

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 214**

21 Número de solicitud: 201330220

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

19.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.02.2015

Fecha de la concesión:

26.10.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.11.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070121

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

DOMÍNGUEZ CAÑAS, Elena;
NARVÁEZ GARCÍA, Arantzazu y
JIMÉNEZ CENTELLES, Javier

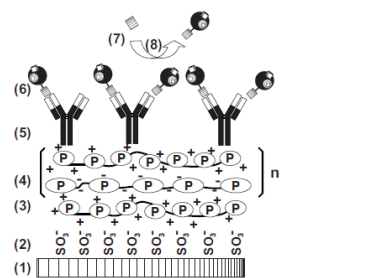
74 Agente/Representante:

DÍAZ DE BUSTAMANTE TERMINEL, Isidro

54 Título: **DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR Y MÉTODO DE CONSTRUCCIÓN DEL MISMO**

57 Resumen:

Dispositivo analítico inmunosensor y método de construcción del mismo basado en la deposición secuencial de monocapas de polímeros y elementos de afinidad, creando arquitecturas sensoras autoensambladas, constituyendo una superficie transductora cubierta por monocapas de polímeros (redox o no redox) sobre la que se depositan submonocapas de elementos de afinidad de anticuerpo, para posteriormente realizar la reacción de afinidad con un inmunoconjugado marcado con un trazador que es una enzima (redox o no redox). La señal se puede transducir de manera electroquímica, óptica, y/o piezoeléctrica.



Legenda
 (HS-CH₂-SO₃⁻) P⁺ P⁻ Trazado enzimático Anticuerpo Analito
 Mercapto derivado Polielectrolito catiónico Polielectrolito aniónico

FIG. 1

ES 2 530 214 B1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo analítico inmunosensor y método de construcción del mismo

5 OBJETO DE LA INVENCION

La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a un dispositivo analítico inmunosensor y al método de construcción de dicho dispositivo.

10 Más en particular, el objeto de la invención se centra en un dispositivo analítico inmunosensor basado en la deposición secuencial de monocapas autoensambladas de polímeros y elementos de afinidad, aplicable para la detección y cuantificación de cualquier analito o antígeno diana en una muestra líquida, y que hace posible realizar el ensayo por desplazamiento, minimizar la adsorción no específica y disminuir por tanto el límite de detección, para todo lo cual
15 dicho dispositivo se configura a partir de una superficie transductora cubierta por monocapas de polímeros (redox o no redox) sobre la que se depositan submonocapas de elementos de afinidad, para posteriormente realizar la reacción de afinidad con un inmunoconjugado marcado con una enzima o proteína (redox o no redox), permitiendo dicho método de construcción del dispositivo desarrollar inmunosensores “a la carta”, al poder transducir la señal de manera electroquímica,
20 óptica, y/o piezoeléctrica.

CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCION

El campo de aplicación de la presente invención se enmarca dentro del sector de la
25 industria dedicada a la fabricación de dispositivos analíticos, estando especialmente centrado en el ámbito de los sensores, sondas, sistemas y métodos de detección y cuantificación de analitos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 Como es sabido, los sensores e inmunosensores constituyen dispositivos de análisis que se configuran como una herramienta analítica fiable y sencilla que, además, presenta la ventaja de ser barata, portátil, selectiva, de fácil manejo y que requiere de pocos microlitros de muestra para determinar un parámetro concreto.

35 De manera general un sensor o biosensor químico es cualquier dispositivo miniaturizado capaz de responder de manera inequívoca a un analito concreto en el seno de una muestra compleja. Consta, esencialmente, de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el analito y concede selectividad al sensor, y el transductor que permite convertir esa interacción en una señal analítica.

Por su parte, un inmunosensor es un biosensor en el cual el componente biológico es un inmunorreactivo. Generalmente el elemento objetivo es el antígeno (el analito o el hapteno) y el anticuerpo se adhiere al transductor, aunque en algunos casos se obtiene una mejor
5 respuesta cuando el analito, o una forma modificada de él, se adhiere al transductor.

Recientemente el diseño de los biosensores se ha visto implementado por la incorporación de la microelectrónica, las nanotecnologías y los biomateriales mejorando así sus características analíticas y dando lugar a una herramienta clave en aquellos casos donde se
10 requiera una toma de decisiones rápida.

La posibilidad de ofrecer información a tiempo real, su sencillez, su uso por personal no especializado y su capacidad para la monitorización en el tiempo, son características que están proporcionando claras ventajas sobre herramientas analíticas convencionales.
15

En este sentido, se necesitan sistemas versátiles que puedan ser diseñados “ad hoc”, y por tanto permitan una sencilla implantación. Los (bio)sensores construidos sobre plataformas heterofuncionales permiten identificar y cuantificar compuestos de diferente naturaleza, utilizando elementos de biorreconocimiento en combinación con diferentes técnicas de transducción e integración de las señales obtenidas.
20

Entre dichas técnicas destaca la técnica capa por capa (LbL “*Layer-by-layer*”), que es una técnica en la que las películas se forman depositando capas alternas de materiales de carga opuesta con pasos de lavado intermedios. Las bicapas y los pasos de lavado se pueden realizar de muchas maneras diferentes, incluyendo el recubrimiento por inmersión, recubrimiento por rotación, recubrimiento por pulverización y técnicas de flujo. Las ventajas que ofrece sobre otros métodos de deposición de película delgada es que es extremadamente simple y barata. Hay una amplia variedad de materiales que pueden ser depositados por LbL incluyendo polímeros, metales, cerámicas, nanopartículas y moléculas biológicas. Otra cualidad importante de LbL es el
25 alto grado de control sobre el grosor, que surge debido al crecimiento lineal de las películas con el número de bicapas. Ya que cada bicapa puede ser del orden de unos pocos nm, este método ofrece un fácil control sobre el espesor de la estructura.
30

El objetivo de la presente invención es, pues, el desarrollo de un método para la construcción de un dispositivo analítico que describe la incorporación de elementos de detección y soporte, mediante su inmovilización física creando una interfase tridimensional. Esta arquitectura sensora objeto de la presente invención permitirá, por ejemplo, la detección de sustancias de interés en el campo agroalimentario, biosanitario y medioambiental con cualquier tipo de
35

transducción.

Como referencia al estado de la técnica, debe mencionarse la existencia de diferentes registros de patente que divulgan dispositivos analíticos del tipo que aquí concierne, siendo los más próximos los siguientes:

- Patente US 2002/0137193 A1 26.09.2002 que hace referencia a un sistema de ensayo para la detección de una reacción de afinidad de una pareja de ligando-receptor (primer componente y segundo componente), el cual consiste en revestir el electrodo con un polímero redox reticulado que contiene un agente de unión, un sustrato que genera una enzima, (ambos unidos covalentemente al hidrogel redox) y el primer componente de la pareja receptor-ligando. El complejo que se forma, genera una señal eléctrica cuando se aplica un potencial al electrodo, de manera que la señal eléctrica generada se encuentra relacionada con la presencia o cantidad del segundo componente en la muestra. El primer componente se encuentra inmovilizado en un polímero redox sobre el electrodo. El polímero redox puede ser un polímero de poli(vinil piridina) (poly (4-vinyl pyridine)). Además dichos polímeros redox se pueden encontrar formando complejos con metales de transición tales como osmio.

- Patente US 5534132 A 09.07.1996 que describe un biosensor amperométrico para la detección de reacciones de afinidad. Se trata de un electrodo que tiene su superficie sustancialmente cubierta con una lámina de traducción que comprende un hidrogel polímero tridimensional en el que se encuentra inmovilizada una unidad de unión (SBU, selective binding unit) o su complementaria. El agente de unión selectivo sirve para introducir el componente complementario marcado con la enzima redox en el hidrogel, generándose, de este modo, una respuesta amperométrica a través de una reacción de reducción/oxidación electrocatalítica del sustrato de enzima y una transducción de la actividad enzimática redox a través del hidrogel al electrodo. Los polímeros redox utilizados en dicho documento son, entre otros, polímeros derivados de poli(vinil piridina) con complejos de osmio cuaternizados con bromuro de bromoetilamina, para formar un polímero redox reticulable hidrofílico.

El documento PN - US2007092973 A1 divulga un film sensor de magnesio formado por un indicador, una sal cuaternaria de amonio, fosforo o imidazol, un surfactante y un ácido. Entre los compuestos químicos que divulga la invención, se encuentra el polímero de carga positiva polietilenimina, y varios agentes de entrecruzamiento derivados de los poli etilenglicoles.

El documento PN - WO0130495 A1 divulga una resina de cambio iónico donde aparecen como agentes de entrecruzamiento de superficie el etilenglicol diglicidil éter y la polietilenimina entre otros. Sin embargo, no se menciona su utilización como sensor

amperométrico para la detección de iones magnesio.

Además, como publicaciones de literatura científica, cabe mencionar la existencia de los siguientes documentos:

5

Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures. ARANTZAZU NARVAEZ ET AL. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS vol. 15, 2000, páginas 43-52, en el que se describen biosensores basados en la autodeposición de polielectrolitos mediante la técnica LbL (layer-by-layer) sobre la superficie de un electrodo de oro cargado negativamente. Se utiliza también un polímero redox basado en Os.

10

Electrostatic assemblies for bioelectrocatalytic and bioelectronic applications. ELENA DOMINGUEZ ET AL. ELECTROANALYSIS vol 18, 2006, páginas 1871-1878, que trata sobre el uso de la tecnología de ensamblaje LbL (layer -by-layer) de electrolitos para la transducción de reacciones catalíticas y de afinidad.

15

Surface charge effects on the redox switching of LbL self-assembled redox polyelectrolyte multilayers. MARIO E. TAGLIAZUCCHI, ERNERO J. CALVO. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, vol.599, 2007, páginas 249-259, que se refiere a estudios que se llevaron a cabo sobre el efecto de la carga superficial en la transferencia de electrones y la propagación de la carga en multicapas de poli-electrolitos redox autoensamblados electroquímicamente por la técnica LbL (layer by layer).

20

El artículo "Amperometric techniques in flow-injection analysis: determination of magnesium in sera and natural waters" doi:10.1016/0003-2670(92)85131-O divulga una determinación amperométrica de ion magnesio en serum o aguas naturales, siendo el indicador utilizado Eriochrome Black T. En nuestra opinión esta patente no tiene ninguna relación con la que se solicita.

25

A la vista de los documentos citados se constata, como era de esperar, que existen en el estado de la técnica inmunosensores electroquímicos basados en la deposición de monocapas de polielectrolitos, así como distintos tipos de sensores amperométricos, sin embargo, ninguna de las invenciones y documentos citados, tomados por separado o en combinación, describe concretamente las características técnicas y constitutivas del dispositivo analítico inmunosensor y el método de construcción de la presente invención, según se reivindica.

30

35

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Así, lo que la presente invención propone es el desarrollo de un dispositivo analítico que se configura como soporte universal para la construcción de inmunosensores “quasi-reagentless y/o reagentless”, ya que se refiere al desarrollo de un método para la construcción de inmunosensores basados en la deposición secuencial de monocapas de polímeros y elementos de afinidad, creando arquitecturas sensoras autoensambladas. Esta construcción se caracteriza por la deposición de una pequeña cantidad de elementos de afinidad que permite la detección del analito en cuestión, mediante un ensayo por desplazamiento.

Más en concreto, el objeto de la invención consiste en un dispositivo analítico constitutivo de una superficie transductora cubierta por monocapas de polímeros (redox o no redox) sobre la que se depositan submonocapas de elementos de afinidad, para posteriormente realizar la reacción de afinidad con un inmunoconjugado marcado con una enzima (redox o no redox).

Estas estructuras permiten desarrollar inmunosensores “a la carta”, pudiéndose transducir la señal de manera electroquímica, óptica, y/o piezoeléctrica. Por lo tanto la plataforma sensora desarrollada permite diseñar sensores electroquímicos (incluyen sensores amperométricos, potenciométricos, conductimétricos e impedimétricos), sensores ópticos (basados en fibras ópticas, resonancia de plasmón superficial, sensores de onda evanescente), y sensores piezoeléctricos (incluyen sensores de microbalanza y dispositivos de onda acústica), entre otros, estando su aplicación destinada, por ejemplo, a permitir la detección de sustancias de interés en el campo agroalimentario, biosanitario y medioambiental.

La presente invención describe, pues, un método universal para la construcción de inmunosensores basados en interacciones electrostáticas en los que se realiza una deposición secuencial de los distintos elementos. Con ello, el dispositivo preconizado presenta la ventaja de que permite la detección de un analito directamente en un solo paso, sin necesidad de utilizar ningún inmunoreactivo adicional y en un intervalo de tiempo no mayor de 30 minutos. Esta disposición de polímeros crea una interfase tridimensional que permite la deposición de una submonocapa de anticuerpos. El dispositivo analítico desarrollado hace posible realizar el ensayo por desplazamiento, minimizar la adsorción no específica y disminuir por tanto el límite de detección. La muestra es incubada directamente sobre el dispositivo desarrollado y, tras un lavado y la adición del sustrato, se obtiene una respuesta que puede ser electroquímica, óptica o microgravimétrica, o una combinación de ambas.

Conviene destacar que el dispositivo analítico preconizado o interfase sensora

objeto de la invención permite utilizar una transducción óptica, electroquímica y/o microgravimétrica, según requiera el tipo de análisis. Además, el método de construcción del mismo permite depositar una submonocapa de cualquier anticuerpo, por lo que el dispositivo resultante puede detectar y cuantificar cualquier analito o antígeno diana, para el cual tenga
5 afinidad el anticuerpo elegido.

En definitiva, la invención propone la construcción de un inmunosensor rápido, compacto, y de bajo coste, configurándose como una estructura sensora que, ventajosamente, permite analizar la muestra en un único paso de incubación, sin necesidad de añadir ningún
10 inmunoreactivo.

Entrando más detalladamente en las características de la invención, que la deposición secuencial de polímeros de carga opuesta permite la deposición controlada del anticuerpo de tal suerte que la interfase así desarrollada permite minimizar la adsorción no
15 específica.

En concreto, el dispositivo analítico se construye mediante la deposición de multicapas de polímeros de carga opuesta. Para ello se produce la quimiosorción de un mercapto derivado cargado negativamente (HS-CH_x-SO₃⁻) como por ejemplo MPS, en la superficie de un
20 electrodo de oro o de cualquier otra superficie transductora. Sobre esta monocapa se deposita un polímero catiónico (redox o no) poliaminado y/o derivados de poli(vinil piridina) que permite la deposición controlada de una submonocapa de anticuerpo, dando lugar a la interfase sensora. Posteriormente se realiza la incubación con el inmunoconjugado el cual está marcado con una enzima que puede ser redox o no redox (peroxidasa, alcalino fosfatasa, tirosinasa, albúmina etc.).
25 El sensor construido puede ser almacenado en seco a 4°C por un periodo mínimo de 6 meses antes de usarlo.

La detección del analito deseado se realiza tras la incubación del sensor directamente con la muestra, donde el analito presente desplaza el inmunoconjugado previamente
30 unido al anticuerpo dando lugar a una señal microgravimétrica o un cambio de Unidades de Resonancia, o bien tras un lavado y la adición del sustrato a la producción de una señal óptica o electroquímica.

Con el fin de demostrar la universalidad del dispositivo analítico desarrollado en cuando al tipo de transducción, se describen a continuación tres ejemplos de transducción
35 diferentes:

En un primer ejemplo, el dispositivo analítico contiene como polímero catiónico un

polímero redox derivado de la poli(vinil piridina), (poly[(vinylpyridine)Os(bpy)₂Cl₂]) cuaternizado con bromoetilamina y el marcaje del inmunoreactivo se realiza con una peroxidasa (HRP). El desplazamiento del inmunoreactivo unido al anticuerpo por parte del analito presente en la muestra da lugar a una disminución en la respuesta amperométrica, tras un paso intermedio de lavado. En este caso se produce una comunicación electroquímica entre el polímero redox y la enzima de marcaje con una alta eficacia cuando se añade el sustrato de la enzima. Esta alta eficacia en la comunicación electroquímica se produce como resultado de las interacciones electrostáticas entre los módulos o capas de polímeros. La señal resultante de la reducción electrocatalítica del sustrato (H₂O₂) es inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.

En un segundo ejemplo se muestra la transducción óptica, tanto mediante la técnica de resonancia de plasmón superficial (SPR) como espectrofotométrica. Para el tipo de transducción por SPR el polímero utilizado es catiónico (poliamina o derivado de poli(vinil piridina) cuaternizado con bromoetilamina, redox o no) y un marcaje del inmunoreactivo de una proteína o enzima (BSA, HRP, fosfatasa alcalina....). En el primer caso el desplazamiento del inmunoconjugado por parte de la muestra produce una disminución de las unidades de resonancia. Esta disminución es mayor cuanto más analito exista en la muestra. El análisis se realiza en un único paso en el que no es necesario la adición de ningún reactivo, obteniéndose la respuesta en tiempo real.

En el caso de la transducción espectrofotométrica la enzima de marcaje es cualquier enzima que catalice la transformación a un producto coloreado como puede ser una HRP o fosfatasa alcalina. Para ello es necesario un paso de lavado tras la incubación de la muestra y la adición de un sustrato, que una vez catalizado por la enzima resulte en un producto coloreado. La señal espectrofotométrica en este caso es inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra.

Por último en un tercer ejemplo se muestra un dispositivo con transducción microgravimétrica. Al igual que en el caso de la técnica de SPR, el polímero catiónico puede no ser redox y la molécula de marcaje puede ser una enzima o una proteína de gran peso molecular como BSA. La medición del analito se realiza en tiempo real tras la incubación con la muestra, donde el analito presente desplazará al inmunoconjugado produciendo un cambio de frecuencia proporcional a la concentración. Adicionalmente cuando el inmunoconjugado es una HRP o alcalino fosfatasa la señal puede ser amplificada mediante un sustrato que al ser catalizado por la enzima precipite.

En definitiva, el dispositivo analítico inmunosensor preconizado, siendo del tipo

basado en la deposición de monocapas, capas de polímeros y elementos de afinidad sobre una superficie transductora, presenta la particularidad de estar configurado a partir de una estructura polimérica que conforma una interfase sensora en la que se deposita una submonocapa de anticuerpo, donde dicho anticuerpo está unido por afinidad con el inmunoconjugado, y donde
5 dicho inmunoconjugado, a su vez, está marcado por un trazador.

El inmunoconjugado es un pseudo-antígeno o un antígeno modificado marcado con un trazador. El trazador puede ser una enzima o subunidad enzimática, una proteína no catalítica, un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo. La enzima o proteína puede ser una BSA, HRP,
10 Tirosinasa o una fosfatasa alcalina. La estructura polimérica contiene un polímero derivatizado redox con osmio, o rutenio o derivados del ferroceno como centros redox, o no redox catiónico ramificado o no, como la Polietilenimina o cualquier polímero cuaternizado de poli(vinil piridina) con bromoetilamina, y se puede repetir múltiples veces (n veces) al incorporar un polímero de carga opuesta. Finalmente, la superficie transductora puede ser del tipo (X-CH₂-SO₃⁻) donde X
15 es un grupo tiol, o un amino o un carboxílico e Y va del 1-6, como puede ser el MPS.

Por su parte, el analito es detectado o cuantificado electroquímicamente, cuando la estructura polimérica es un polímero redox, el trazador una peroxidasa y el sustrato H₂O₂; mediante balanza de Cristal de cuarzo, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o no
20 redox catiónico, y el trazador es una enzima o proteína; mediante SPR, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o no redox catiónico, y el trazador es una enzima o proteína; mediante trasducción óptica, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o no redox catiónico y el trazador es una peroxidasa o fosfatasa alcalina o Tirosinasa.

En la transducción electroquímica u óptica, se contempla una incubación de una gota de muestra, pretratada o no, por un tiempo no inferior a 0,5 minutos, un lavado con agua y la adición de un sustrato apropiado al trazador; y en una detección o cuantificación en tiempo real, mediante balanza de Cristal de Cuarzo o SPR, se contempla una incubación de una gota de muestra, pretratada o no.
25

30

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, de un juego de esquemas, en los que
35 con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

La figura número 1.- Muestra una representación esquemática del dispositivo

analítico objeto de la invención, apreciándose en ella la interfase sensora de capas autoensambladas y el desplazamiento del analito.

5 La figura número 2a.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del inmunosensor amperométrico para residuos de antibióticos y corticoides en medio tamponado.

10 La figura número 2b.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del inmunosensor amperométrico para residuos de antibióticos y corticoides en una muestra real: leche.

La figura número 2c.- Muestra una gráfica de la estabilidad a la conservación del inmunosensor amperométrico para cuatro analitos diferentes.

15 La figura número 3.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del inmunosensor óptico con transducción SPR para sulfapiridina en medio tamponado.

La figura número 4.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del inmunosensor óptico para dexametasona.

20 La figura número 5.- Muestra una gráfica de la curva de calibrado del inmunosensor piezoeléctrico para sulfapiridina.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

25 Como se muestra en la figura 1, esta invención describe el método para la construcción de un inmunosensor que incluye una superficie sensora modificado por una monocapa de un mercapto derivado cargado negativamente (HS-CH_x-SO₃-), como por ejemplo MPS, al que se le ha depositado un monocapa de un polímero catiónico poliaminado y/o derivado de poli(vinil piridina), el cual puede contener Os o Ru como centro redox. (Esta capa catiónica se
30 puede repetir n veces depositando entre ellas una capa de polímero aniónico, n puede tener un valor de 0 a 10). Tras esta capa de polímero catiónico se deposita una submonocapa de anticuerpos, dando lugar a la interfase sensora. Posteriormente se realiza la incubación con el inmunoconjugado el cual está marcado con una enzima que puede ser redox o no redox (peroxidasa, alcalino fosfatasa, tirosinasa, albúmina etc..). El sensor construido puede ser
35 almacenado en seco a 4°C por un periodo mínimo de 6 meses antes de usarlo.

La detección del analito deseado se realiza tras la incubación del sensor directamente con la muestra, donde el analito presente, desplaza el inmunoconjugado o trazador

previamente unido al anticuerpo dando lugar a una señal microgravimétrica o un cambio de Unidades de Resonancia, o bien tras un lavado y la adición del sustrato a la producción de una señal óptica o electroquímica.

5 Esta interfase sensora permite:

- Utilizar una transducción óptica, electroquímica y/o microgravimétrica, según requiera el tipo de análisis.

10 - Depositar una submonocapa de cualquier anticuerpo, por lo que el dispositivo resultante puede detectar y cuantificar cualquier analito o antígeno diana, para el cual tenga afinidad el anticuerpo elegido.

- Analizar la muestra en un único paso de incubación, sin necesidad de añadir ningún inmunoreactivo.

15

- En la mayoría de los casos no se necesita ningún tratamiento previo de la muestra.

20 Con el fin de demostrar la universalidad del dispositivo analítico desarrollado, en cuando al tipo de transducción se describen tres ejemplos de transducción diferentes, así como la deposición de diferentes anticuerpos, permitiendo la detección y cuantificación de diferentes analitos o antígenos diana.

25 La figura 1 representa un esquema del dispositivo analítico objeto de esta invención. El método desarrollado para su construcción se describe a continuación: sobre una superficie sensora (1) (oro, platino, vidrio, carbón vitrificado.....) se deposita una monocapa de un mercapto derivado (2) que debe estar cargado negativamente, como MPS, para ello la superficie se incubó con 4 μL de una disolución 1:1 (EtOH/H₂O) de 3-mercapto-1-propano ácido sulfónico 1 mM durante 12 horas a 6°C. (en la figura 1 la capa de mercapto se ha representado como SO₃⁻).

30 Transcurrido el periodo de incubación, los electrodos se sometieron a un abundante lavado con etanol seguido de agua desionizada. Posteriormente se deposita por interacciones electrostáticas un polímero redox, poli (vinil piridina) derivatizado con bromoetilamina que contiene complejos de osmio bipyridínicos (PR⁺) (3). La inmovilización del polímero redox catiónico se realizó por la incubación de 2 μL de una disolución acuosa de polímero de 1 mg mL⁻¹ durante 2 horas,

35 protegidos de la luz y bajo una temperatura controlada de 27°C. Posteriormente, se lavó con agua desionizada. Esta capa puede hacerse crecer las veces necesarias intercalando un polielectrolito (4) que revierta la carga, como el sulfonato de poliestireno (PSS), a una concentración de 250 μM sobre (n puede tener valores entre 0 y 10). Para completar la interfase sensora se depositan los

anticuerpos (5) a concentración variable, del orden de $\mu\text{g mL}^{-1}$ dependiendo del anticuerpo utilizado en el desarrollo del sensor. Para la incubación del anticuerpo se añadieron 2 μL de una disolución acuosa del anticuerpo durante 2 horas, bajo una temperatura controlada de 27°C . Esta interfase sensora (1-5) es común a todos los dispositivos desarrollados e independientemente del tipo de transducción utilizado.

Sobre esta interfase se unen por reacción de afinidad sus trazadores (6) o inmunocombinados marcados específicamente según el tipo de transducción deseada. La incubación de lleva a cabo con la deposición de 2 μL de la disolución del trazador enzimático a una concentración del orden de mg L^{-1} (dependiendo del trazador enzimático) disuelto en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 durante 30 minutos a 27°C .

Estos trazadores (6) son desplazados o removidos de la superficie en presencia del analito o antígeno (7) diana, permitiendo detectar y cuantificar concentraciones traza de determinados analitos diana.

En el caso de inmunosensores con detección amperométrica, el trazador o inmunocombinado está marcado con una enzima redox, en este caso HRP (peroxidasa) que tras la adición de H_2O_2 produce una corriente amperométrica directamente proporcional a la cantidad de peroxidasa presente en el inmunosensor. El analito (7) diana presente en la muestra va a desplazar el trazador enzimático previamente unido a la interfase sensora (1-6), dando lugar a una disminución de la respuesta electroquímica, relacionada con la concentración del analito de interés. Este sistema de ensayo permite detectar el analito diana sin tratamiento previo de la muestra.

El protocolo analítico consistió en incubar las diferentes muestras en las superficies de los electrodos previamente modificados. Tras no más de 30 minutos, las superficies electrónicas se lavaron con agua desionizada y se introdujeron en una disolución sustrato, dando lugar a una respuesta amperométrica inmediata. Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una celda con una disolución reguladora de tampón fosfato 0,1 M, pH 7, en la cual se inyectó H_2O_2 a una concentración final en celda de $250 \mu\text{M}$, registrándose la corriente catódica a 0 mV vs. Ag/AgCl KCl sat.

Los inmunosensores preparados con las estructuras descritas fueron testados para la determinación de antibióticos y hormonas esteroideas en muestras de leche, empleando un inmunoensayo competitivo por desplazamiento con detección amperométrica.

Las figuras 2a y 2b ilustran una aplicación sobre superficies electrónicas de oro

serigrafiado en inmunosensores amperométricos. La figura 2A corresponde a la curva de calibrado del inmunosensor amperométrico para residuos de antibióticos y corticoides en medio tamponado. Condiciones experimentales: 250 μM H_2O_2 en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 a 27°C. Eapl: 0 mV vs. Ag/AgCl, KCl sat. Y la figura 2b corresponde a la curva de calibrado del inmunosensor amperométrico para residuos de antibióticos y corticoides en una muestra real: leche. Condiciones experimentales: 250 μM H_2O_2 en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 a 27°C. Eapl: 0 mV vs. Ag/AgCl, KCl sat. Ambas figuras relacionan la concentración de analito detectable presente en muestras dopadas en medio tamponado (figura 2ª) y en muestras de leche dopadas (figura 2b), tras el cambio en la respuesta amperométrica. De esta manera se detectaron diferentes analitos como dexametasona, sulfapiridina, ciprofloxacino y estreptomicina.

La figura 2c muestra la estabilidad de este tipo de dispositivos. Para verificar la estabilidad de los electrodos, se preparó una amplia serie de inmunosensores que fueron almacenados con todos los elementos que lo conforman durante 12 meses, secos y a 4°C de temperatura. Con el fin de establecer la estabilidad de los diferentes inmunosensores, se evaluó su respuesta máxima amperométrica.

Para la transducción óptica mediante la técnica SPR (Resonancia de Plasmón Superficial), la interfase sensora (1-6) descrita anteriormente, se unió a un inmunoconjugado o trazador marcado con una proteína en medio tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 durante 10 minutos a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. El polímero catiónico de la interfase sensora puede ser redox o no, pudiendo ser un derivado de poli(vinil piridina) poliaminado (figura 3). En este caso concreto los anticuerpos (5) fueron depositados sobre la superficie de los electrodos modificados mediante un sistema de flujo en un medio tampón acetato pH 4,5 durante 15 minutos a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Finalmente, el analito diana, en este caso sulfapiridina fue inyectado a diferentes concentraciones (0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$ to 200 mg/L) en medio tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Al inyectar el analito (7) diana, éste va a desplazar el trazador enzimático (6) previamente unido a la interfase sensora (1-6), dando lugar a una disminución de las unidades de resonancia relacionada con la concentración del analito de interés. Este sistema de ensayo permite detectar el analito diana sin tratamiento previo de la muestra.

La citada figura 3 ilustra una curva de calibrado del inmunosensor óptico con transducción SPR para sulfapiridina en medio tamponado. El analito diana, en este caso sulfapiridina fue inyectado a diferentes concentraciones (desde 0,01 $\mu\text{g}/\text{L}$ hasta 200 mg/L)(c-d-e) en medio tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En el caso de la transducción espectrofotométrica, la interfase sensora (1-6) es

unida a un inmunoconjugado o trazador marcado con una enzima que cataliza la transformación a un producto coloreado como puede ser una HRP o fosfatasa alcalina, para ello la interfase sensora se incubaron con una disolución del trazador enzimático disuelto en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 durante 30 minutos a 27°C. Transcurrido ese tiempo, los inmunosensores fueron lavados con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 y almacenados a 4°C hasta el momento de análisis.

Los inmunosensores preparados con las estructuras descritas y optimizadas fueron testados para la determinación de dexametasona en medio tamponado. Tras no más 30 minutos de incubación con las muestras, las superficies electródicas se lavaron con agua desionizada y se introdujeron en una disolución sustrato. Esta disolución fue leída espectrofotométricamente a 650nm. Este sistema de ensayo permite detectar analitos sin tratamiento previo de la muestra.

La figura 4 ilustra una un curva de calibrado del inmunosensor óptico con transducción espectrofotométrica para dexametasona en medio tamponado. Condiciones experimentales: adición sustrato 0,01% 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina y 0,004% H₂O₂ en tampón citrato pH 5,5. Lectura a 650nm.

Por último, en el caso de la transducción microgravimétrica, la interfase sensora (1-6) descrita anteriormente, se unió a un inmunoconjugado o trazador marcado con una proteína en medio tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 durante 30 minutos a 27°C. Transcurrido ese tiempo, los inmunosensores fueron lavados con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0 y almacenados a 4°C hasta el momento de análisis.

Los inmunosensores preparados con las estructuras descritas y optimizadas fueron testados para la determinación de sulfapiridina en medio tamponado. La medición del analito se realiza en tiempo real tras la incubación con la muestra, donde el analito presente desplazará al inmunoconjugado produciendo un cambio de frecuencia proporcional a la concentración. Adicionalmente cuando el inmunoconjugado es una HRP o alcalino fosfatasa la señal puede ser amplificada mediante un sustrato que al ser catalizado por la enzima precipite.

Una curva de calibrado del inmunosensor desarrollado para sulfapiridina con transducción microgravimétricas en un medio tamponado se muestra en la figura 5. Condiciones experimentales: incubación 100 µL de muestra en medio tamponado 0,1 M pH 7,0.

Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, no se considera necesario hacer más extensa su explicación para que cualquier experto en la materia comprenda su alcance y las ventajas que de ella se derivan,

haciéndose constar que, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba siempre que no se altere, cambie o modifique su principio fundamental.

5

REIVINDICACIONES

1.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, aplicable para la detección y cuantificación de cualquier analito o antígeno diana en una muestra líquida, que siendo del tipo
5 basado en la deposición de capas y/o monocapas de polímeros y elementos de afinidad sobre una superficie transductora, está **caracterizado** porque se configura a partir de una estructura polimérica que conforma una interfase sensora en la que se deposita una submonocapa de anticuerpo; porque dicho anticuerpo está unido por afinidad con el inmunoconjugado; y porque dicho inmunoconjugado, a su vez, está marcado por un trazador, permitiendo la detección del
10 analito mediante ensayo por desplazamiento.

2.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el inmunoconjugado es un pseudo-antígeno o un antígeno modificado marcado con un trazador.
15

3.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el trazador es una enzima o subunidad enzimática, una proteína no catalítica, un cromóforo, un fluoróforo o un radioisótopo.
20

4.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la enzima o proteína es una BSA, HRP, Tirosinasa o una fosfatasa alcalina.

5.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque la estructura polimérica contiene un polímero redox con osmio, o rutenio o derivados del ferroceno como centros redox.
25

6.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la estructura polimérica conteniendo el polímero redox, incorporando un polímero de carga opuesta, se repite n veces.
30

7.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque la estructura polimérica contiene un polímero no redox catiónico ramificado o no, como la Polietilenimina, o cualquier polímero cuaternizado de poli(vinil piridina) con bromoetilamina.
35

8.- DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la superficie transductora es del tipo (X-CH₂-SO₃-) donde X es un grupo tiol, o un amino o un carboxílico e Y va del 1-6, como puede ser el MPS.

9.- METODO DE CONSTRUCCION DE UN DISPOSITIVO ANALÍTICO INMUNOSENSOR, tal como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado** porque comprende:

5

- La deposición de multicapas de polímeros de carga opuesta, para lo cual se produce la quimiosorción de un mercaptoderivado cargado negativamente, en la superficie de una superficie transductora.

10

- Sobre esta monocapa se deposita un polímero catiónico (redox o no) poliaminado y/o derivados de poli(vinil piridina) (redox o no) que permite la deposición controlada de una submonocapa de anticuerpo, dando lugar a la interfase sensora.

15

- Posteriormente se realiza la incubación con el inmunoconjugado, el cual está marcado con una enzima que puede ser redox o no redox (peroxidasa, alcalino fosfatasa, tirosinasa, albúmina etc.).

10.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el dispositivo se almacena en seco y refrigerado.

20

11.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque, para la detección del analito deseado, se realiza la incubación del sensor directamente con la muestra, donde el analito presente desplaza el inmunoconjugado previamente unido al anticuerpo, dando lugar a una señal microgravimétrica o un cambio de Unidades de Resonancia.

25

12.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque, para la detección del analito deseado, se realiza un lavado y la adición del sustrato, dando lugar a la producción de una señal óptica o electroquímica.

30

13.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el analito es detectado o cuantificado electroquímicamente, siendo la estructura polimérica un polímero redox, el trazador una peroxidasa y el sustrato H₂O₂.

35

14.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el analito es detectado o cuantificado mediante balanza de Cristal de cuarzo, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o no redox catiónico, y el trazador es una enzima o proteína.

15.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el analito es detectado o cuantificado mediante SPR, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o

no redox catiónico, y el trazador es una enzima o proteína.

5 16.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el analito es detectado o cuantificado mediante trasducción óptica, cuando la estructura polimérica es un polímero redox o no redox catiónico y el trazador es una proteína (peroxidasa o fosfatasa alcalina o Tirosinasa, un cromóforo, un fluoróforo o una nanopartícula.

10 17.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque, en la transducción electroquímica u óptica, comprende:

- Una incubación de una gota de muestra, pretratada o no, por un tiempo no inferior a 0,5 minutos, un lavado con agua y la adición de un sustrato apropiado al trazador.

15 18.- MÉTODO, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque, en una detección o cuantificación en tiempo real, mediante balanza de Cristal de Cuarzo o SPR, comprende:

- Una incubación de una gota de muestra, pretratada o no.

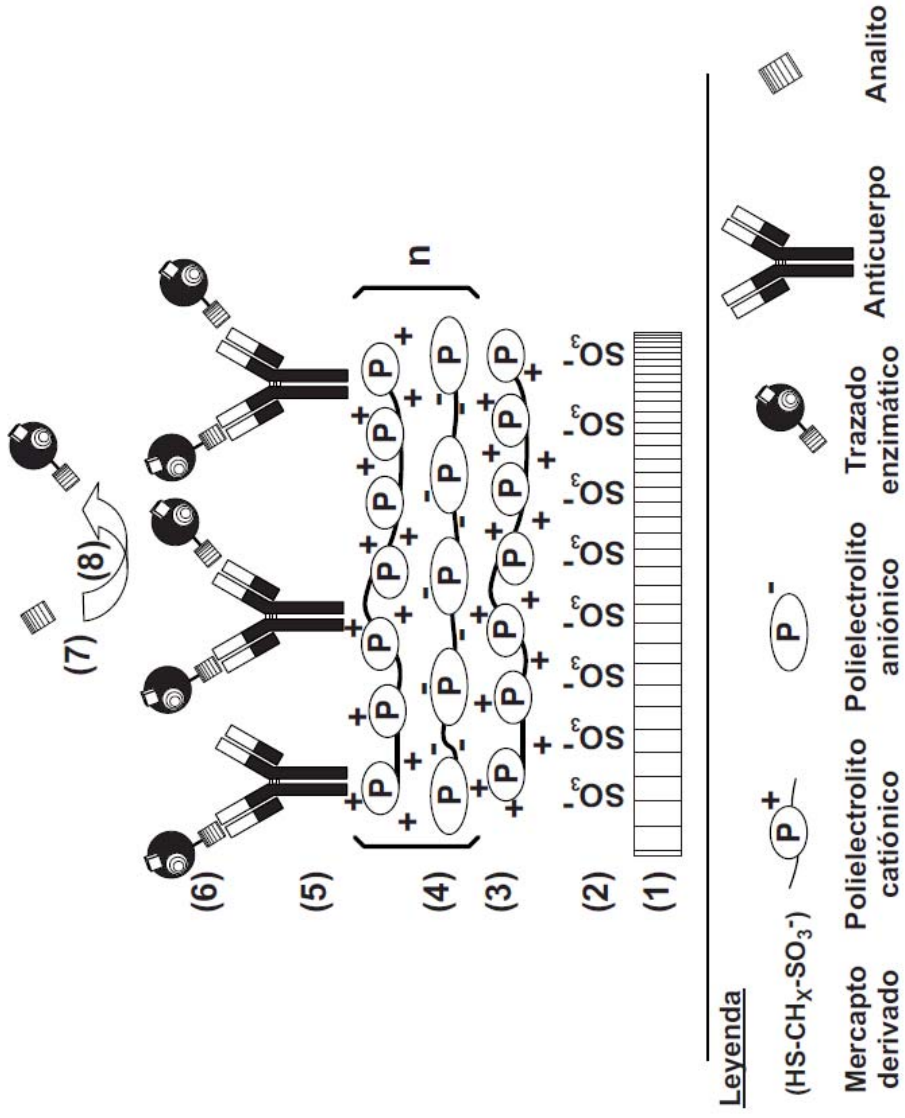
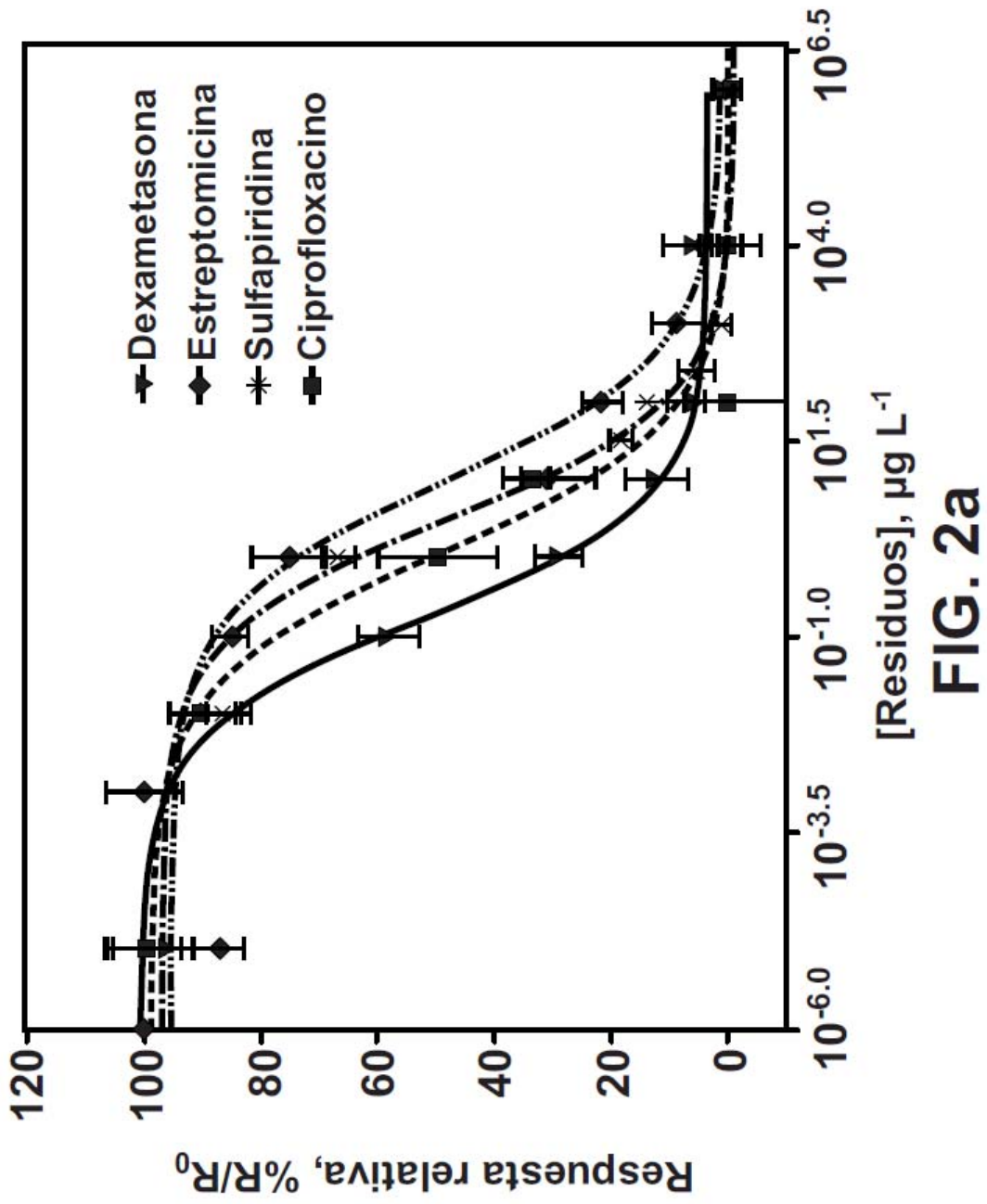
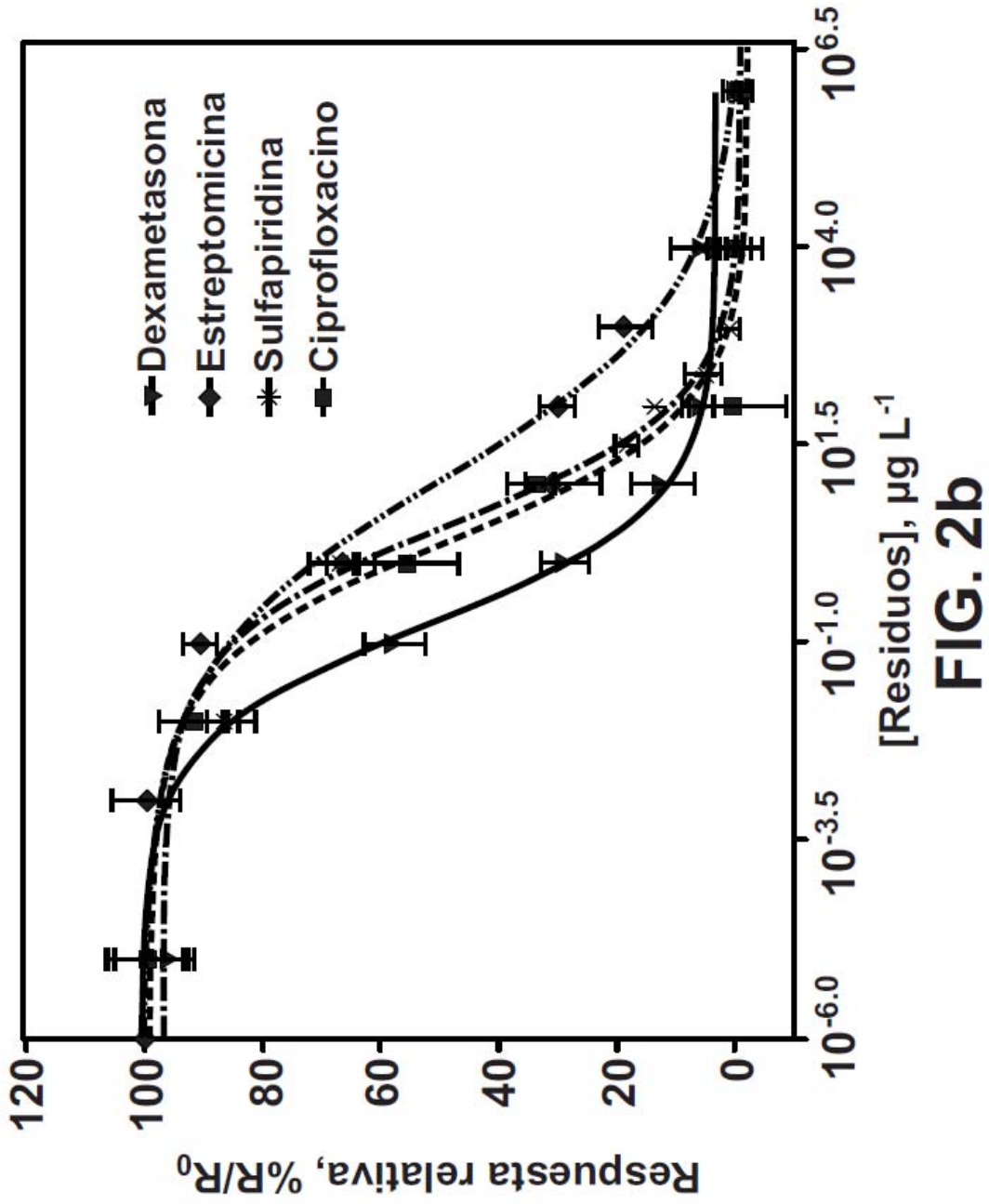
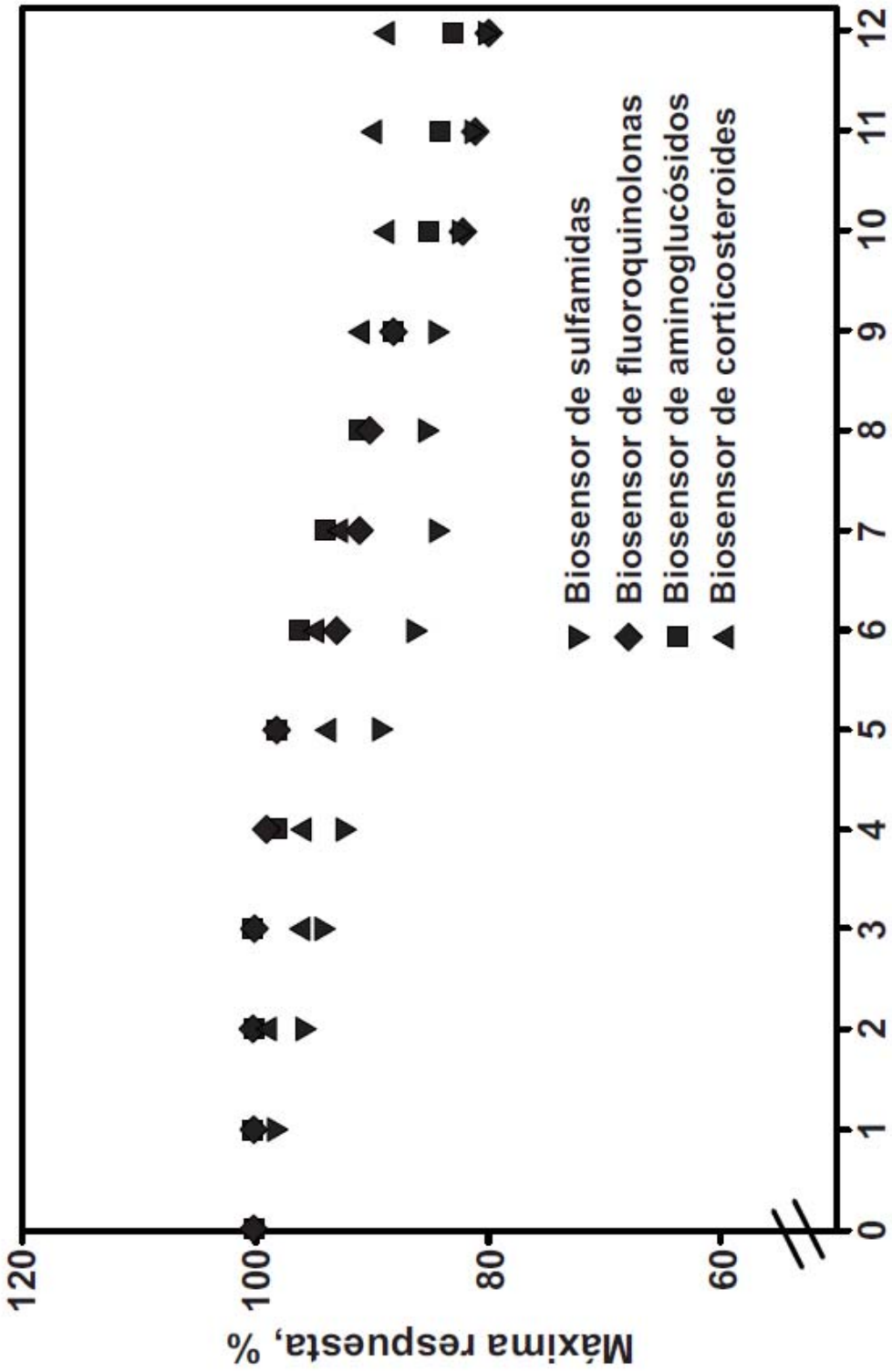


FIG. 1







Tiempo, meses

FIG. 2C

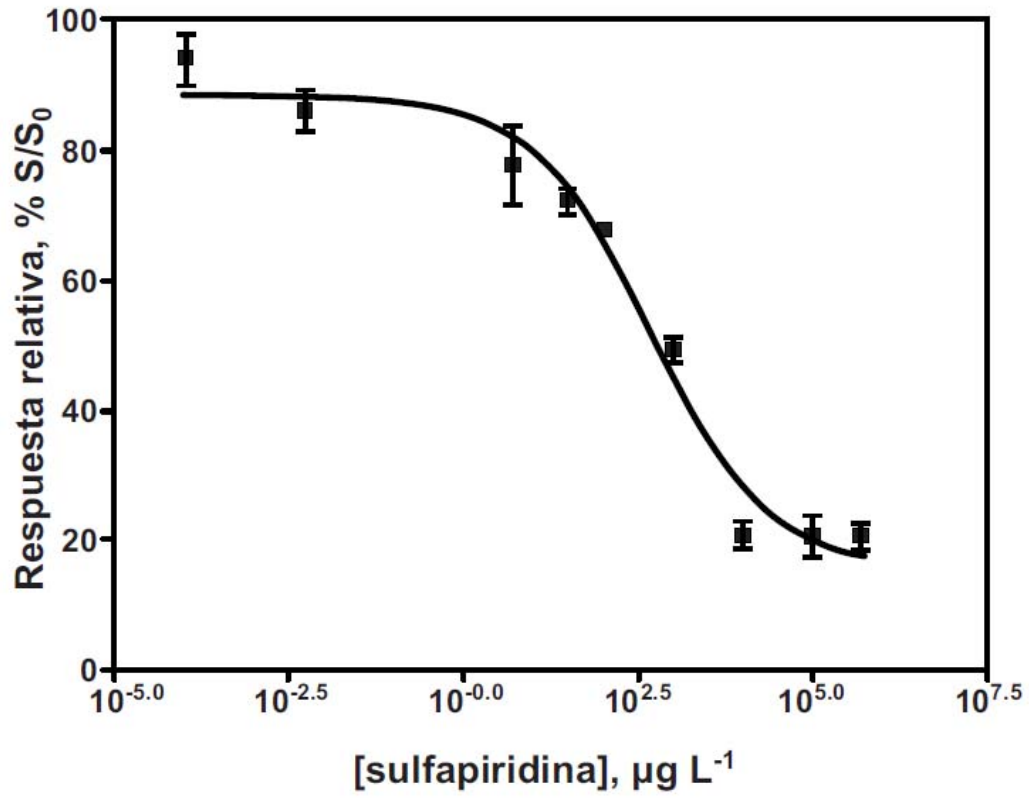
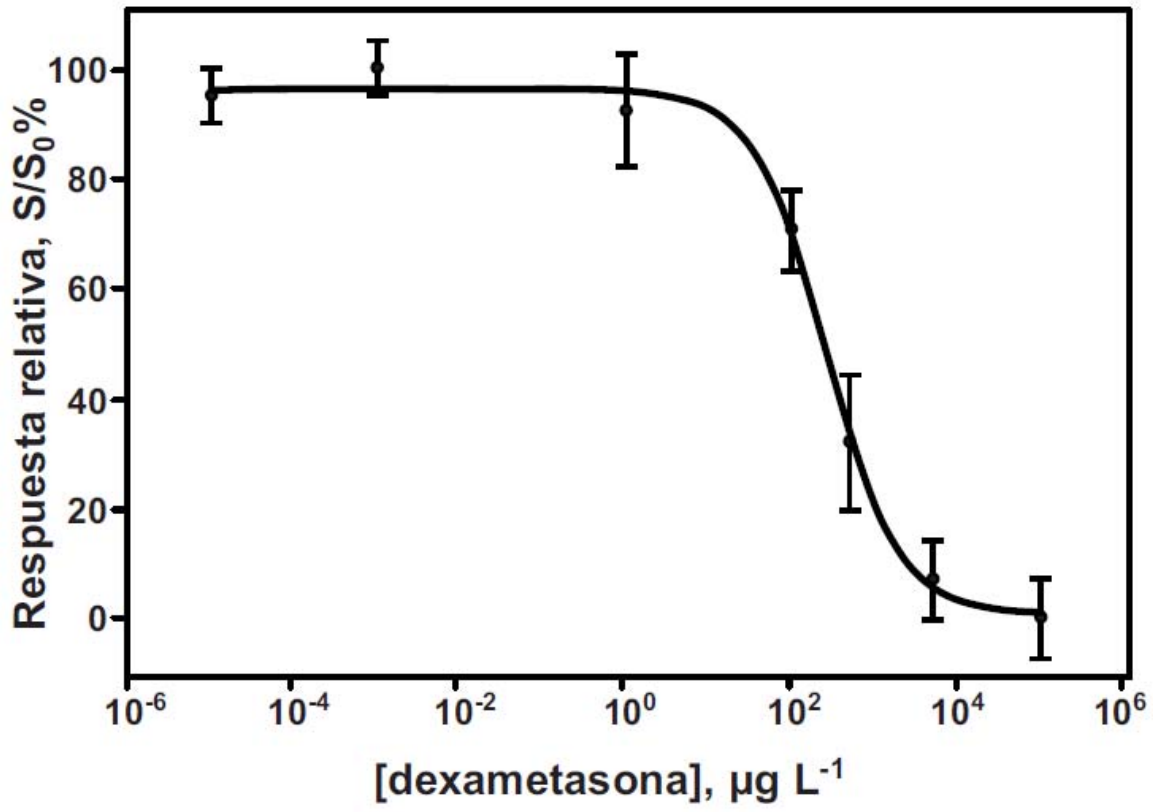


FIG. 3

**FIG. 4**

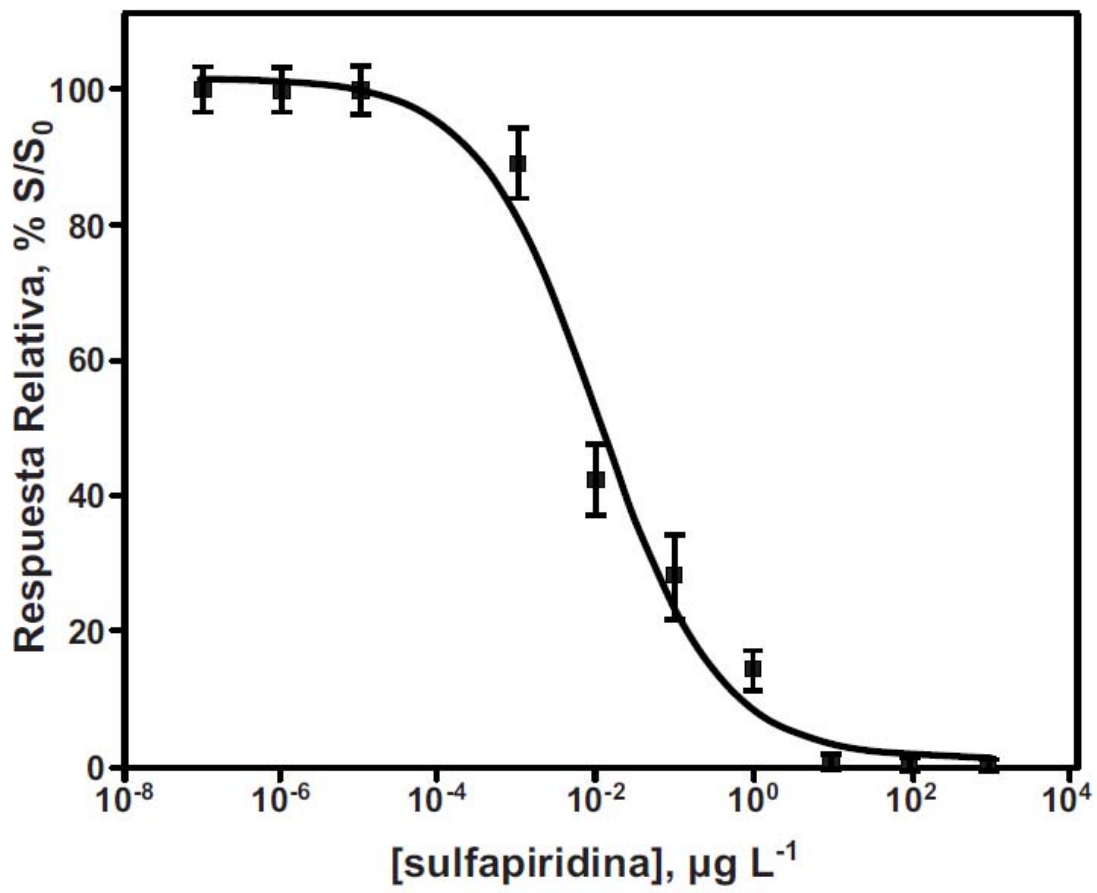


FIG. 5