo de 250 μl el volumen de analito y de 25 μl el de cada reactivo. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con movimiento vibratorio bidimensional.

Incubación: Se adicionaron 40 μg de MBs ligadas con IgG "HDL-110" y disueltas en el mismo Tris. El volumen total de disolución en el microtubo fue de 320 μl . Esta incubación también fue de 30 min a temperatura ambiente, pero con agitación mixta (ciclos sucesivos de movimiento orbital, recíproco y vibratorio). Finalizados los 30 min

de incubación se añadieron 580 μl de la reguladora Tris- HNO_3 0,1 M a pH 7,2 a los 320 μl presentes en el microtubo.

Reacción enzimática: Se transfirió el volumen final de 900 μl a una celda de medida la cual contenía un electrodo serigrafiado de carbono no modificado con un imán dispuesto debajo de la fase sensora del electrodo. A los 3 min de actuación del campo magnético se adicionaron 137 μl de 3-IP 1 mM y AgNO_3 0,4 mM en Tris- HNO_3 0,1 M a pH 9,8 a la solución presente en la celda de medida. Pasado ese tiempo se aplicaron 2 min de actividad enzimática de AP en condiciones de oscuridad.

Medición electroquímica o registro de la señal analítica: Se empleó la técnica SWV con las mismas condiciones de voltaje, frecuencia y amplitud de pulso empleadas en el Ejemplo 1. Se realizó la misma tipología de ensayos: intervalos lineales de detección, reproducibilidad y estabilidad del anticuerpo anclado a las MBs. Se consiguió un calibrado lineal entre $1,07 \times 10^{-10}$ M y $3,57 \times 10^{-10}$ M de Apo-A1 para 40 μg MBs, considerando un valor intermedio de éxito de ligación (5 μg IgG/mg MB). La RSD para una concentración intermedia de Apo-A1 fue inferior al 15%. La sensibilidad medida como la pendiente de la recta de calibrado fue similar a la del Ejemplo 1 con la misma técnica SWV (99,7-99,9 %). El tiempo de análisis total fue de 1 h y 5 min.

Ejemplo 6: Detección del patógeno alimentario bacteriano *Listeria monocytogenes*: proteína extracelular p60 como inmunodiana. Modelo inmunológico de cuatro componentes.

Pre-tratamiento de la muestra: los cultivos bacterianos fueron crecidos en 10 ml de medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth, Scharlab) durante 14 h, a una temperatura de 37°C en condiciones estáticas. Se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min (MiniSpin, Eppendorf) y se recogieron los sobrenadantes, transfiriéndolos a nuevos tubos estériles. A continuación, dichos sobrenadantes se hirvieron en un bloque calefactor (Grant Bio) a 100°C durante 15 min para proceder después a su análisis inmediato o para ser almacenados a 4°C hasta el momento de análisis.

Ligación de IgG a MBs: se emplearon MBs de 2,8 μm de diámetro funcionalizadas con grupos tosilo (Dynabeads, Invitrogen). Se ligaron a ellas los anticuerpos de captura “anti-*Listeria monocytogenes* p60, mAb” (MAb-p60) tipo IgG_{1k} de ratón (Adipogen) a

razón de 100 µg de anticuerpo/5 mg MB en presencia de 1,2 M (NH₄)₂SO₄ (Merck), de acuerdo a las instrucciones del fabricante de las MBs.

5 *Incubación:* en un microtubo de plástico se incubaron los sobrenadantes hervidos procedentes de cultivos en TSB de la muestra pre-tratada, el anticuerpo secundario IgG “anti-Listeria sp. p60, pAb” marcado con biotina (IgG-Biot; Adipogen) a una concentración de 2×10^{-8} M, y el enzima AP conjugado con estreptavidina (St-AP; Mabtech) a $1,66 \times 10^{-9}$ M. Como referencia, se incluyó por cada ensayo un análisis directo del analito, esto es empleando la propia proteína p60 purificada a modo de control positivo. Todos los reactivos se disolvieron en reguladora Tris-HNO₃ 0,1 M a pH 7,2 excepto la muestra que va contenida en el medio de cultivo TSB. El volumen total de incubación fue de 300 µl, siendo de 250 µl el volumen de muestra o analito purificado según el caso, y de 25 µl el de cada reactivo. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con movimiento vibratorio.

15 *Incubación (y pasos posteriores en Fig. 5):* se adicionaron 40 µg de MBs ligadas con MAb-p60 y disueltas en el mismo Tris, de forma que el volumen total de disolución en el microtubo fue de 320 µl. Se incubó entonces 30 min a temperatura ambiente con agitación mixta (ciclos sucesivos de movimiento orbital, recíproco y vibratorio).

20 *Reacción enzimática:* se depositó una gota de 35 µl del resultado de la incubación anterior sobre la fase sensora de un electrodo serigrafiado de carbono no modificado con un imán dispuesto debajo de la misma. A los 3 min de actuación del campo magnético se adicionaron sobre esa gota 15 µl de 3-IP 1 mM y AgNO₃ 0,4 mM en Tris-HNO₃ 0,1 M a pH 9,8. Pasado ese tiempo se aplicaron 2 min de actividad enzimática de AP en condiciones de oscuridad.

25 *Medición electroquímica o registro de la señal analítica:* se empleó la técnica SWV con un barrido anódico desde -0,04 V a +0,4 V, una frecuencia de 25 Hz y una amplitud de pulso de 60 mV. Se realizaron tres tipos de ensayos: intervalos lineales de detección, reproducibilidad y estabilidad del anticuerpo anclado a las MBs. Se consiguió un calibrado lineal entre $8,33 \times 10^{-12}$ M y $1,67 \times 10^{-10}$ M de proteína p60 purificada para 40 µg MBs, considerando un valor intermedio de éxito de ligación (5 µg IgG/mg MB). La RSD para una concentración intermedia de P60 fue inferior al 15%. La sensibilidad medida como la pendiente de la recta de calibrado fue 97,6-99%. El anticuerpo IgG

35

ES 2 498 790 A1

MAB-p60 permaneció anclado a las MBs de manera estable y operativa durante al menos 6 meses, en conformidad con su período mínimo de viabilidad de acuerdo al fabricante. El tiempo de análisis total fue de 1 h y 5 min.

Reivindicaciones

1. Procedimiento para la detección magneto-electroquímica sin lavados de un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a) incubación de dicha muestra en presencia de partículas magnéticas y de un elemento de reconocimiento ligado a un enzima, en que dicho elemento de reconocimiento y dichas partículas magnéticas son capaces de interaccionar independientemente con dicho analito,
 - b) aplicación de un electrodo al resultado de la etapa a) en presencia de un imán,
 - 10 c) adición de un sustrato electroquímico de dicho enzima para obtener un compuesto con capacidad óxido-reductora,
 - d) medición electroquímica sobre la superficie del electrodo de dicho compuesto con capacidad óxido-reductora, o de al menos un producto de una reacción redox generada por dicho compuesto, en presencia de los componentes de la muestra y de los reactivos añadidos en las etapas a) y c), y
 - 15 e) determinación de la presencia del analito evaluando el resultado de la etapa anterior respecto de una referencia.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha muestra es una muestra biológica.
- 20 3. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, suero o plasma.
4. Un procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que dicha muestra biológica es un cultivo o enriquecimiento bacteriano.
5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha incubación de la etapa a) comprende una incubación previa de la muestra con dichas partículas magnéticas.
- 25 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que dicha incubación de la etapa a) comprende una incubación previa de la muestra con dicho elemento de reconocimiento ligado a un enzima.
- 30 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que dicho elemento de reconocimiento ligado a un enzima de la etapa a) se obtiene durante la incubación con la muestra de dicho elemento de reconocimiento y dicho enzima.
- 35 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que dicho elemento de reconocimiento está ligado al enzima por una molécula portadora de dicho enzima.

9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que dicho enzima es la fosfatasa alcalina.
10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que dicha interacción de la etapa a) entre el elemento de reconocimiento y el analito comprende al menos un segundo elemento de reconocimiento.
- 5 11. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que dicho analito está ligado a un elemento de reconocimiento.
12. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que dichas partículas magnéticas presentan adheridos activadores de interacción.
- 10 13. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que dichas partículas magnéticas están ligadas a un elemento de reconocimiento.
14. Un procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que dichas partículas magnéticas están ligadas a dicho elemento de reconocimiento por grupos tosilo.
- 15 15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dichas partículas magnéticas presentan un tamaño de entre 2,5 y 3 μm .
16. Un procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por que dicho tamaño es de 2,8 μm .
- 20 17. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado por que dicho elemento de reconocimiento está seleccionado entre el grupo compuesto por un anticuerpo, una molécula de ácido nucleico, un enzima, un péptido, un polímero, un principio activo y un microorganismo o una parte del mismo.
- 25 18. Un procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado por que dicho enzima es el enzima de un fago.
19. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado por que dicho electrodo de la etapa b) está situado encima del imán.
- 30 20. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado por que dicho electrodo de la etapa b) está en posición esencialmente vertical.
21. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado por que dicho electrodo de la etapa b) contiene el imán.
22. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado por que dicho electrodo es un electrodo serigrafiado.
- 35

23. Un procedimiento según la reivindicación 22, caracterizado por que dicho electrodo serigrafiado es un electrodo serigrafiado de carbono.
24. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, que comprende una etapa de absorción previa a la adición del sustrato electroquímico según la etapa c).
- 5 25. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado por que dicho sustrato electroquímico de la etapa c) comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata iónica.
26. Un procedimiento según la reivindicación 25, caracterizado por que dicho compuesto indoxílico es 3-indoxil fosfato.
- 10 27. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 25 ó 26, en que dicha fuente de plata iónica es nitrato de plata.
28. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado por que dicha medición de la etapa d) se realiza en un tiempo máximo de 5 minutos después de la adición del sustrato electroquímico según la etapa c).
- 15 29. Un procedimiento según la reivindicación 28, caracterizado por que dicho tiempo máximo de medición es de 2 min.
30. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, caracterizado por que dicha medición de la etapa d) se realiza por voltamperometría cíclica o voltampería de onda cuadrada.
- 20 31. Kit analítico que contiene los agentes reactivos y dispositivos necesarios para la detección electroquímica de un analito en una muestra, cuyas instrucciones de uso especifican que dicha detección electroquímica se realiza sin etapas de lavado.
32. Kit analítico sin lavados para la detección de un analito en una muestra, que contiene los reactivos y dispositivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento según la reivindicación 1.
- 25 33. Kit analítico sin lavados para la detección de un analito en una muestra, caracterizado por que incluye un elemento de soporte y unos agentes reactivos, en que dichos agentes reactivos están dispuestos en al menos dos formulaciones que comprenden entre dichas dos formulaciones un elemento de reconocimiento ligado a un enzima o a una molécula portadora de un enzima, partículas magnéticas y un sustrato electroquímico, dicho elemento de soporte comprende un electrodo y un imán, y cuyas instrucciones de uso indican que dicha detección se puede realizar sin necesidad de ninguna etapa de lavado.
- 30 34. Un kit según la reivindicación 33, caracterizado por que dicho electrodo es un electrodo serigrafiado de carbono.
- 35

35. Un kit según la reivindicación 33, caracterizado por que dicho electrodo es un electrodo serigrafiado de oro.
36. Un kit según la reivindicación 33, caracterizado por que dicho electrodo es un electrodo serigrafiado de platino.

Figura 1

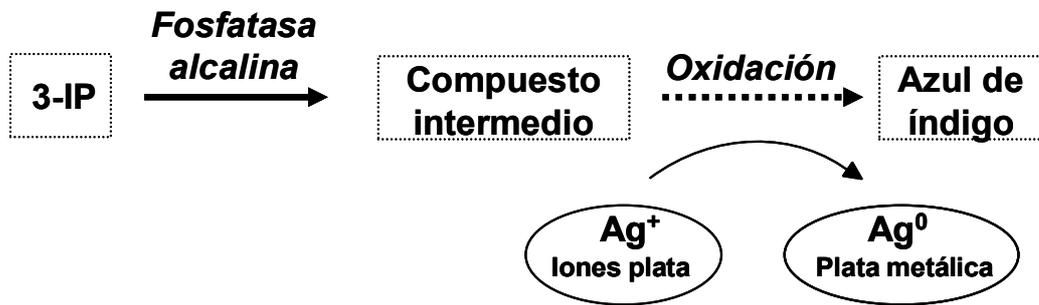


Figura 2

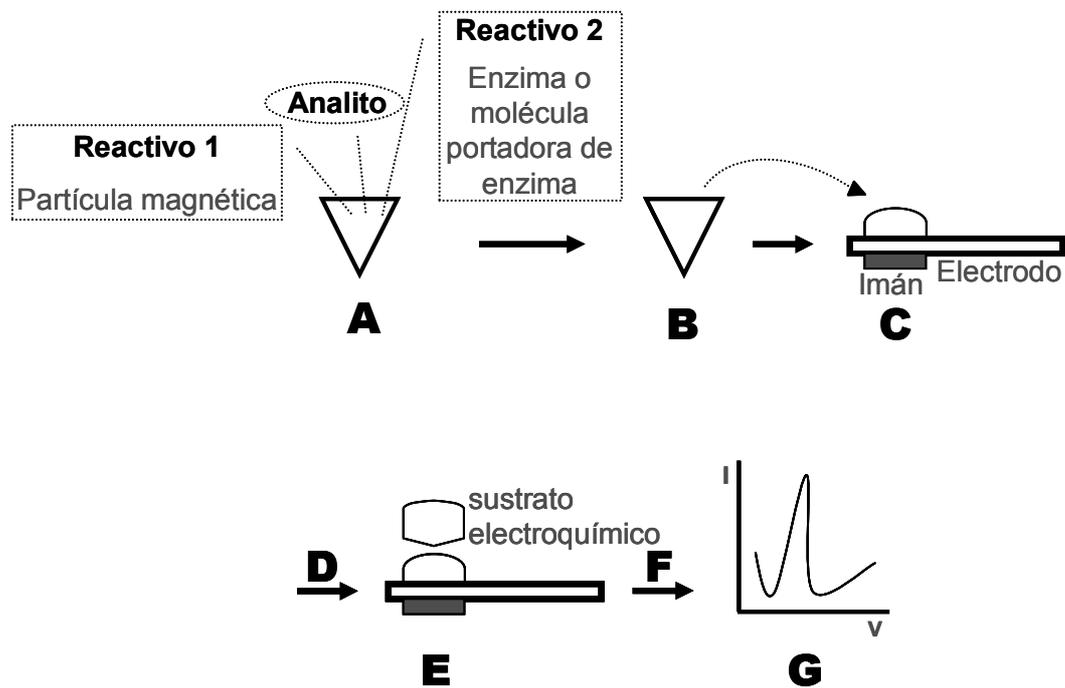


Figura 3

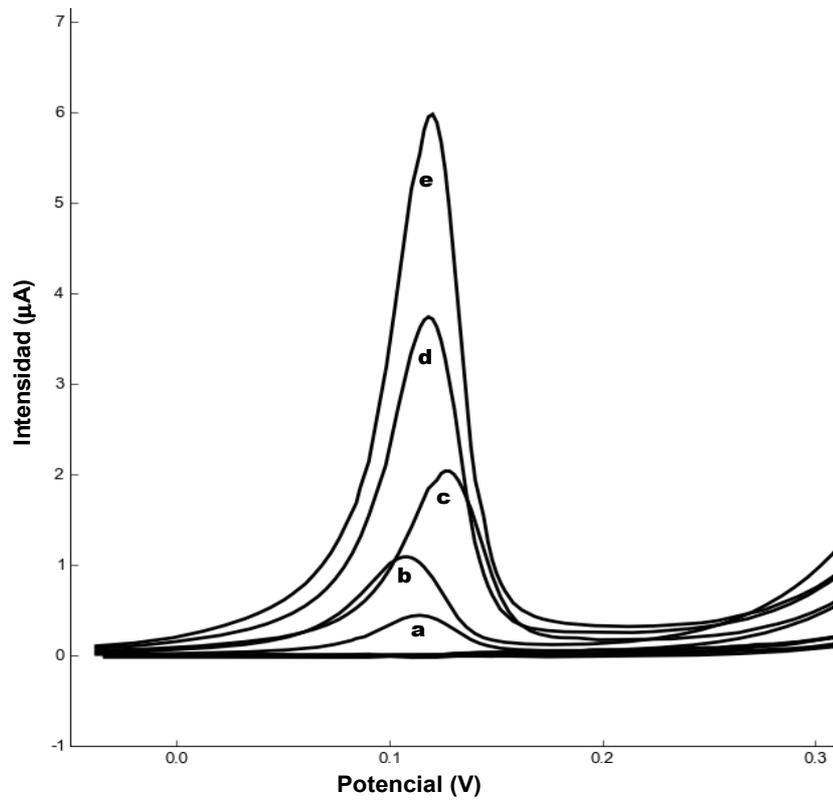


Figura 4

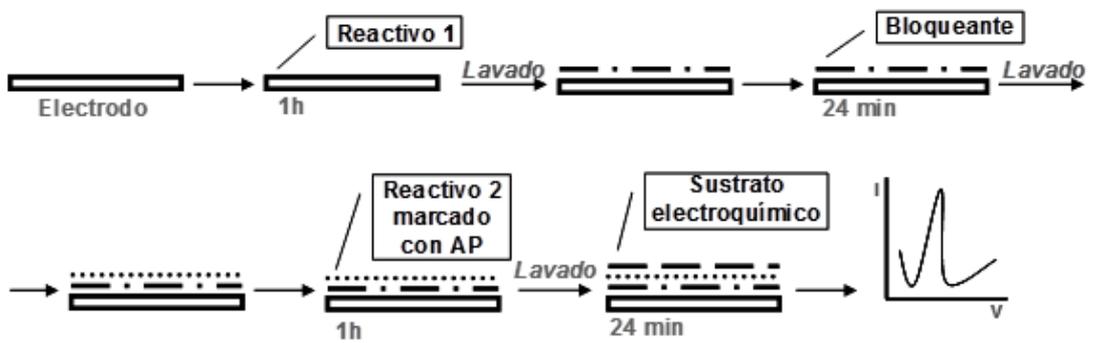


Figura 5

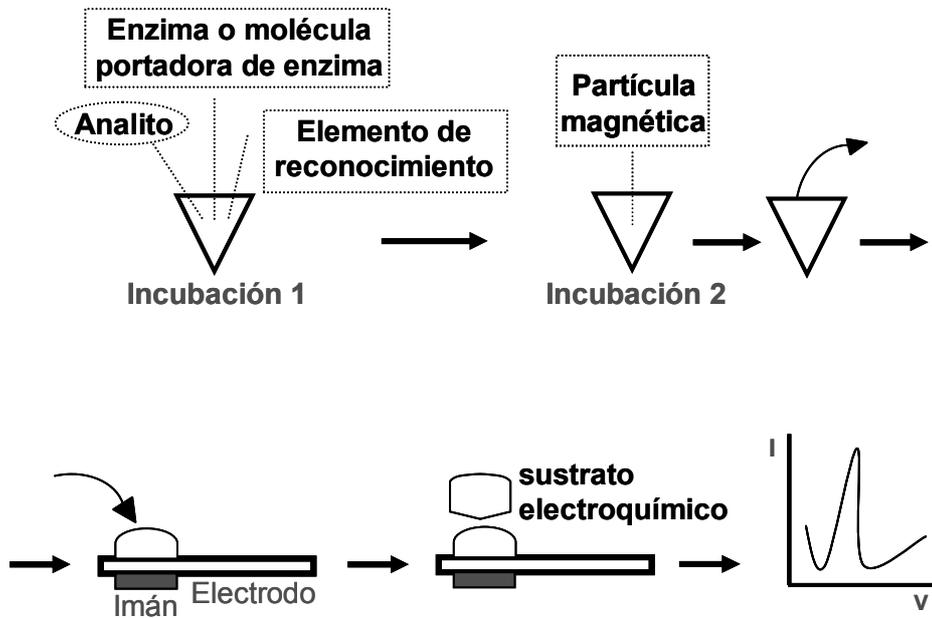
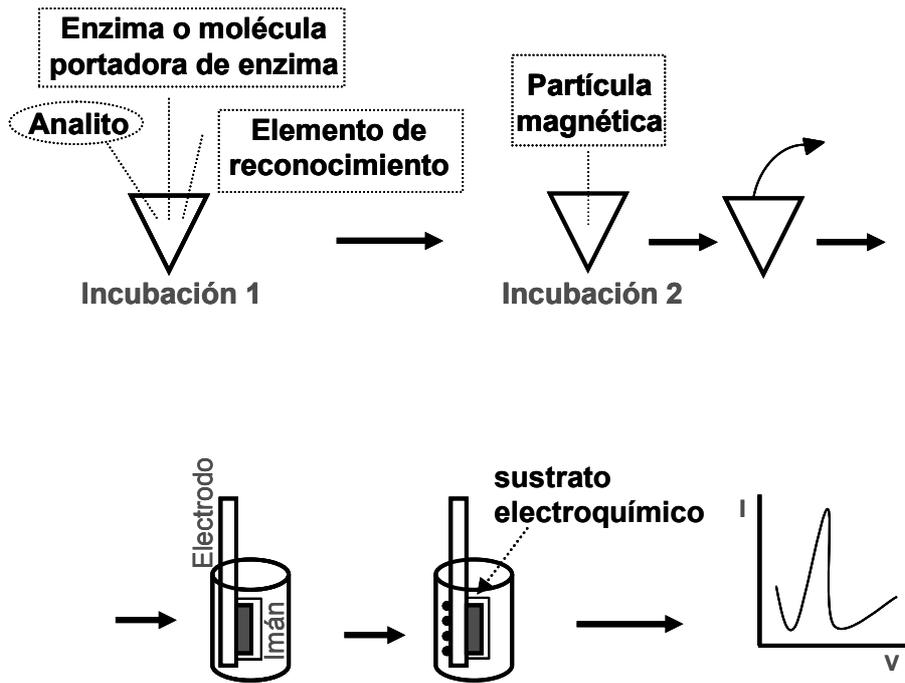


Figura 6



Figura 7





- ②① N.º solicitud: 201330398
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.03.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/534** (2006.01)
G01N33/58 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MORENO-GUZMAN MARIA et al. A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. Analytica Chimica Acta APR 29 2011 04.2011 VOL: 692 No: 1-2 Págs: 125-130 ISSN 0003-2670 (print) ISSN 1873-4324 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.aca.2011.02.062.	1-24,29,30,31-34
Y		25-28
Y	AFONSO A S et al. Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics 20130215 Elsevier Ltd gbr 15.02.2013 VOL: 40 No: 1 Págs: 121-126 ISSN 0956-5663 (print) ISSN 1873-4235 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.bios.2012.06.054.	25-28
X	EP 2148191 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 27.01.2010	1-36
A	LAUREYN W et al. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. Sensors and Actuators B: Chemical: international journal devoted to research and development of physical and chemical transducers, 20000825 Elsevier S.A, CH 25.08.2000 VOL: 68 No: 1-3 Págs: 360-370 ISSN 0925-4005 Doi: doi:10.1016/S0925-4005(00)00489-5.	1-36
A	ES 2172547 T3 (DADE BEHRING MARBURG GMBH) 01.10.2002	1-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.04.2014

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.04.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 25-28	SI
	Reivindicaciones 1-24,29,30,31-36	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-36	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MORENO-GUZMAN MARIA et al. A disposable electrochemical immunosensor for prolactin involving affinity reaction on streptavidin-functionalized magnetic particles. <i>Analytica Chimica Acta</i> APR 29 2011 04.2011 VOL: 692 No: 1-2 Págs: 125-130 ISSN 0003-2670 (print) ISSN 1873-4324 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.aca.2011.02.062.	31.03.2011
D02	AFONSO A S et al. Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> 20130215 Elsevier Ltd gbr 15.02.2013 VOL: 40 No: 1 Págs: 121-126 ISSN 0956-5663 (print) ISSN 1873-4235 (electronic) Doi: doi:10.1016/j.bios.2012.06.054.	15.02.2013
D03	EP 2148191 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION)	27.01.2010
D04	LAUREYN W et al. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. <i>Sensors and Actuators B: Chemical: international journal devoted to research and development of physical and chemical transducers</i> , 20000825 Elsevier S.A, CH 25.08.2000 VOL: 68 No: 1-3 Págs: 360-370 ISSN 0925-4005 Doi: doi:10.1016/S0925-4005(00)00489-5.	25.08.2000
D05	ES 2172547 T3 (DADE BEHRING MARBURG GMBH)	01.10.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un procedimiento para la detección magneto-electroquímica sin lavados de un analito en una muestra. Las reivindicaciones 1-30 hacen referencia al procedimiento que comprende las siguientes etapas, mencionadas en la reivindicación independiente 1:

- 1- Incubación de una muestra conteniendo un analito en presencia de partículas magnéticas y de un elemento de reconocimiento del analito ligado a una enzima.
- 2- Aplicación del resultante de la etapa anterior a un electrodo en presencia de un imán
- 3- Adición de un sustrato electroquímico de dicho enzima para obtener un compuesto con capacidad redox
- 4- Medición electroquímica sobre la superficie del electrodo con capacidad oxido-reductora
- 5- Determinación de la presencia del analito en función de la medición de la etapa anterior

Las reivindicaciones 2-30, dependientes de la primera reivindicación, concretan las características de los elementos que conforman el procedimiento anterior.

Las reivindicaciones 31-36 se refieren a un kit que contenga los reactivos y productos para llevar a cabo el procedimiento anterior.

D01 divulga un inmunosensor desechable y un procedimiento inmuno- electroquímico para la determinación de la hormona prolactina. El procedimiento hace uso de electrodos de carbono serigrafiados y partículas magnéticas de estreptavidina - funcionalizadas. Anticuerpos anti - prolactina biotinilados se inmovilizaron sobre las partículas magnéticas funcionalizadas y se llevó a cabo un inmunoensayo de tipo sándwich entre la prolactina y el anticuerpo anti - prolactina marcado con fosfatasa alcalina. El bio - conjugado resultante fue atrapado en la superficie del electrodo serigrafiado con un pequeño imán y se cuantificó la prolactina por voltametría diferencial de pulsos de 1 - naftol formado en la reacción de la enzima usando fosfato de 1 - naftilo como sustrato de fosfatasa alcalina (ver figura 1)

D02 divulga un inmunosensor desechable para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* LT2 (S) usando un magneto-inmunoensayo y nanopartículas de oro (AuNPs) como marcador para la detección electroquímica. El inmunosensor se basa en el uso de un electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) que incorpora un imán permanente debajo. Muestras de leche que contienen *Salmonella* han sido ensayados mediante el uso de perlas magnéticas anti-*Salmonella* (MBs-PSAB) como fase de captura e intercalando después anticuerpos AuNPs, que finalmente son detectados mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

D03 divulga un biosensor para la determinación directa de un analito en una muestra basado en la interferencia que se produce entre un campo eléctrico generado entre dos electrodos y las estructuras moleculares que pueden formarse debido a la interacción de analitos de una muestra en solución con las moléculas receptoras o sensoras inmovilizadas sobre la superficie del sensor, y en el que los electrodos altamente conductivos están separados por una barrera de material aislante.

D04 divulga un ensayo genomagnético para la detección electroquímica de agentes patógenos de los alimentos sobre la base de la amplificación del ADN in situ con cebadores magnéticos. El ensayo genomagnético se desarrolló para una diana de ADN sintético que se unió, por su doble hibridación con una sonda de digoxigenina y una sonda de captura biotinilada, y con una unión adicional a perlas magnéticas modificadas con estreptavidina. La diana de ADN intercalado determinada sobre las perlas magnéticas se separa a continuación mediante el uso de un electrodo magnético basado en compuesto de grafito-epoxi. La detección electroquímica se consigue finalmente por un marcador de enzima, anti-digoxigenina peroxidada de rábano picante (HRP).

D05 describe un procedimiento para la detección inmunoquímica de un analito sin llevar a cabo etapas de lavado o de separación de los distintos compuestos utilizados. En este procedimiento se lleva a cabo :

- 1- Una inmovilización de un primer elemento participante en la unión, sin marcar, específico para el analito, en una fase sólida, presente en forma de partículas.
- 2- La adición de la muestra al elemento inmovilizado sin marcar, y primera incubación
- 3- Adición de una segunda sustancia de detección marcada, y segunda incubación.
- 4- Precipitación de la fase sólida por adición de determinadas sustancias
- 5- Centrifugación y transferencia de al menos una parte del sobrenadante formado en la anterior etapa a una cámara de medición
- 6- Reacción de detección en esta segunda cámara y determinación de la concentración del analito.

Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención se comprueba que D01 divulga un procedimiento inmunomagneto-electroquímico para la detección de un analito (prolactina) en una muestra haciendo uso de: partículas magnéticas, electrodos seriografiados de carbono y con utilización del enzima fosfatasa alcalina, por lo que las reivindicaciones 1-24, 29, 30, 31-36 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

La diferencia entre la presente invención y el documento D01 sería el sustrato electroquímico que comprende un compuesto indoxílico y una fuente de plata. Esta diferencia no lleva consigo efecto técnico alguno, por lo que el problema técnico fruto de esa diferencia podría plantearse como la provisión de sustratos electroquímicos alternativos a los divulgados por D01. En concreto D03 divulga el uso de nanopartículas de oro para la detección electroquímica de Salmonella, y no parece, por los datos aportados en la presente solicitud, que el uso de un compuesto indoxílico y una fuente de plata iónica traiga consigo un efecto técnico sorprendente, sobre el uso de partículas de oro, por lo que las reivindicaciones 25-28 se consideran una mera alternativa de realización obvia para el experto en la materia, que carecería de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.

El solicitante declara en la descripción que frente a los sistemas de detección sin lavado que utilizan o no magnetismo, pero que se basan en un sistema de detección óptico, por ejemplo por utilizar marcadores luminiscentes o fluorescentes que conllevan numerosos interferentes de la matriz, la presente solicitud aporta un sistema de detección electroquímica que comprende la medición sobre la capa solida de un electrodo de un producto rédox que optimiza la eficacia de la detección. Sin embargo D03 muestra un biosensor electroquímico para la detección directa de un analito. Desde esta planteamiento, las reivindicaciones 1-36 también carecerían de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986, puesto que el efecto técnico deseado, producto de la diferencia planteada por el solicitante, ya es conocido y no aportaría una contribución sobre el estado de la técnica, representado por D03.