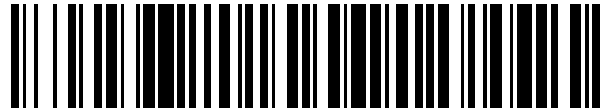


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 491**

51 Int. Cl.:

G01N 33/536 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11704800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2542885**

54 Título: **Cuantificación de analito usando un análisis de dispersión inducida por flujo**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309384 P

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

28.10.2015

73 Titular/es:

**FIDA-TECH APS (100.0%)
c/o Henrik Jensen, Tønsbergvej 49, Himmelev
4000 Roskilde, DK**

72 Inventor/es:

**JENSEN, HENRIK y
ØSTERGAARD, JESPER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 549 491 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cuantificación de analito usando un análisis de dispersión inducida por flujo.

- 5 Las interacciones no covalentes juegan un papel clave en muchos procesos bioquímicos relacionados con, por ejemplo, los objetivos de fármacos o las interacciones proteína-proteína (1). En la química combinatoria y en el desarrollo de fármacos deben abordarse en un marco de tiempo limitado un gran número de interacciones no covalentes.
- 10 A menudo, una cantidad de muestra muy pequeña está disponible para el estudio lo que impide una caracterización completa usando los procedimientos existentes. Además, es complicado a partir de un punto de vista tecnológico integrar procedimientos convencionales para abordar las interacciones no covalentes con el aislamiento y/o la síntesis de objetivos vinculantes de entidades químicas (1, 2).
- 15 El documento US 2007/0261479 divulga unos procedimientos y sistemas para monitorizar unas interacciones moleculares usando el fenómeno de la dispersión de Taylor-Aris presente en el flujo de fluidos en los sistemas de microfluidos para examinar los compuestos de ensayo en los sistemas bioquímicos.
- 20 El documento US 2004/0106190 divulga un procedimiento para medir la concentración de un analito en una muestra usando un dispositivo de ensayo de flujo pasante que comprende un medio fluido que tiene un canal en comunicación con un biosensor de afinidad electroquímico.

Sumario de la invención

- 25 La presente invención se refiere al uso de un análisis de dispersión inducido por flujo (FIDA) para la cuantificación de analitos tales como, por ejemplo, antígenos, toxinas, nucleótidos (ADN, ARN), etc. Para flujos impulsados por presión de sustancias individuales, un FIDA es similar a las dispersiones Taylor observadas anteriormente para flujos impulsados por presión en tubos o capilares delgados. En comparación con los procedimientos existentes el nuevo enfoque es rápido (segundos/minutos en comparación con horas) barato (requisitos de volumen de muestra
- 30 bajos (nL)) y fácil de implementar (solo necesita un tubo capilar delgado y un detector).

Las posibles áreas de aplicación incluyen: cuantificación de biomarcadores, diagnóstico de punto de atención y como un enfoque general para la cuantificación de analitos en un flujo basado en equipos analíticos para el análisis de laboratorio. El mismo procedimiento puede usarse para varios analitos en un sistema integrado.

- 35 Las grandes moléculas se difunden lentamente y las pequeñas moléculas se difunden comparativamente más rápido. Cuando una molécula interactúa con un ligando su aparente difusividad se convierte en la del complejo. La aparente difusividad de un ligando depende, por lo tanto, de las fracciones de analito libre y complejo que a su vez viene dada por la constante de vinculación de equilibrio analito-ligando no covalente. La idea subyacente de la
- 40 presente invención es que la dispersión aparente de un ligando en un sistema de flujo se caracteriza por la difusividad aparente del ligando. Es bien conocido que puede usarse la dispersión de pico para ensayar la difusividad de moléculas pequeñas, macromoléculas y partículas (3-8). Sin embargo, solo unos pocos estudios han informado de la dispersión en sistemas con varios componentes (9-12). Por lo tanto, midiendo la difusividad de una molécula indicadora (la sonda de afinidad o ligando) en la presencia y en la ausencia de un analito interactuante, es
- 45 posible obtener la información de la concentración del analito interactuante.

- En la presente invención se demuestra que pueden usarse una serie simple de experimentos que implican la introducción de muestras, el flujo impulsado por presión y la detección en un capilar delgado recubierto de sílice para
- 50 cuantificar la constante de vinculación de equilibrio no covalente, así como la concentración de uno o más analitos en una muestra.

- El diagnóstico molecular, por lo general, implica una interacción no covalente entre un biomarcador específico (a menudo macromoléculas endógenas, virus o bacterias) y un anticuerpo o una sonda de ADN/ARN. A partir de una interacción no covalente específica de este tipo, la concentración de biomarcadores pueden obtenerse usando un
- 55 FIDA; la tecnología es, por lo tanto, muy adecuada para el diagnóstico cuantitativo rápido, incluyendo los diagnósticos de punto de atención.

- Un FIDA para la cuantificación de las concentraciones de analitos ofrece un nuevo enfoque para realizar análisis cuantitativos. Las principales ventajas de la técnica presente son la velocidad de análisis, la simplicidad en relación
- 60 con el desarrollo del ensayo y el bajo coste.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, el procedimiento para medir la concentración de un analito en una muestra comprende las siguientes etapas:

- 65 1) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
2) determinar en una instrumentación basada en el flujo la varianza para dicho ligando,

- 3) determinar la varianza en la misma instrumentación para la misma concentración de dicho ligando en la presencia de diferentes concentraciones (conocidas) del analito,
- 4) relacionar las concentraciones de analito con las varianzas determinadas en la etapa 3,
- 5) añadir una cantidad conocida de ligando a una muestra que comprende una concentración desconocida de analito,
- 6) determinar la varianza para el ligando en la muestra introducida/añadida en la etapa 5, y
- 7) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la relación establecida en la etapa 4 y la varianza determinada en la etapa 6.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 1) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- 2) determinar en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza (σ^2) para dicho ligando, obtenida a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al ligando,
- 3) repetir la etapa 2 con dicho ligando y diferentes concentraciones conocidas del analito,
- 4) representar σ^2 o σ^2/t_r en función de la concentración de analito,
- 5) determinar la varianza (σ^2) para el ligando en una muestra que comprende el analito, y
- 6) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la representación de la etapa 4.

En otros aspectos de la presente invención, el procedimiento se refiere a la instrumentación basada en el flujo que incluye unos instrumentos dedicados a un sistema CE Agilent, HPLC o FIA y a unos procedimientos en los que el ligando comprende una etiqueta detectable y unos procedimientos en los que la muestra se selecciona a partir de cualquier fluido corporal o muestra de alimento.

En aspectos adicionales, la divulgación se refiere a unos kits para realizar el procedimiento descrito anteriormente y a unos kits para realizar las partes de etapas de los procedimientos, por ejemplo, en las que las curvas convencionales de calibración ya están establecidas para su uso en el kit y los kits para su uso en la medición de unas cantidades de fluidos corporales de analito o de muestras de alimentos.

En otro aspecto más de la presente invención, puede medirse más de un analito con el mismo procedimiento y usando el mismo kit.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Los UV trazan a 230 nm y 25 °C de α -naftol (50, μ M) en presencia y ausencia de β CD en un capilar de sílice fundida (i.d.: 50 μ m, longitud total 48,5 cm, longitud al detector 40,5 cm). El eluyente fue 67 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,4) con o sin β CD.

Figura 2. Los datos correspondientes al α -naftol (+) y al naproxeno (o) se obtuvieron usando un capilar de sílice fundida (id: 50 μ m, longitud total de 48,5 cm, longitud al detector 40,5 cm) a 25 °C. El eluyente fue 67 mM de tampón de fosfato de sodio pH 7,4 con diferentes cantidades de β CD.

Figura 3. La isoterma vinculante correspondiente al sistema (analito) β -CD (ligando) α -naftol basada en las variaciones pico, σ^2 , divididas por los tiempos de flujo, t_r . Insertado: curva convencional linealizada para determinar las concentraciones.

Figura 4. La curva convencional linealizada basada en los datos presentados en la figura 3. La figura muestra las variaciones pico, σ^2 , divididas por los tiempos de flujo, t_r frente al logaritmo de base 10 de la concentración de β -CD (analitos). De esta manera se obtiene una relación lineal aparente.

Figura 5. La isoterma vinculante basada en las variaciones de pico, σ^2 . La señal UV se detectó a 495 nm y el preacondicionamiento fue como se describe en la figura 2. El analito era anti-BSA (albúmina de suero anti-bovino monoclonal producida en un ratón, sigma B2901) y el ligando era albúmina de isotiocianato de fluoresceína (sigma A9771). Esta figura está basada en los datos obtenidos en el ejemplo 3

Figura 6. Es una figura adicional basada en los datos obtenidos en el ejemplo 3. (a) ilustra un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al BSA-FC (empleando la detección fluorescente de la etiqueta de isotiocianato de fluoresceína) en ausencia del anti-BSA. (b) ilustra la varianza pico determinada a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al BSA-FC en la presencia de diferentes cantidades del anti-BSA (IgG) y (c) es un ajuste de Gauss de los datos presentados también en b pero usando un ajuste de Gauss modificado.

Figura 7. Los límites de detección en el intervalo picomolar (detección fluorescente inducida por láser (LIF) a 488 nm de excitación) del ligando BSA-FC basado en el sistema de detección del analito anti-BSA usando un ligando BSA-FC, que se describe en el Ejemplo 4.

Figura 8. La detección de ADN total, como se ilustra en el ejemplo 5. (a) ADN de alto peso molecular (sal de sodio de ácido desoxirribonucleico a partir de testículos de salmón, sigma D1626 usando un colorante intercalante como ligando (cloruro de berberina, sigma B3251); (b) ADN de bajo peso molecular (ácido desoxirribonucleico, de bajo peso molecular a partir de esperma de salmón, sigma 31149).

Figura 9. Un FIDA usado para detectar marcadores de fluido biológico (albúmina de suero humano (HSA, Fluka 05418)), en la orina), como se ilustra en el ejemplo 6 empleando un verde de bromocresol (sal de sodio, sigma 17480) como ligando. (a) Variaciones de pico correspondientes a un verde de bromocresol en la presencia de diferentes cantidades de HSA (insertar: cercano a bajas concentraciones de HSA; (b) Pico correspondiente a 50 μM de verde de bromocresol empleando la detección UV a 595 nm; (c) Como (b) pero en presencia de 1,5 g/L de HSA

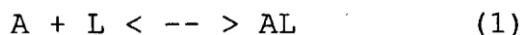
Figura 10. Un esquema de un dispositivo para realizar un FIDA que comprende una entrada (101) en la que se introduce el ligando y el analito; un canal de flujo (102); un detector (103); acoplado a la unidad de procesamiento de datos (104); una salida/basura (105). El flujo puede impulsarse por la gravedad, una bomba o por un flujo electroosmótico (106).

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a un nuevo enfoque para la caracterización cuantitativa de interacciones no covalentes y a la cuantificación de analitos en muestras de nanolitros. Como el procedimiento se basa en un análisis de dispersión inducido por flujo (FIDA), los únicos requisitos del sistema son un tubo estrecho, capilar o canal equipado con un detector que tenga una respuesta lineal. Por tanto, la técnica puede implementarse usando un equipo convencional para, por ejemplo, una cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), un análisis de inyección de flujo (FIA) o una electroforesis capilar (CE) (divulgado en el documento US 2007/0261479).

En los ejemplos ilustrativos de la presente invención se usa la detección de UV y de fluorescencia, pero podrían aplicarse también otros detectores basados en, por ejemplo, la electroquímica o la espectrometría de masas. La señal detectable puede generarse por las moléculas como etiquetas internas o por el uso de etiquetas externas unidas a las moléculas (el ligando).

El sistema químico seleccionado que ilustra la presente invención está compuesto de β -ciclodextrina (βCD) como analito y α -naftol o naproxeno como ligandos (sondas de afinidad). En general, el equilibrio correspondiente a la formación de un complejo de 1 a 1 se puede escribir como:



en la que A es el analito, L el ligando y AL el complejo.

En la figura 1, se muestran los picos correspondientes al α -naftol (ligando) en ausencia y presencia del βCD en la solución tampón de ejecución, respectivamente. El volumen de muestra que se introduce en el capilar en estos experimentos corresponde a 9 nL. Es inmediatamente evidente que en presencia del βCD los picos son más anchos. La forma del pico puede fijarse en una forma de pico de Gauss (descrita en los ejemplos); de esta manera puede estimarse la varianza de pico temporal σ^2 . La varianza puede establecerse de cualquier otra manera conocida por los expertos en la materia.

De acuerdo con la teoría de Taylor-Aris, la varianza de pico temporal está relacionada con la difusividad (13,14) del ligando (sonda de afinidad). En condiciones óptimas para un flujo impulsado por presión en un capilar cilíndrico, la varianza pico es inversamente proporcional al coeficiente de difusión, D, de acuerdo con (15):

$$D = \frac{R_c^2}{24\sigma^2} t_R \quad (2)$$

en la que R_c es el radio del tubo capilar, y t_R es el tiempo de aparición de pico. En la presencia del analito βCD , la varianza observada puede atribuirse al α -naftol y al complejo entre α -naftol y βCD . Se supone que la varianza observada es una media ponderada en función de la fracción del α -naftol libre, x. Esta suposición es válida cuando la cinética de complejación es rápida en comparación con la escala de tiempo del experimento (16).

Como tanto el ligando complejo como el libre no se retienen, tienen valores de t_R idénticos. Se puede, de este modo, obtener:

$$\frac{t_R}{\sigma^2} = \frac{t_R}{\sigma_A^2} \cdot x + \frac{t_R}{\sigma_{AL}^2} \cdot (1-x) \quad (3)$$

en la que σ_A^2 es la varianza observada obtenida a partir de un ajuste de Gauss en la ausencia de un analito de interacción y σ_{AL}^2 es la varianza correspondiente al complejo AL. Como alternativa, la ecuación (2) puede escribirse en términos de coeficientes de difusión. Sin embargo, la elección del parámetro actual es conveniente, ya que es independiente de los sistemas (es decir, no se necesita de conocimientos precisos del tamaño y del radio del canal), siempre y cuando estén satisfechas las condiciones de Taylor. Pueden introducirse unas correcciones debidas a la inyección de la muestra y a las variaciones del detector, pero como son pequeñas y constantes en las condiciones actuales no se tienen en cuenta.

La fracción del ligando libre, x , puede expresarse también de acuerdo con la constante de vinculación de equilibrio, K :

$$x = \frac{1}{1 + K[L]} \quad (4)$$

en la que $[L]$ es la concentración de analito libre. En las presentes condiciones β CD está en un gran exceso y $[L]$ puede, por lo tanto, aproximarse mediante la concentración del ligando total.

La combinación de la ecuación 3 y 4 proporciona la isoterma de vinculación:

$$\frac{t_R}{\sigma^2} = \frac{\frac{t_R}{\sigma_A^2} + \frac{t_R}{\sigma_{AL}^2} K[L]}{1 + K[L]} \quad (5)$$

La ecuación 5 puede extenderse, si es necesario, a los complejos de orden superior.

En una serie de experimentos se varía la concentración del β CD en el electrolito de fondo y se determinan las varianzas de pico. En la figura 2 se muestra t_R/σ^2 como una función de $[\beta$ CD].

En la figura 2 los datos experimentales se han ajustado a la isoterma de vinculación (K y σ_{AL}^2/t_R son los parámetros de ajuste). Los puntos experimentales se encuentran para describirse adecuadamente por el modelo y para que las constantes de vinculación estimadas estén de acuerdo con los datos de la literatura considerando que se han usado otros procedimientos y diferentes condiciones (tabla 1). En la tabla 1, se enumeran también los coeficientes de difusión de los analitos y de los complejos calculados usando la ecuación 2 y suponiendo un radio capilar de 25 μ m.

Tabla 1. Las constantes de vinculación de equilibrio (K) y los coeficientes de difusión de los analitos libres (D_A) y los complejos (D_{AL}), respectivamente, obtenidos en un tampón de fosfato de 67 mM (pH 7,4) a 25 °C. ^(a)Las constantes de vinculación de equilibrio (\pm la desviación convencional) obtenidas usando un FIDA a menos que se indique lo contrario. ^(b)El coeficiente de difusión del analito libre. ^(c)El coeficiente de difusión del complejo. ^(d)Los datos de literatura (17). ^(e)Los datos de literatura (18). ^(f)La constante de vinculación de equilibrio se obtiene usando ACE (\pm la desviación convencional). ^(g)Los datos de literatura (19)

Compuesto	K^a (M^{-1})	D_A^b ($cm^2 \cdot s^{-1}$)	D_{AL}^c ($cm^2 \cdot s^{-1}$)
α -Naftol	2400 (\pm 240) 1250 ^d	$9,3 \cdot 10^{-6}$ $9,3 \cdot 10^{-6e}$	$3,3 \cdot 10^{-6}$
Naproxeno	1050 (\pm 185) 650 (\pm 28) ^f	$5,6 \cdot 10^{-6}$ $5,8 \cdot 10^{-6g}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$

Los coeficientes de difusión pueden convertirse en hidro radios dinámicos como se ha descrito anteriormente (3-7).

Con el fin de validar el procedimiento, se determinó la constante de vinculación de equilibrio correspondiente al naproxenato anión con el β CD usando la electroforesis capilar de afinidad (ACE) convencional en condiciones experimentales idénticas. Las constantes de vinculación de equilibrio obtenidas usando los dos procedimientos son similares, aunque los resultados obtenidos usando el procedimiento de ACE aparecen a continuación (tabla 1). Esta discrepancia es más probable debido a un calentamiento Joule en la electroforesis que da como resultado una temperatura más alta en el capilar.

Con el fin de ilustrar cómo la presente invención puede usarse para estimar la concentración de un analito, se realizaron experimentos preliminares en un sistema de modelo sencillo compuesto por el ligando (la sonda de afinidad) α -naftol y el analito β -ciclodextrina (β -CD), que se usa con frecuencia como un aditivo en formulaciones de fármacos. En la figura 1, se muestra el pico correspondiente a 50 μ M de α -naftol en presencia y ausencia de β -ciclodextrina, respectivamente.

En el supuesto de una cinética en-y-fuera rápida, pueden usarse las varianzas de los picos obtenidos a partir de los datos en bruto (figura 1) para establecer la isoterma de vinculación en la figura 2. El perfil de la isoterma de vinculación obtenido usando un FIDA (figura 3) puede verificar tanto la estequiometría de vinculación como determinar cuantitativamente la constante de asociación, K. Cada punto de la isoterma de vinculación (figura 2) se obtiene usando solo unos pocos nL de muestra inyectada.

En la figura 3 está insertada una curva convencional linealizada (presentada también en la figura 4) que enlaza una varianza medida a una concentración de β-CD. Por lo tanto, la concentración de β-CD libre en muestras desconocidas puede obtenerse a partir de mediciones de varianzas pico correspondientes al α-naftol añadido que funciona como una manija de analítica (ligando o sonda de afinidad) para la detección del β-CD; es de esta manera en que la presente invención puede usarse para la cuantificación del analito.

Por lo tanto, puede concluirse que un FIDA es una manera efectiva y general de obtener las constantes de vinculación de equilibrio, las difusividades de tanto los analitos libres como los complejos y estimar las concentraciones de estimación de un analito en una muestra. Las ventajas del procedimiento basado en un FIDA en comparación con los procedimientos existentes incluyen tiempos de análisis cortos, bajos requisitos de volumen de muestra y simplicidad del análisis y la instrumentación de datos. Con el fin implementar la metodología, el único requisito es un flujo de fluidos basado en un equipo de análisis de fluidos tal como la instrumentación HPLC, FIA o CE, es decir, cualquier sistema de microfluidos adecuado. Muchos de estos instrumentos comercialmente disponibles están equipados con muestreadores automáticos que hacen un análisis de alto rendimiento de las interacciones no covalentes y la cuantificación del analito factible. La presente invención no implica soportes sólidos para la inmovilización o la separación que conducen a un análisis más rápido y más barato. Finalmente, la metodología es relativamente fácil de acoplar a los procedimientos químicos miniaturizados incluyendo la síntesis, la preparación de la muestra, y la separación que hace el análisis directo de las interacciones no covalentes de, por ejemplo, los fármacos sintetizados y los objetivos biológicos posibles. Los procedimientos totalmente integrados pueden realizarse usando sistemas basados en chips de microfluidos. El procedimiento se acopla fácilmente a otras operaciones (incluyendo, por ejemplo, la preparación de la muestra y/o una separación cromatográfica/electroforética) en un sistema de microfluidos.

Los sistemas pertinentes en los que la presente invención pueden aplicarse incluirían las interacciones anticuerpo-antígeno (el presente procedimiento no necesita separaciones o anticuerpos intercalados para la cuantificación de los antígenos), los complejos formados entre las cadenas de ADN, ADN-ARN (por ejemplo para la detección de polimorfismos de nucleótido simple, los SNP, infecciones, etc.), los complejos que incluyen PNA o LNA o los nucleótidos sintéticos similares o las detecciones de toxinas en los productos alimenticios, etc... De esta manera, pueden cuantificarse aminoácidos, ácidos poliaminos, nucleótidos, polinucleótidos, sacáridos, polisacáridos, anticuerpos, proteínas receptoras, proteínas de señal, enzimas, cofactores, citocinas, hormonas, quimiocinas, polímeros y fármacos. Además, la invención puede usarse para detectar virus y bacterias usando un anticuerpo contra las bacterias o por la detección de todo el ADN de un lisado de célula que emplea un ligando intercalante.

FIDA en ligandos y analitos de diferentes tamaños

El análisis de dispersión inducido por flujo (FIDA) puede aplicarse a un número de diferentes tamaños de ligandos y sus correspondientes analitos. Los experimentos iniciales revelaron que la sensibilidad del ensayo dependía del tamaño del ligando y del analito correspondiente a detectarse, lo que llevó a los inventores a estudiar esta cuestión. Sorprendentemente, es posible mejorar el ensayo en función del tamaño del ligando y del analito correspondiente a detectar.

El tamaño de los ligandos y los analitos puede dividirse en cuatro categorías

Ligando	Analito	Relación típica	También descrito en:
Pequeño	Pequeño	0,1 - 10	Ejemplo 1
Grande	Grande	0,1 - 10	Ejemplos 2 y 3
Pequeño	Grande	< 0,1	Ejemplo 5, 6
Grande	Pequeño	> 10	Ejemplo 7

La relación ligando a analito se calcula como:

$$\text{Relación} = \text{Mw (Ligando)} / \text{Mw (Analito)}$$

En lo que antecede y, en general, la invención se ha ilustrado con referencia a la interacción entre dos moléculas pequeñas, tales como el α-naftol o el naproxeno como ligandos para el analito β-ciclodextrina (βCD).

Interacciones “Pequeño/Pequeño”

Las interacciones “Pequeño/Pequeño”, tales como las descritas anteriormente, y en el ejemplo 1, pueden analizarse con el ensayo de FIDA descrito. En aras de la claridad, se definen unas moléculas pequeñas de acuerdo con la invención como que tienen un peso molecular de menos de 5 kDa, mientras que las moléculas grandes se definen como que tienen un peso molecular superior a 5 kDa.

Interacciones “Grandes/Grandes”

Una molécula grande (o partícula) de acuerdo con la presente invención se define como que tiene un peso molecular por encima de 5 kDa. Los inventores han descubierto, de manera sorprendente, que se necesitan modificaciones en el protocolo cuando tanto el ligando como el analito son moléculas grandes, ya que se necesita más tiempo para que la molécula se difunda en la dirección radial. Este punto puede realizarse en un nivel cualitativo por la siguiente relación entre la longitud de difusión (Δ), el coeficiente de difusión (D) y el tiempo (t):

$$\Delta = \sqrt{2Dt}$$

Un FIDA necesita las dimensiones del canal de flujo o un tubo para ser compatible con el tiempo de ejecución (es decir, un tiempo de aparición de pico que puede controlarse es la presión aplicada para pasar la muestra a través del capilar), el coeficiente de difusión del ligando y el complejo ligando-analito (que se relaciona de manera eficaz con el tamaño). Por lo tanto, las condiciones necesitan optimizarse en función de los tamaños absolutos del analito y los ligandos, así como en función del tamaño relativo del ligando en comparación con el analito.

En general, cuando se usa un FIDA para caracterizar las interacciones entre un ligando y un analito, el analito debería ser preferentemente mayor que el ligando (como en el ejemplo 5) o de tamaño similar como en el ejemplo 1 y 3, ya que esto da la mejor respuesta.

Interacciones “Pequeño/Grande” y “Grande/Pequeño”

Se observa un gran efecto sobre la difusividad aparente cuando un analito relativamente grande se vincula a un ligando comparativamente más pequeño. Por otra parte se observará poco efecto cuando un analito pequeño se vincula a un ligando comparativamente más grande (tal como un anticuerpo). En este último caso, puede obtenerse la sensibilidad adecuada introduciendo un equilibrio de vinculación de competencia, en el que un analito de molécula pequeña etiquetado de manera fluorescente de concentración conocida se vincula a un ligando grande (tal como un anticuerpo). En la presencia de un ligando grande se observa que aumenta la dispersión inducida por el flujo del analito marcado de manera fluorescente. Cuando la mezcla (el analito y el anticuerpo marcados de manera fluorescente frente a la concentración desconocida de analito no marcado) se aplica a una solución que contiene la concentración desconocida de analito no marcado (que no está marcado de manera fluorescente), la dispersión inducida por el flujo del analito marcado de manera fluorescente disminuye a medida que el analito no marcado desplaza el analito marcado de manera fluorescente del anticuerpo. El cambio en la dispersión observada se correlaciona con la concentración del analito no marcado.

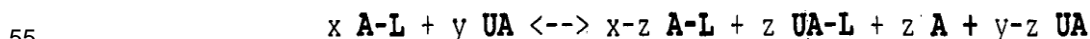
Analito no marcado (UA)

Analito marcado (A)

Ligando (L)

Por analito marcado se entiende que debería poder distinguirse del analito sin marcar correspondiente usando el equipo para la detección. Los expertos en la materia conocen muchas formas de marcar una molécula para hacerla distinguible de las demás. Una forma es marcando de manera fluorescente la molécula, pero la marca puede incorporarse también en la molécula, tal como un etiquetado/marcaje de isótopos.

La ecuación siguiente muestra cómo las y moléculas del UA (molécula pequeña; concentración a detectar) inhibe de manera competitiva las x moléculas del complejo A-L (molécula grande interactuando con el analito marcado), liberando de este modo al A (molécula pequeña; analito marcado detectable)



Cuando la relación del peso molecular del ligando-a-analito está por encima de 10, la diferencia en la dispersión del ligando grande frente al ligando grande con el analito pequeño vinculado es demasiado pequeña para aplicaciones cuantitativas cuando se usa un equipo como el descrito en la presente solicitud.

Los inventores han descubierto de manera sorprendente que el problema de medir un FIDA en los sistemas de ligando-analito con una relación de ligando-analito por encima de 10 puede resolverse empleando un ensayo acoplado/competitivo como se describe en el ejemplo 7.

Ajuste de la respuesta de analito / curva de respuesta

5 Usando el ensayo de FIDA es posible hacer una curva de respuesta de dosis sigmodial sometiendo a ensayo un intervalo de diferentes concentraciones de analito. Una curva de respuesta sigmodial de este tipo puede ajustarse a una ED superior o inferior modificando la concentración del ligando como se explica a continuación.

10 La curva de respuesta sigmodial del ejemplo 3 puede ajustarse a una ED50 más alta o más baja modificando la concentración del ligando, en el presente documento BSA-FC. Este punto es bastante importante, ya que facilitará de manera significativa el desarrollo de procedimientos y la optimización del intervalo dinámico. Si se necesita un límite más bajo de detección, se rebaja simplemente la concentración del ligando que desplaza efectivamente la curva de respuesta a valores más bajos. El punto se ilustra en el ejemplo que implica la detección fluorescente del BSA-FC. En el caso de biomarcadores, toxinas y patógenos, el intervalo de concentración pertinente variará de manera considerable de un caso a otro. En otros procedimientos basados, por ejemplo, en ELISA se necesita un desarrollo del procedimiento sustancial, cuando va desde una aplicación a otra. Este no es el caso con un FIDA ya que simplemente se ajusta el intervalo dinámico seleccionando una concentración de ligando óptima.

El ensayo de FIDA

20 El presente procedimiento incluye la cuantificación de un analito mediante la identificación de un ligando útil o una sonda de afinidad con el fin de establecer la variación necesaria en la dispersión/varianza.

El procedimiento de medir la concentración de un analito en una muestra de acuerdo con la presente invención incluye las etapas siguientes:

- 25
- seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
 - establecer en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza para dicho ligando,
 - establecer la varianza en la misma instrumentación para la misma concentración de dicho analito en la presencia de diferentes concentraciones (conocidas) del analito a medir con el fin de relacionar la concentración del analito con la varianza,
- 30
- establecer la varianza para el ligando en una muestra, y
 - determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la relación establecida entre la concentración del analito y la varianza.

35 La varianza puede establecerse de diferentes formas:

- varianza obtenida a partir de un ajuste de Gauss al pico (que se define de acuerdo con una función de Gauss),
 - varianza obtenida a partir de la anchura del pico (medida, por ejemplo, a media altura),
 - varianza obtenida como el segundo momento del pico (es decir, a partir de un análisis de los momentos estadísticos correspondientes al pico),
 - o procedimientos relacionados similares.
- 40

En una realización específica de la invención, se usa un ajuste de Gauss en el procedimiento:

45 La concentración de un analito en una muestra se mide incluyendo las etapas siguientes:

- seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
 - establecer en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza (σ^2) para dicho ligando, obtenida a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al ligando,
 - repetir la etapa 2 con diferentes concentraciones del analito en la solución fluida,
 - representar σ^2 o σ^2/tr frente a la concentración de analito (se establece la curva convencional),
 - establecer la varianza (σ^2) para el ligando en una muestra, y
 - determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la representación (curva convencional) de la etapa 4.
- 50
- 55

Los procedimientos experimentales alternativos para medir la dispersión inducida de varianza/por el flujo (etapa 2):

- Una muestra que contiene el ligando (o sonda de afinidad) y el analito se inyecta en una corriente de flujo de líquido que contiene el analito y se mide la dispersión inducida por el flujo del ligando
 - Una muestra que contiene el ligando y el analito se inyecta en una zona de muestra del analito y se mide la dispersión inducida por el flujo del ligando
 - Una muestra que contiene el ligando y el analito se inyecta en una corriente de flujo de líquido y se mide la dispersión inducida por el flujo del ligando.
- 60
- 65

La relación entre la varianza observada para el ligando y el analito puede determinarse de muchas maneras. Por ejemplo la concentración de ligando puede mantenerse a una concentración constante, y variar la concentración de analito. De esta manera, puede obtenerse una curva convencional, en la que solo varía un parámetro (analito).

5 Una curva convencional puede obtenerse de diferentes maneras:

- a - La varianza frente a una concentración de analito
- b- Varianza/tr frente a una concentración de analito
- c- Tr/varianza frente a una concentración de analito
- 10 d- El coeficiente de difusión aparente frente a la concentración de analito

- Ejemplo a-d en una escala logarítmica.

15 La presente invención se refiere a un procedimiento para medir la concentración de un analito en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- 1) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- 2) determinar en una instrumentación basada en el flujo la varianza para dicho ligando,
- 3) determinar la varianza en la misma instrumentación para la misma concentración de dicho ligando en la presencia de diferentes concentraciones (conocidas) del analito,
- 20 4) referir las concentraciones de analito a las varianzas determinadas en la etapa 3,
- 5) añadir una cantidad conocida de ligando a una muestra que comprende una concentración desconocida de analito,
- 6) determinar la varianza para el ligando en la muestra introducida/añadida en la etapa 5, y
- 25 7) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la relación establecida en la etapa 4 y la varianza determinada en la etapa 6.

La invención se refiere además a un procedimiento que comprende

- 30 1) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- 2) determinar en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza (σ^2) para dicho ligando, obtenida a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al ligando,
- 3) repetir la etapa 2 con dicho ligando y diferentes concentraciones conocidas del analito,
- 4) representar σ^2 o σ^2/tr frente a la concentración de analito,
- 35 5) determinar la varianza (σ^2) para el ligando en una muestra que comprende el analito, y
- 6) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la representación de la etapa 4.

La presente invención también se refiere a unos kits para realizar el procedimiento como se ha tratado anteriormente en su totalidad o en parte.

40 La invención se refiere además a unos procedimientos y un kit para medir la concentración de más de un analito, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más de 10 analitos diferentes.

Aplicaciones de FIDA complementarias

45 Las siguientes listas de aplicaciones es probable que puedan realizarse usando FIDA. Es complementario a la aplicación que implica una BSA/antiBSA o un ADN.

- 50 1) En una aplicación relacionada, se realiza un inmunoensayo intercalado usando un FIDA. En este ejemplo se detecta la dispersión inducida por el flujo de un anticuerpo marcado de manera fluorescente en la presencia de un antígeno y de un anticuerpo primario.
- 2) En una aplicación relacionada, se detecta una cadena de ADN, ARN o LNA midiendo la dispersión inducida por el flujo de una cadena complementaria etiquetada. Esta aplicación puede implicar la detección/ caracterización de polimorfismos de nucleótido simple (SNP).
- 55 3) En una aplicación relacionada se detecta un virus (como por ejemplo, el H1N1) detectando la dispersión inducida por el flujo de un anticuerpo frente al virus.
- 60 4) En una aplicación relacionada se detecta una bacteria, detectando la dispersión inducida por el flujo de un anticuerpo frente a la bacteria.
- 5) En una aplicación relacionada se detecta una toxina (presente en una muestra biológica, en un producto alimenticio, o en muestras de agua), detectando la dispersión inducida por el flujo de una entidad química que interactúa con la toxina.
- 65

6) En aplicaciones relacionadas se usan aptámeros en lugar de los anticuerpos tradicionales.

7) En una aplicación relacionada se usa la dispersión inducida por el flujo en combinación con la vinculación competitiva para la cuantificación del analito.

8) En una aplicación relacionada, se emplea una adición convencional de un compuesto marcador usado para un FIDA para la detección/cuantificación de analitos.

9) En una aplicación relacionada se usa un FIDA para cuantificar el ADN usando un colorante de intercalación. La muestra de ADN puede ser un lisado de célula obtenido a partir de productos lácteos (muestras de leche), procesos de fermentación, etc. Un FIDA puede usarse en combinación con otro equipo basado en el flujo para el análisis de células tal como por ejemplo, la citometría de flujo (FCM). Un FIDA es adecuado para el análisis de la leche cruda (leche no pasteurizada) para detectar posibles patógenos tales como, por ejemplo, el E. Coli O157:H7, la Listeria y la Salmonella.

Las aplicaciones listadas pueden implicar diferentes niveles de cuantificación.

Ejemplo 1 (haciendo referencia al ejemplo ilustrativo y a las figuras tratadas anteriormente. A continuación, se proporcionan los procedimientos experimentales detallados para obtener las curvas convencionales de la figura 3 y 4)

Reactivos. El β CD, el α -naftol y el naproxeno se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El Dihidrogenofosfato de sodio monohidrato se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). Se utilizaron todos los productos químicos según se recibieron. La cantidad de agua presente en el β CD se determinó por análisis gravimétrico tras secar hasta un peso constante en vacío a ~ 60 °C. Se usó en todo agua purificada a partir de una unidad de desionización Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). El tampón de muestra y de ejecución era un tampón de fosfato de sodio 67 mM, pH 7,40, preparado a partir de dihidrogenofosfato de sodio monohidrato; este tampón se usó para todos los analitos. El pH se ajustó por adición de 5 NaOH. El tampón de muestra y de ejecución contenía cantidades variables de β CD. Las soluciones madre de α -naftol y naproxeno ($1,0 \cdot 10^{-3}$ M) se prepararon al 10 % (v/v) de tampón de acetonitrilo/fosfato. Las muestras se prepararon por dilución apropiada usando las soluciones de tampón de ejecución de fosfato 67 mM β CD.

Instrumentación. La dispersión inducida por el flujo y los experimentos de electroforesis capilar se realizaron usando un instrumento CE^{3D} Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Se obtuvieron unos capilares de sílice fundida no recubiertos de 48,5 cm de longitud total (50 μ m de diámetro interno, 360 μ m de diámetro externo) y 40,5 cm a la ventana de detección que se obtuvo de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Procedimientos CE y FIDA. Nuevos capilares se acondicionaron con 1 M NaOH (45 min), agua Milli-Q (30 min) y un tampón de fosfato de 67 mM pH 7,4 (30 min). Antes de una serie de experimentos, el capilar fue refrescado por lavado con 1 M NaOH (10 min) y un tampón de fosfato de 67 mM pH 7,4 (10 min). En FIDA, el capilar fue preacondicionado mediante el lavado del capilar con 0,1 M NaOH (2 min) y un tampón de ejecución (2 min). La muestra se inyectó aplicando una presión de 50 mbar durante 5 segundos. Posteriormente se aplicó una presión de 50 mbar a través del capilar para forzar la muestra a su través. Finalmente la muestra se detectó por absorbancia de UV en 230 nm. Las muestras se ejecutaron por triplicado.

La varianza de pico se obtuvo ajustando la señal de UV a una forma de pico de Gauss. El Gaussiano además de la varianza pico y el tiempo de aparición pico, incorpora a la función una constante A para tener en cuenta la altura de la señal y una constante y_0 para tener en cuenta un posible desplazamiento del detector.

Ejemplo 2

El análisis de dispersión inducida por el flujo (FIDA) puede usarse con fines de diagnóstico y para cuantificar los biomarcadores. El siguiente ejemplo implica un anticuerpo (anti-BSA) y un antígeno (BSA-FC). Las condiciones son como en el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones.

La dispersión de BSA-FC (albúmina de suero bovino marcada con un fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína), SIGMA A9771)) se mide en un capilar de sílice fundida (50 micrómetros de diámetro interno) usando la detección de UV a 500 nm (495 nm). Se empleó una inyección hidrodinámica (50 mbar, 5 segundos). El siguiente procedimiento se usó para los capilares de sílice fundida recién acondicionados (ejemplo 1). El capilar se lavó (1 bar) 2 minutos con 0,1 M NaOH, 1 minuto usando un tampón de fosfato (67 mM pH 7,4) 2 minutos usando un tampón de fosfato (67 mM pH 7,4) y 5 minutos usando el tampón de ejecución (el tampón de fosfato que contiene el analito, antiBSA). La temperatura se mantuvo a 25 °C.

Pueden usarse otros procedimientos de condicionamiento y longitudes de onda de detección y pueden usarse otros detectores tal como, por ejemplo, la detección basada en fluorescencia, electroquímica, potenciometría o en ciertos casos espectrometría de masas. Pueden usarse otros sistemas de flujo miniaturizados.

Una muestra de 10^{-5} M de BSA-FC se inyecta de manera hidrodinámica en una corriente de flujo de tampón de fosfato 67 mM pH 7,4. Mediante presión de la muestra inyectada se empuja a través del capilar de sílice fundida y se detecta por detección de absorbancia de UV-Visible a 500 nm (495 nm). Debido al perfil de flujo parabólico la muestra del BSA-FC está sujeta a dispersión como se observa mediante la forma del pico de Gauss. La dispersión está relacionada con el coeficiente de difusión aparente del BSA-FC.

La aparente (es decir observada) difusividad del BSA-FC cambiará cuando se acople en un equilibrio de vinculación no covalente con, por ejemplo, un anticuerpo tal como el anti-BSA (sigma B2901). Cuando el anti-BSA se introduce en el canal de flujo de sílice fundida en la zona de dispersión, la vinculación se refleja en un cambio de dispersión.

Realizando los experimentos será posible una caracterización cuantitativa del evento de vinculación BSA-FC-anti BSA usando curvas de vinculación apropiadas. La evaluación de los datos se basará en un ajuste de Gauss de la señal dispersa correspondiente al BSA-FC. El análisis de datos exactos dependerá de si la cinética de vinculación es rápida en comparación con la escala de tiempo del experimento, lenta en comparación con la escala de tiempo del experimento o si una cinética de vinculación intermedia está en juego en la escala de tiempo del experimento.

Procedimientos experimentales alternativos y análisis de datos: En lugar de un flujo impulsado por presión puede emplearse un flujo electroosmótico.

Un conocimiento cuantitativo de aplicación relacionada de la interacción no covalente (es decir, la constante de asociación o de disociación obtenida por un FIDA) puede usarse para determinar la concentración desconocida de anti-BSA basado en la medición de la dispersión perteneciente al BSA-FC inyectado en una zona de dispersión de anti-BSA.

En una aplicación relacionada, la muestra que contiene un anti-BSA puede ser una solución tampón, una muestra de orina o una muestra de sangre u otro biofluido.

En una aplicación relacionada, la concentración de anticuerpos anti-BSA se determina a partir de una "curva convencional del sistema". La "curva convencional del sistema" se obtiene a partir de la medición de la dispersión del BSA-FC en un líquido que contiene concentraciones conocidas de anti-BSA. La concentración desconocida de BSA en el mismo líquido puede, a partir de aquí, determinarse a partir de una medida de dispersión sencilla del BSA-FC en el líquido.

La aplicación descrita anteriormente puede realizarse en un sistema de microfluidos integrado.

Ejemplo 3

Un FIDA puede usarse para caracterizar las interacciones entre una molécula grande como un ligando (Anti-BSA) y una molécula grande como un analito (BSA-FC), como se ilustra en este ejemplo.

La dispersión del BSA-FC (albúmina de suero bovino marcada con un fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína), SIGMA A9771) se mide en un capilar de sílice fundida (50 micrómetros de diámetro interno) usando la detección de UV a 495 nm. Se empleó una inyección hidrodinámica (50 mbar, 5 segundos). El siguiente procedimiento se usó para capilares de sílice fundida recién acondicionados (ejemplo 1). El capilar se lavó (1 bar) 2 minutos con 0,1 M NaOH, 1 minuto usando un tampón de fosfato (67 mM pH 7,4), 2 minutos usando un tampón de fosfato (67 mM pH 7,4) y 5 minutos con el tampón de ejecución (un tampón de fosfato que contiene el analito, antiBSA). La concentración de BSA-FC fue de 10 μ M.

La señal de UV detectada dio lugar a una forma de pico de Gauss a partir de la cual puede obtenerse la varianza de pico como se describe en el ejemplo 1 ajustando la respuesta del detector a una forma de pico de Gauss.

En la figura 5 se observa la varianza de pico obtenida a partir del ajuste de Gauss a las formas de pico a diferentes concentraciones de anti-BSA. Esto da lugar a una curva convencional sigmoideal que tiene un punto de inflexión cercano a 7 μ M de anti-BSA.

En la figura 6 se muestra un experimento similar, pero empleando la detección fluorescente como se muestra en la figura 6. El detector fluorescente fue el modelo de evolución equipado con una detección LIF 488 nm obtenida de Picometrics.

En este caso la concentración de BSA-FC era de 1 nM lo que permitió que la curva convencional se desplazara al intervalo-nM (figura 6b). Como se muestra en la figura 7 puede ser posible, en principio, desplazar la curva convencional a concentraciones incluso más bajas como un pico claramente detectable que se obtuvo incluso a 1pM de BSA-FC (correspondiente a aproximadamente 6.000 moléculas de BSA-FC).

Ejemplo 4

Un FIDA puede usarse en el intervalo picomolar, como se justifica por el siguiente ejemplo. La figura 7 muestra los experimentos con el BSA-FC, lo que demuestra que el BSA-FC puede detectarse incluso a concentraciones de pM. Por lo tanto, se justifica que las curvas convencionales de la figura 5 y 6, puedan desplazarse incluso a más bajas concentraciones.

Como es evidente a partir del ejemplo anterior, el procedimiento FIDA es probable que sea aplicable a una baja concentración de 1 picomolar, que representa tan solo 6.000 moléculas en las condiciones actuales.

Ejemplo 5

5 Un FIDA puede usarse para monitorizar la actividad biológica basada, por ejemplo, en la detección de fragmentos de ADN a partir de una bacteria. En este ejemplo, las interacciones entre una molécula pequeña como un ligando (cloruro de berberina, sigma B3251) y una molécula grande como un analito (ADN), se ilustran en la figura 8. Las condiciones son como en el ejemplo 3, excepto que la detección de UV se realizó a 345 nm. Como es evidente a partir de la figura 8, puede realizarse la detección de los fragmentos de ADN de bajo, así como, de alto peso molecular usando un FIDA que emplea un colorante intercalante o interactuante como ligando para el ADN.

15 La detección de fragmentos de ADN a partir de una bacteria tiene numerosas aplicaciones. Por ejemplo, la calidad de la leche puede inspeccionarse inmediatamente de forma presencial en la finca del ganadero antes de agrupar la leche junto con otros tipos de leches en el tanque del camión que recoge la leche de los ganaderos. La detección de fragmentos de ADN a partir de una bacteria de forma presencial usando un FIDA representa una ventaja significativa, como que puede detectarse leche contaminada o de baja calidad en la granja, en el lugar más temprano posible en la cadena de valor de la refinación de la leche.

20 La detección general de todo el ADN es aplicable en cualquier entorno industrial o de investigación en el que necesita cuantificarse un virus o una bacteria. Los ejemplos adicionales incluyen, pero no se limitan a: células somáticas, células de esperma, células de mamífero, células animales, células de levadura, etc. Al ser un flujo basado en el procedimiento FIDA puede acoplarse a una citometría de flujo (FCM).

Ejemplo 6

Un FIDA puede usarse para caracterizar las interacciones entre una molécula pequeña como un ligando (verde de bromocresol) y una molécula grande como un analito (HSA), como se ilustra en este ejemplo.

30 Las condiciones pertinentes a la figura 9 son similares a las descritas en el ejemplo 3, excepto que la detección de UV se realizó a 595 nm, y que el tampón de ejecución fue orina artificial (compuesta por NaCl, KCl, un tampón de fosfato de sodio, y creatinina).

35 Como es evidente a partir del ejemplo 6, un FIDA puede usarse para detectar los marcadores de un fluido biológico, tal como sangre, orina, saliva, sudor, líquido cefalorraquídeo.

Un FIDA es muy adecuado para el caso en el que el ligando sea menor que el analito ya que se observa un gran efecto sobre la dispersión de pico cuando el ligando se vincula al analito. Las aplicaciones no se limitan a los fluidos biológicos, sino que pueden aplicarse en otras áreas tales como la agricultura, el control de calidad de, por ejemplo, los procesos de fermentación, o la rápida detección de patógenos de forma presencial.

Ejemplo 7

45 Un FIDA puede usarse para caracterizar las interacciones entre una molécula grande como un ligando (anticuerpos mono o policlonales frente a una o más aflatoxinas) y una molécula pequeña como un analito (aflatoxinas), como se ilustra en este ejemplo.

El presente ejemplo emplea dos ligandos: una aflatoxina marcada de manera fluorescente y un anticuerpo frente a la aflatoxina. El analito es la aflatoxina. En una primera serie de experimentos, la vinculación entre la aflatoxina marcada de manera fluorescente y un anticuerpo frente a la aflatoxina se examina por un FIDA. Este procedimiento es similar al ejemplo 6. Se establecen las condiciones en las que el anticuerpo vincula una cantidad significativa de aflatoxina marcada de manera fluorescente (idealmente toda). En un segundo conjunto de experimentos, se emplea una concentración fija de una toxina marcada de manera fluorescente y se emplea un anticuerpo frente a la aflatoxina y se usan diferentes concentraciones de aflatoxinas. En comparativamente altas concentraciones de aflatoxina, la aflatoxina desplaza la aflatoxina marcada de manera fluorescente del anticuerpo complejo dando lugar a una varianza de pico aparente más baja. En este caso la curva convencional para las determinaciones de concentración presentará de este modo una varianza de pico aparente alta a bajas concentraciones de aflatoxina y una varianza de pico aparente pequeña a altas concentraciones de aflatoxina.

Antes de cada experimento, la entrada capilar se lavó cuidadosamente. También, pueden usarse de manera ventajosa nuevos capilares recién acondicionados.

60 Las condiciones experimentales son por lo demás como se describen en el ejemplo 3 y 6.

En el ejemplo anterior, el ligando puede componerse también de una pluralidad de ligandos, tal como una mezcla de anticuerpos monoclonales frente a cada uno de las cuatro aflatoxinas. Esto permitiría una detección de la presencia de aflatoxinas en granos, por ejemplo, de manera presencial en la granja. El procedimiento realizado simple y fácilmente permitiría a los productores de alimentos la detección de forma rutinaria y barata de todos los lotes de grano, en comparación con los controles puntuales aleatorios. Esto aumentaría la seguridad alimentaria global. Las

toxinas, tales como las aflatoxinas, zearalenona, deoxinivalenol (DON), ocratoxina serían adecuadas para probarse de acuerdo con el presente procedimiento.

Además de ser un ensayo competitivo también hay que darse cuenta de que los ligandos de vinculación cumplen con la regla de que deberían ser pequeños en comparación al primer ligando (que podría ser un anticuerpo policlonal o monoclonal en el presente ejemplo).

Ejemplo 8

Los datos se ajustaron usando una función de Gauss de 4 parámetros que permite tener en cuenta el posible desplazamiento del detector. Los detalles adicionales sobre los procedimientos de ajuste pueden encontrarse en la referencia 20.

Referencias

1. Drews, J. *Science* 2000, 287, 1960-1964.
2. Weigl, B. H.; Bardell, R. L.; Cabrera, C. R. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2003, 55, 349-377.
3. Bello, M. S.; Rezzonico, R.; Righetti, P. G. *Science* 1994, 266, 773-776.
4. Cottet, H.; Martin, M.; Papillaud, A.; Souaid, E.; Collet, H.; Commeyras, A. *Biomacromolecules* 2007, 8, 3235-3243.
5. Le Saux, T.; Cottet, H. *Anal. Chem.* 2008, 80, 1829-1832.
6. D'Orlye, F.; Varenne, A.; Gareil, P. J. *Chromatogr. A* 2008, 1204, 226-232.
7. Ostergaard, J.; Jensen, H. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8644-8648.
8. Sharma, U.; Gleason, N. J.; Carbeck, J. D. *Anal. Chem.* 2005, 77, 806-813.
9. Burkey, T. J.; Griller, D.; Lindsay, D. A.; Scaiano, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 1983-1985.
10. Montanari, M. L. C.; Montanari, C. A.; Veloso, D. P.; Beezer, A. E.; Mitchell, J. C.; Volpe, P. L. O. *Quant. Struct.-Act. Rel.* 1998, 17, 102-108.
11. Clark, S. M.; Konermann, L. J. *Am. Soc. Mass Spectr.* 2003, 14, 430-441.
12. Cottet, H.; Biron, J. P.; Martin, M. *Anal. Chem.* 2007, 79, 9066-9073.
13. Taylor, G. *Proc. R. Soc. Lon. Ser.-A* 1953, 219, 186-203.
14. Aris, R. *Proc. R. Soc. Lon. Ser.-A* 1956, 235, 67-77.
15. Taylor, G. *Proc. R. Soc. Lon. Ser.-A* 1954, 225, 473-477.
16. Lucas, L. H.; Price, K. E.; Larive, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14258-14266.
17. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1875-1917.
18. Bourne, J. R.; Tovstiga, G. *Chem. Eng. Commun.* 1985, 36, 67-71.
19. Zhang, H. X.; Annunziata, O. *Langmuir* 2009, 25, 3425-3434.
20. Jensen, H.; Ostergaard, J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 4070-4071

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir la concentración de un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 5
- a) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
 - b) determinar en una instrumentación basada en el flujo la varianza para dicho ligando,
 - c) determinar la varianza en la misma instrumentación para la misma concentración de dicho ligando en presencia de diferentes concentraciones (conocidas) del analito,
 - 10 d) relacionar las concentraciones de analito con las varianzas determinadas en la etapa c,
 - e) añadir una cantidad conocida de ligando a una muestra que comprende una concentración desconocida de analito,
 - f) determinar la varianza para el ligando en la muestra introducida/añadida en la etapa e, y
 - 15 g) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la relación establecida en la etapa d y la varianza determinada en la etapa f.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:

- a) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- 20 b) determinar en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza (σ^2) para dicho ligando, obtenida a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al ligando,
- c) repetir la etapa b con dicho ligando y diferentes concentraciones conocidas del analito,
- d) representar σ^2 o σ^2/tr en función de la concentración de analito,
- 25 e) determinar la varianza (σ^2) para el ligando en una muestra que comprende el analito, y
- f) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la representación de la etapa d.

3. Un procedimiento para medir la concentración de un analito en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- 30 a) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- b) determinar en una instrumentación basada en el flujo la varianza para un analito marcado en comunicación física con dicho ligando,
- c) determinar la varianza de dicho analito marcado en la misma instrumentación para la misma concentración de dicho analito marcado y dicho ligando, en presencia de diferentes concentraciones (conocidas) del analito,
- 35 d) relacionar las concentraciones de analito con las varianzas determinadas en la etapa c,
- e) añadir una cantidad conocida de ligando y una cantidad conocida de analito marcado a una muestra que comprende una concentración desconocida de analito,
- f) determinar la varianza para el analito marcado en la muestra introducida/añadida en la etapa e, y
- 40 g) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la relación establecida en la etapa d y la varianza determinada en la etapa f;

en el que tanto el analito marcado como el analito tienen una afinidad por el ligando, y en el que el analito puede distinguirse del analito marcado.

45 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:

- a) seleccionar un ligando como una sonda de afinidad para el analito a medir,
- b) determinar en una instrumentación basada en el flujo, tal como por ejemplo un sistema de CE Agilent, la varianza (σ^2) para un analito marcado en comunicación física con dicho ligando, obtenida a partir de un ajuste de Gauss para el pico correspondiente al analito marcado en comunicación física con el ligando,
- 50 c) repetir la etapa b con dicho analito marcado en comunicación física con el ligando y diferentes concentraciones conocidas del analito,
- d) representar σ^2 o σ^2/tr en función de la concentración de analito,
- e) determinar la varianza (σ^2) para el analito marcado en comunicación física con el ligando en una muestra que comprende el analito, y
- 55 f) determinar la concentración del analito en dicha muestra usando la representación de la etapa d.

5. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que tanto el ligando como el analito son grandes.

60 6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que el ligando es grande y el analito es pequeño.

65 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la instrumentación basada en el flujo incluye unos instrumentos reservados para una CE Agilent, otros sistemas de CE, unos sistemas de HPLC, unos sistemas FCM o FIA.

8. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, en el que el ligando comprende un etiqueta detectable.
- 5 9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra se selecciona a partir de cualquier fluido corporal.
10. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra es una muestra de alimento.
- 10 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra de alimento es un producto lácteo.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra de alimento es una muestra de alimento que no comprende un producto lácteo.

Figura 1

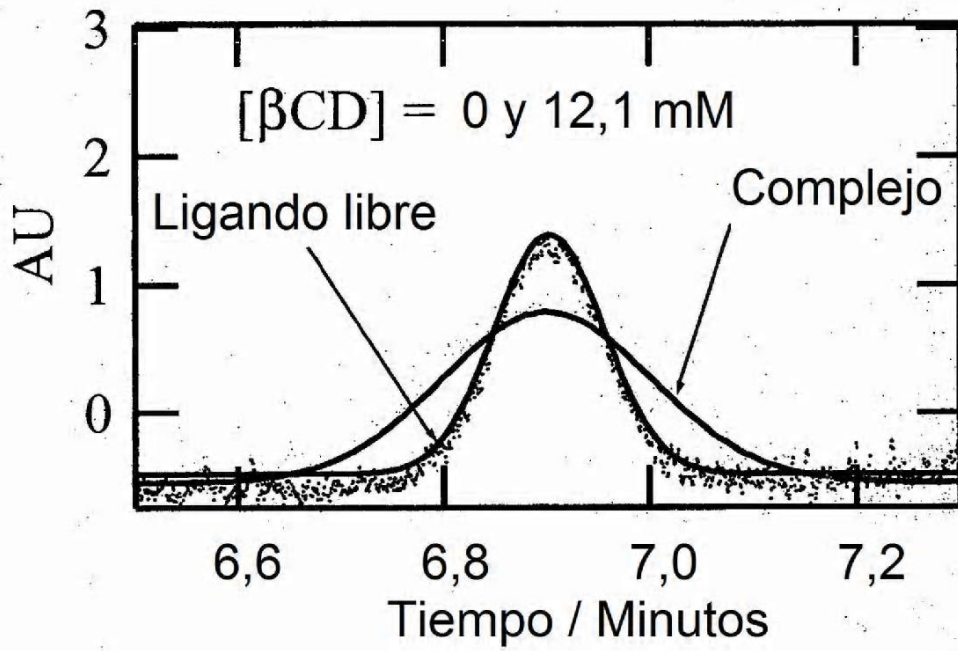


Figura 2

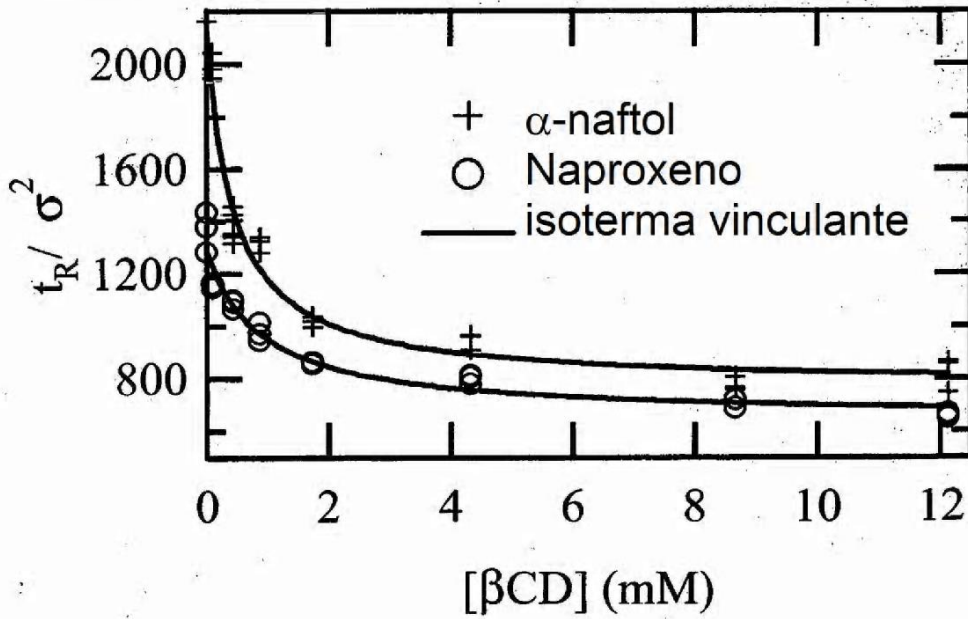


Figura 3

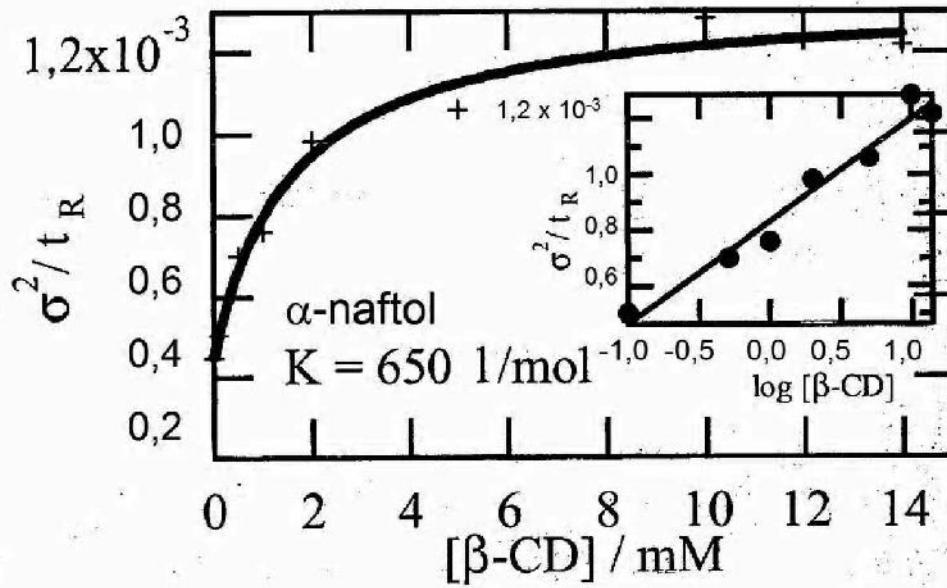


Figura 4

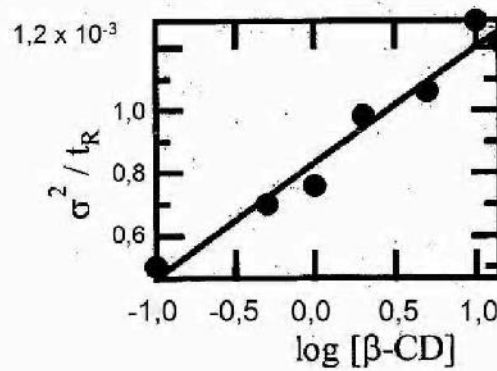


Figura 5

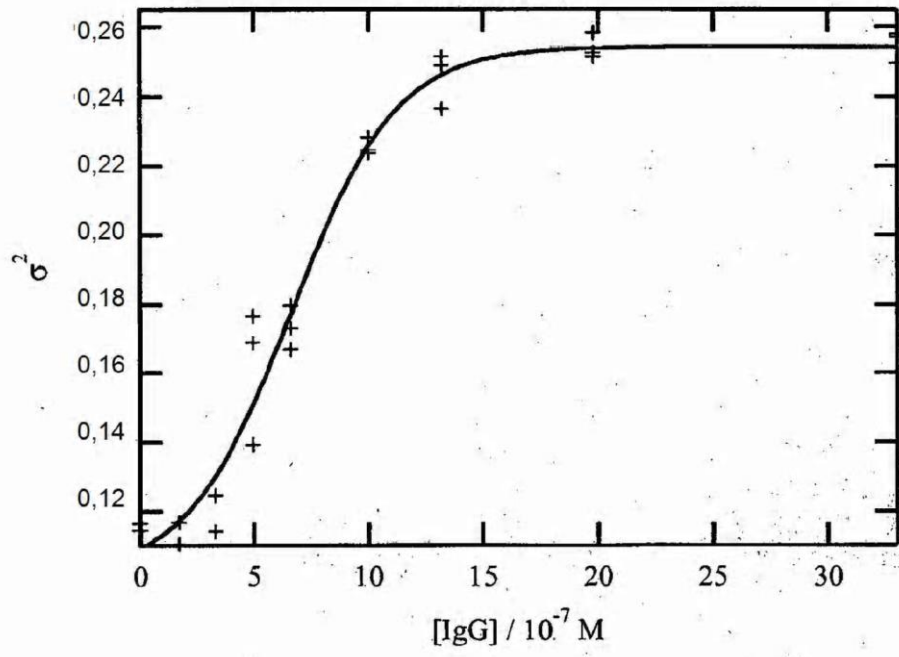


Figura 6

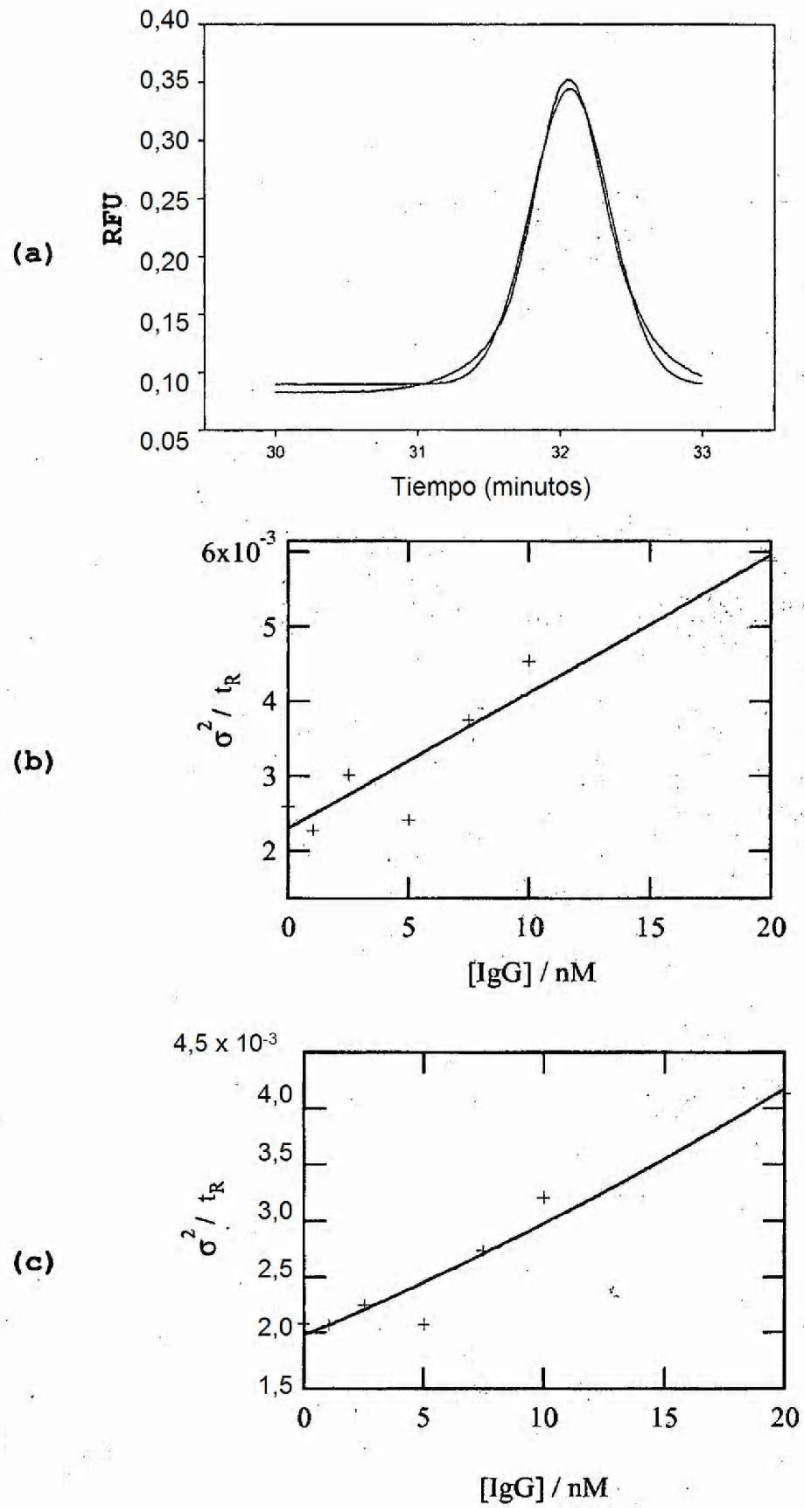


Figura 7

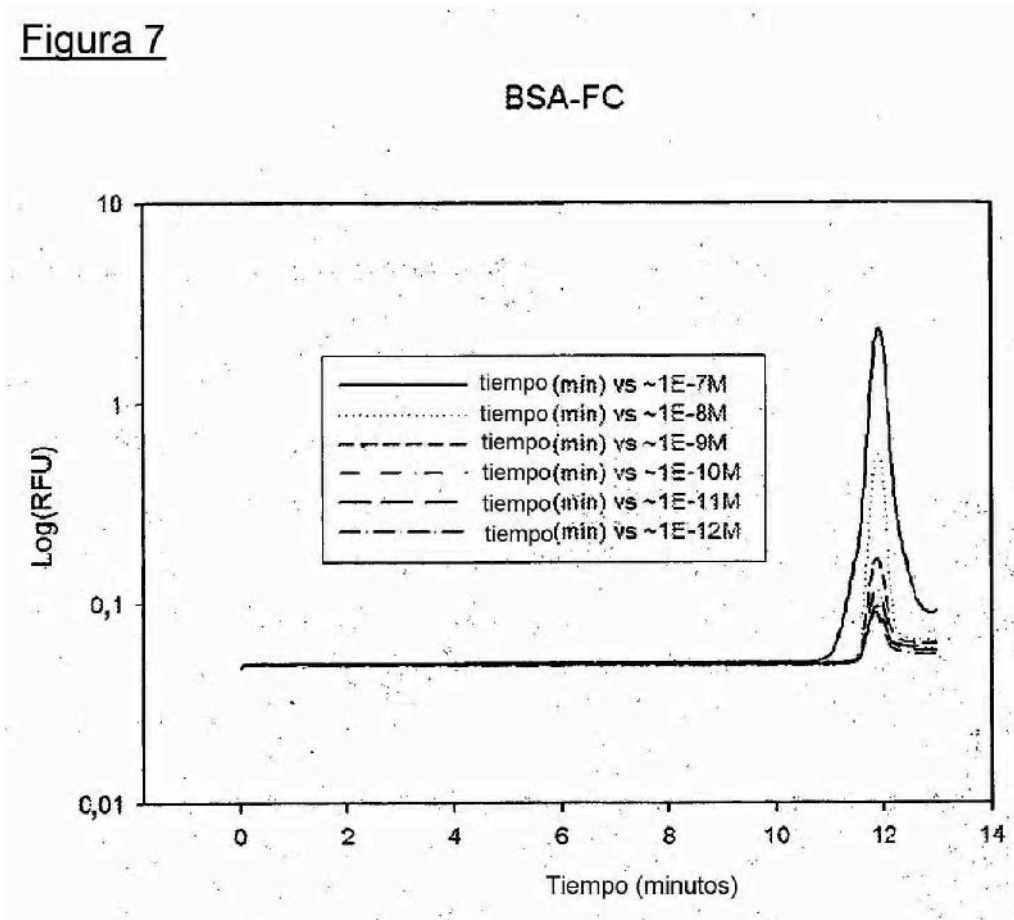


Figura 8

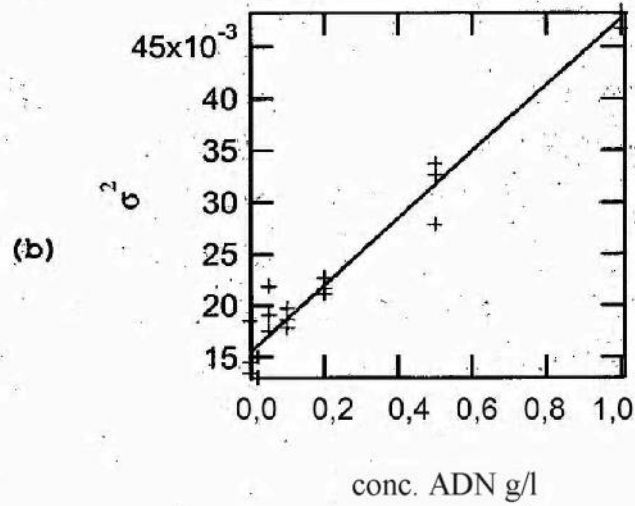
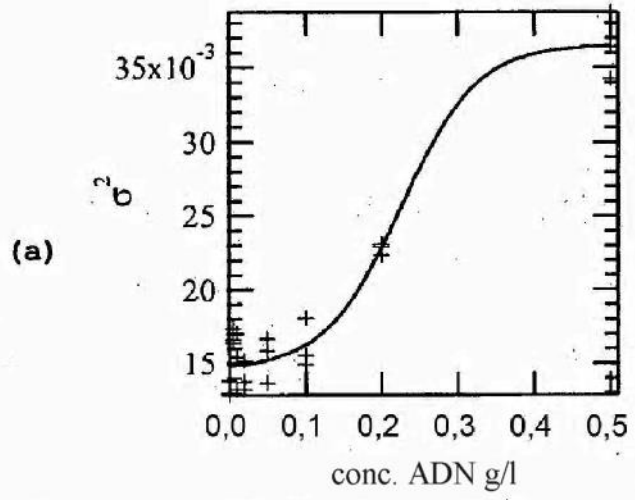


Figura 9

Bromocresol verde - albúmina de suero humano (HSA)
Determinación de la HSA en orina (detección - UV)

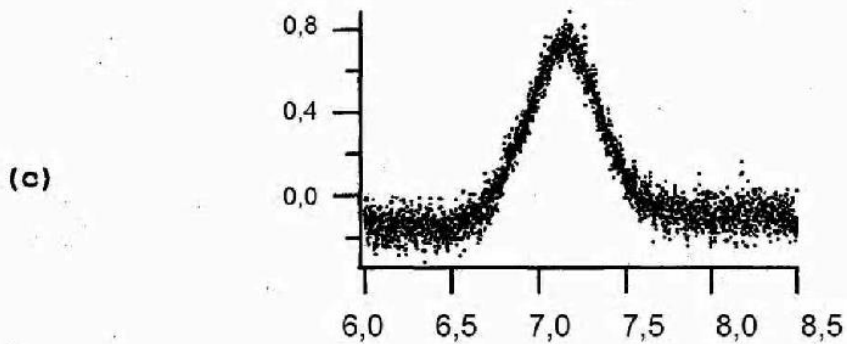
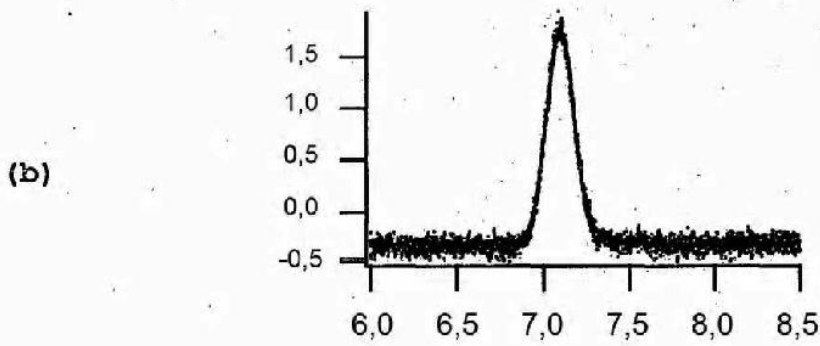
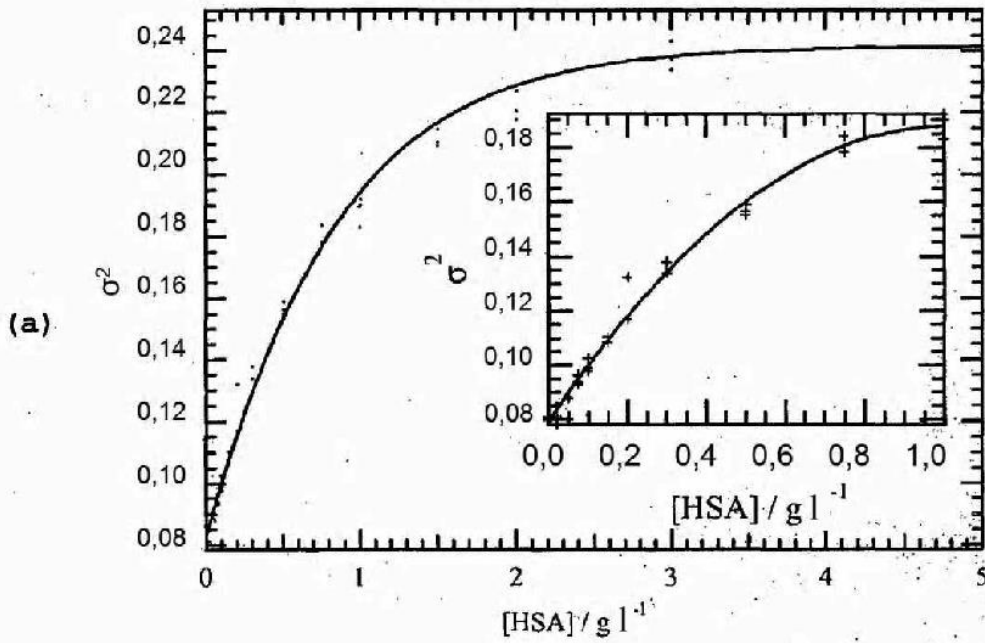


Figura 10

