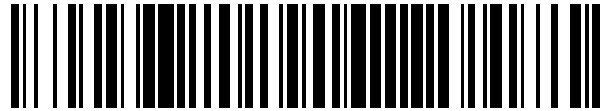


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 177**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/552 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2005 E 10190637 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2302078**

54 Título: **Microburbujas para concentración de afinidad**

30 Prioridad:

03.11.2004 US 624948 P

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

05.11.2015

73 Titular/es:

**IRIS MOLECULAR DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
2075 Corte del Nogal, Suite J
Carlsbad, CA 92011-1415, US**

72 Inventor/es:

**ADAMS, THOMAS y
JABLONSKI, EDWARD**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 177 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

Microburbujas para concentración de afinidad

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un método para la concentración por afinidad de células con base en la afinidad de microburbujas de albúmina recubiertas con una molécula de afinidad.

Antecedentes de la invención

10 El campo de las moléculas solubles, bacterias, virus y células aislantes ha usado diversos tipos de partículas como una base sólida para absorber o enlazarse a la diana de interés. Por ejemplo, las partículas magnéticas, cuando están recubiertas con un ligando, tal como un anticuerpo, puede enlazarse a una proteína soluble o célula diana. La diana enlazada sobre la partícula magnética efectúa una separación de la diana de otros tipos de células o proteínas. Ha habido diversos mejoramientos sobre el trabajo original y durante años ha habido ejemplos comerciales disponibles.

15 Otros han usado partículas de látex, liposomas, glóbulos de grasa de leche, partículas plásticas tales como poliestireno y polietileno y polipropileno, nylon, etcétera. Como soportes de captura, cada uno de estos tiene sus propios atributos y problemas particulares. El enlazamiento no específico de las células y proteínas que no son diana es el problema más común encontrado en estos métodos, lo cual da lugar a una separación imperfecta. Adicionalmente, la mayoría de los métodos requieren al menos un paso adicional después del enlazamiento para efectuar una separación de las especies no enlazadas de la partícula enlazada; por ejemplo, para partículas magnéticas tiene que aplicarse un campo magnético; a veces se usa la centrifugación para separar las partículas de una solución o la filtración de las partículas de una solución.

20 En términos generales, el tiempo requerido para enlazar las células o las proteínas diana está relacionado con el área de superficie de las partículas y la cantidad de partículas por unidad de volumen de solución. Mientras más pequeña sea la partícula, más rápido es el enlazamiento debido al área de superficie incrementada. Desafortunadamente, un área de superficie más grande por lo general incrementa un enlazamiento no específico.

25 Dependiendo de la naturaleza o del principio de la separación, los métodos de separación pueden coaislar diferentes partículas. Esto es evidente en separaciones basadas en centrifugación de gravedad, en la cual las partículas y las células u otras especies pueden formar gránulos conjuntamente. Además, algunos tipos de células tales como macrófagos y monocitos pueden, ellas mismas, ingerir de manera específica las partículas y pueden aislarse junto con las células diana. Mientras puedan minimizarse o impedirse limitaciones individuales de la tecnología previa realizando ciertos pasos o tomando ciertas precauciones, determinadas limitaciones son inherentes y no pueden superarse completamente. El hecho que haya muchas estrategias diferentes con grados variables de éxito sugiere que se necesita una mejor solución al problema.

35 El agente de separación óptima tendría un área de superficie infinita con cero interacción no específica, de modo que el enlazamiento ocurriría instantáneamente y se minimizaría el enlazamiento a células o moléculas solubles que no son diana. De modo ideal, el agente se separaría a sí mismo de la suspensión de células o de la solución de moléculas solubles sin atrapar células o moléculas no diana, respectivamente.

US 2003/104 359 divulga el uso de microburbujas de proteína para aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad, por el cual pueden destruirse las microburbujas aplicando presión o vacío o cambiando el pH.

Resumen de la invención

40 La presente invención proporciona un método para concentración de una célula por afinidad. El método comprende los pasos de proporcionar microburbujas de albúmina recubiertas con una molécula de afinidad que enlaza específicamente la célula en una solución, contactar las microburbujas de albúmina con las células que interactúan con la molécula de afinidad recubierta sobre las microburbujas de albúmina generando de esta manera microburbujas de albúmina recubiertas con las células, separar las microburbujas de albúmina recubiertas con las células usando un campo de centrifugación, concentrando de esta manera las células, y destruir las microburbujas de albúmina tratando las microburbujas de albúmina, recubiertas con las células, con un detergente o surfactante.

50 En la presente también se describen composiciones para usar en un aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad las cuales comprenden microburbujas que están recubiertas de modo covalente con una molécula de afinidad. Las microburbujas descritas en la presente son microburbujas de proteína, tales como microburbujas de albúmina. Las microburbujas de proteína pueden formarse mediante la introducción de un gas a una solución de proteína, por ejemplo mediante sonicación o sometimiento a ultrasonido. El gas puede introducirse a la albúmina mediante un proceso que comprende calentar una solución de proteína. Adicionalmente, las microburbujas de proteína pueden estabilizarse desnaturalizando la proteína o mediante tratamiento con Cr⁺⁺⁺, por ejemplo.

Además, en la presente se describen microburbujas de vidrio. Las microburbujas de vidrio tienen una densidad de aproximadamente 0.6 g/cm^3 y un diámetro promedio de alrededor de $30 \text{ }\mu\text{m}$.

De acuerdo con la invención, la molécula de afinidad puede ser un receptor, un ligando o un anticuerpo. De modo alternativo, la molécula de afinidad puede ser biotina, avidina o estreptavidina.

5 La molécula de afinidad puede acoplarse directamente a la microburbuja, por ejemplo usando un reactivo heterobifuncional tal como sulfosuccinimidilo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato. En otra modalidad de la invención, la molécula de afinidad se acopla indirectamente con la microburbujas tal como a través de la interacción de al menos otra molécula. En un aspecto de la invención, la microburbuja se acopla directamente a estreptavidina y la molécula de afinidad es biotinilada, de modo que la estreptavidina y la biotina interactúan para acoplar la molécula de afinidad a la microburbuja.

10 De acuerdo con una modalidad de la invención, la molécula de afinidad puede acoplarse directamente a la microburbuja por medio de un recubrimiento epoxi sobre la microburbuja. En otra modalidad, la molécula de afinidad se acopla por medio de un grupo funcional amina sobre la microburbuja.

15 Las microburbujas de vidrio descritas en la presente pueden tratarse para generar grupos superficiales reactivos, los cuales a su vez, al reaccionar con 3-aminopropiltriethoxi silano, generan aminas. Las microburbujas de vidrio son recubiertas con cis-diol y la molécula de afinidad se acopla directamente al vidrio a través del recubrimiento cis-diol. El recubrimiento cis-diol puede generarse, por ejemplo, tratando las microburbujas de vidrio para generar grupos de hidroxilo superficiales reactivos, haciendo reaccionar los grupos de hidroxilo con 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano para generar grupos funcionales epoxi, y tratando los grupos funcionales epoxi con ácido para convertir la función epoxi en funciones cis-diol.

20 En la presente se describe, además, un método para generar microburbujas de proteína para usar en aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad. El método comprende calentar una solución de proteína. La solución de proteína es tratada con ultrasonido para introducir gas a la solución, generando de esta manera microburbujas de proteína. Adicionalmente, la solución de proteína es tratada mecánicamente en presencia de un gas o una mezcla de gas.

25 En un aspecto de la divulgación, el gas es aire y la proteína es albúmina. Las microburbujas de albúmina pueden estabilizarse mediante tratamiento con Cr^{+++} , por ejemplo.

En la presente también se describe un método para generar microburbujas para usar en aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad, el cual comprende proporcionar microburbujas y recubrir las microburbujas con una molécula de afinidad.

30 En la presente también se describen métodos para aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad de una especie. Estos métodos comprende los pasos de proporcionar microburbujas recubiertas con una molécula de afinidad en una solución, poner en contacto las microburbujas con una especie que interactúa con la molécula de afinidad en una solución, generando de esta manera microburbujas recubiertas con la especie y permitir que las microburbujas recubiertas con la especie floten a la parte superior de la solución, separando de esta manera la especie de la solución. En estos métodos, la especie puede ser un receptor, un ligando o un antígeno. De modo alternativo, la especie es un analito. En otra alternativa, la especie es un virus o una célula.

35 En otro aspecto de la divulgación, las microburbujas de albúmina pueden ser tratadas con presión o vacío para liberar la especie.

Descripción detallada de la invención

40 Debe entenderse que tanto la descripción general precedente, como la descripción detallada siguiente son ejemplares y explicativas solamente y no restringen la invención reivindicada. Tal como se usa en la presente, el uso del singular incluye el plural a menos que se haga una declaración específica en un sentido diferente. Tal como se usa en la presente, "o" significa "y/o", a menos que se declare algo diferente. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas tales como "incluye" e "incluido(a)(s)" no es limitante. Tal como se usa en la presente, "poder" significa "tener la oportunidad de", al menos que se declare algo diferente.

45 Los títulos de sección utilizados en la presente son sólo para propósitos organizacionales y no deben interpretarse como limitantes del objeto descrito.

Definiciones

50 Antes de proceder más adelante con una descripción de las modalidades específicas de la presente invención, se definirá y se describirá en detalle una cantidad de términos.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, los procedimientos de laboratorio y las nomenclaturas utilizadas en conexión con las técnicas y métodos descritos en la presente son aquellos conocidos en el arte al cual ellos pertenecen. Los símbolos químicos y las abreviaturas estándar se usan de manera intercambiable con los nombres completos representados por tales símbolos. De esta manera, por ejemplo, se entiende que los términos "carbono" y "C" tienen significado idéntico. Las técnicas estándar pueden usarse para síntesis química, modificaciones químicas, análisis químicos, preparación, formulación, administración y tratamiento farmacéuticos de pacientes. Las técnicas estándar pueden usarse para metodología de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, cultivo de tejidos y similares. Las reacciones y las técnicas de purificación pueden realizarse, por ejemplo, usando kits de acuerdo con especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo comúnmente en el arte o como se describe en la presente. Las técnicas y los procedimientos precedentes pueden realizarse en términos generales según los métodos convencionales bien conocidos en el arte y tal como se describen en diversas referencias generales o más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente especificación. Véanse, por ejemplo, *Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), *Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)), los cuales se incorporan en su integridad a la presente mediante referencia para cualquier propósito.

"Burbuja", tal como se usa en la presente, se refieren a un glóbulo pequeño, hueco y de peso ligero, típicamente un volumen esférico pequeño de gas encapsulado dentro de una película delgada. Las burbujas pueden llenarse con cualquier gas que incluye, pero no se limita a oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, gases de fluorocarbono y diversas combinaciones de los mismos, tales como el aire. La película delgada puede ser de cualquier material que pueda encapsular un volumen pequeño de gas, tal como una proteína o un lípido insoluble; un material polimérico o no polimérico; un sólido tal como un metal; un material sólido de vidrio, cerámico o similar; o un plástico, tal como poliestireno, polietileno, polipropileno, nailon, etc. En la presente invención, sin embargo, la película delgada es albúmina. De manera alternativa, la película delgada también puede ser vidrio de borosilicato. En una modalidad, la película delgada es estable en las condiciones y soluciones a las que se expone. En otra modalidad, la burbuja puede estallar, aplastarse o solubilizarse de manera selectiva.

"Microburbujas" son burbujas pequeñas, generalmente en el intervalo de 0.1 a 100 µm, típicamente 1 a 50 y frecuentemente 2 a 20 o 2 a 30 µm en diámetro.

El término "analito", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier sustancia que es deseable detectar en un ensayo y que puede estar presente en una muestra. El analito puede ser cualquier sustancia sin limitación. El analito puede ser una sustancia para la cual existe un anticuerpo de ocurrencia natural o para la cual puede prepararse un anticuerpo. El analito puede ser, por ejemplo, una proteína, un polipéptido, un hapteno, un carbohidrato, un lípido, un medicamento, una célula, un subcomponente celular u orgánulo (por ejemplo, lisosomas, mitocondrias) o cualquiera otro de una amplia variedad de complejos o moléculas biológicas o no biológicas o combinaciones de los mismos. De manera alternativa, el analito es un anticuerpo. Otro ejemplo del analito es un ácido nucleico (ADN, ARN, APN y ácidos nucleicos que son mezclas de los mismos o que incluyen derivados o análogos de nucleótido).

Analitos ligandos polivalentes que pueden detectarse usando composiciones, métodos y kits de la presente invención normalmente serán poli (aminoácidos), es decir polipéptidos y proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos. Tales combinaciones incluyen componentes de células, tejidos, bacterias, virus, paredes celulares, membranas celulares, orgánulos celulares, cromosomas, genes, mitocondrias, núcleos y similares. Ciertos analitos no contienen ácido nucleico.

Una amplia variedad de analitos de proteína pueden detectarse ventajosamente usando los métodos de la presente invención. Tales analitos de proteína pueden clasificarse de acuerdo a la familia, y cada familia tiene similares características estructurales, funciones biológicas, relación con microorganismos específicos (particularmente microorganismos que causan enfermedad), y similares. Las familias de proteínas de interés particular para la presente invención incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas, citoquinas, enzimas, hormonas, antígenos de cáncer, marcadores nutricionales, antígenos específicos de tejido y agentes de armas biológicas. Estos analitos de proteína pueden estar presentes en sangre, suero, plasma, fluido espinal, fluido sinovial, saliva, orina, semen, fluido protésico, células o tejidos.

Los siguientes son ejemplos de clases de analitos de proteína relacionados por estructura, los cuales pueden detectarse usando las composiciones, métodos y kits descritos en la presente:

- protaminas
- histonas
- albúminas
- globulinas

escleroproteínas

fosfoproteínas

mucoproteínas

5 Los siguientes ejemplos son proteínas clínicamente importantes, encontradas en plasma humano que pueden ser detectadas usando las composiciones, métodos y de la presente divulgación:

α 1-Lipoproteína

α 1-Antitripsina

Transcortina

4.6S-Postalbúmina

10 Triptofan-*poor*

α 1-Glicoproteína

α 1 χ -Glicoproteína

Globulina que enlaza tiroxina

Inhibidor de inter- α -tripsina

15 Gc-globulina

(Gc 1-1)

(Gc 2-1)

(Gc 2-2)

Haptoglobina

20 (Hp 1-1)

(Hp 2-1)

(Hp 2-2)

Ceruloplasmina

Colinesterasa

25 α 2-Lipoproteína(s)

Proteína C-reactiva

α 2-Macroglobulina

α 2 -HS-glicoproteína

Zn- α 2-glicoproteína

30 α 2-Neuramino-glicoproteína

Eritropoyetina

β -lipoproteína

Transferrina

Hemopexina

	Fibrinógeno
	Plasminógeno
	β 2-glicoproteína I
	β 2-glicoproteína II
5	Inmunoglobulina G (IgG), o γ G-globulina Fórmula molecular: $\gamma_2\kappa_2$ o $\gamma_2\lambda_2$ Inmunoglobulina A (IgA) o γ A-globulina Fórmula molecular: $(\alpha_2 \kappa_2)^n$ o $(\alpha_2 \lambda_2)^n$
10	Inmunoglobulina M (IgM) o γ M-globulina Fórmula molecular: $(\mu_2 \kappa_2)^5$ o $(\mu_2 \lambda_2)^5$ Inmunoglobulina D (IgD) o γ D-Globulina (γ D) Fórmula molecular: $(\delta_2 \kappa_2)$ o $\delta_2 \lambda_2$ Inmunoglobulina E (IgE) o γ E-Globulina (γ E)
15	Fórmula molecular: $(\epsilon_2 \kappa_2)$ o $(\epsilon_2 \lambda_2)$ Cadenas ligeras libres de κ y λ Factores de complemento:
	C'1
	C'1q
20	C'1r
	C'1s
	C'2
	C'3
	β_1 A
25	α_2 D
	C'4
	C'5
	C'6
	C'7
30	C'8
	C'9

Factores importantes de coagulación de sangre que pueden detectarse usando las composiciones, métodos y kits de la presente divulgación incluyen los ejemplos listados en la tabla de abajo.

Tabla 1. Factores de coagulación de sangre

	Denominación internacional	Nombre
	I	Fibrinógeno
	II	Protrombina
	Ila	Trombina
5	III	Tromboplastina de tejido
	V y VI	Proaccelerina, acelerador, globulina,
	VII	Proconvertina
	VIII	Globulina antihemofílica (AHG)
	IX	Factor de Christmas componente de tromboplastina de plasma (PTC)
10	X	Factor de Stuart-Prower, autoprotrrombina III
	XI	Tromboplastina de plasma
	XIII	Factor estabilizante de fibrina

Hormonas de proteína importantes que pueden detectarse usando las composiciones y los métodos de la presente divulgación incluyen:

- 15 Hormonas de péptido y proteína
- Hormona paratiroidea (paratromona)
 - Tirocalcitonina
 - Insulina
 - Glucagón
- 20 Relaxina
- Eritropoyetina
 - Melanotropina (hormona estimulante de melanocito; intermedina)
 - Somatotropina (hormona de crecimiento)
 - Corticotropina (hormona adrenocorticotrópica)
- 25 Tirotropina
- Hormona estimulante de folículo
 - Hormona luteinizante (hormona estimulante de célula intersticial)
 - Hormona luteomamotrópica (luteotropina, prolactina)
 - Gonadotropina (gonadotropina coriónica)
- 30 Hormonas de tejido
- Secretina
 - Gastrina
 - Angiotensina I y II
 - Bradiquinina

- Lactógeno placentario humano
- Citocinas
 - IL 1
 - IL 2
 - 5 IL 4
 - IL 6
 - IL 8
 - IL 10
 - EGF
 - 10 TNF
 - NGF
- Antígenos de cáncer
 - PSA
 - CEA
 - 15 α -fetoproteína
 - Fosfatasa ácida
 - CA19.9
 - CA125
- Antígenos específicos de tejido
 - 20 Fosfatasa alcalina
 - Mioglobina
 - CPK-MB
 - Troponina
 - BNP
 - 25 Pro-BNP
 - Calcitonina
 - Proteína básica de mielina
 - Hormonas de péptido de la neurohipófisis
 - Oxitocina
 - 30 Vasopresina
- Factores de liberación (RF por *releasing factors*) CRF, LRF, TRF, Somatotropina-RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF
- Ricina
- Toxina de difteria
- Toxina de botulismo

Enterotoxina de estafilococo B

Las bacterias y virus también son analitos que pueden detectarse usando las composiciones, métodos y kits de la presente divulgación. Entre estos analitos biológicos se incluyen entre otros:

Corynebacterias

5 *Corynebacterium diphtheria*

Neumococos

Diplococcus pneumoniae

Estreptococos

Streptococcus pyogenes

10 *Streptococcus salivarius*

Estafilococos

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Neisseria

15 *Neisseria meningitidis*

Neisseria gonorrhoea

Enterobacterias

Coliformes

Escherichia coli

20 *Aerobacter aerogenes*

Klebsiella pneumoniae

Salmonelas

Salmonella tyfosa

Salmonella choleraesuis

25 *Salmonella typhimurium*

Shigellas

Shigella dysenteriae

Shigella schmitzii

Shigella arabinotard

30 *Shigella flexneri*

Shigella boydii

Shigella sonnei

Otros bacilos entéricos

Proteus vulgaris

- Proteus mirabilis*
- Proteus species*
- Proteus morgani*
- Pseudomonas aeruginosa*
- 5 *Alcaligenes faecalis*
- Vibrio cholerae*
- Grupo de hemofilo-bordetela
- Hemophilus influenza*,
- Hemophilus ducryi*
- 10 *Hemophilus hemophilus*
- Hemophilus aegypticus*
- Hemophilus parainfluenza*
- Bordetallci pertussis*
- Pasteurellas
- 15 *Pasteurella pestis*
- Pasteurella tulareusis*
- Brucellas
- Brucella melitensis*
- Brucella abortus*
- 20 *Brucella suis*
- Bacilos formadores de esporas aeróbicas
- Bacillus anthracis*
- Bacillus subtilis*
- Bacillus megaterium*
- 25 *Bacillus cereus*
- Bacilos formadores de esporas anaeróbicas
- Clostridium botulinum*
- Clostridium tetani*
- Clostridium perfringens*
- 30 *Clostridium novyi*
- Clostridium septicum*
- Clostridium histolyticum*
- Clostridium tertium*
- Clostridium bifermentans*

- Clostridium sporogenes*
- Micobacterias
- Mycobacterium tuberculosis hominis*
- Mycobacterium bovis*
- 5 *Mycobacterium avium*
- Mycobacterium leprae*
- Mycobacterium paratuberculosis*
- Actinomicetos (bacterias similares a hongos)
- Actinomyces Israeli*
- 10 *Actinomyces bovis*
- Actinomyces naeslundii*
- Nocardia asteroides*
- Nocardia brasiliensis*
- Las espiroquetas
- 15 *Treponema pallidum*
- Treponema pertenue*
- Treponema carateum*
- Borrelia recurrentis*
- Leptospira icterohemorrhagiae*
- 20 *Leptospira canicola*
- Tripanasomas*
- Micoplasmas
- Mycoplasma pneumoniae*
- Otros patógenos
- 25 Rickettsias (parásitos similares a bacterias)
- Rickettsia prowazekii*
- Rickettsia mooseri*
- Rickettsia rickettsii*
- Rickettsia conori*
- 30 *Rickettsia australis*
- Rickettsia sibiricus*
- Rickettsia akari*
- Rickettsia tsutsugamushi*
- Clamidia (parásitos bacterianos/virales inclasificables)

Agentes de clamidia (denominación incierta)

Hongos

Cryptococcus neoformans

Blastomyces dermatidis

5 *Hisoplasma capsulatum*

Coccidioides immitis

Paracoccidioides brasiliensis

Candida albicans

Aspergillus Fumigatus

10 *Mucor corymbifer (Absidia corymbifera)*

Rhizopus oryzae

Rhizopus arrhizua

Phycomycetes

Rhizopus nigricans

15 *Sporotrichum schenkii*

Flonsecaea pedrosoi

Fonsecaea compact

Fonsecaea dermatidis

Cladosporium carrionii

20 *Phialofora verrucosa*

Aspergillus nidulans

Madurella mycetomi

Madurella grisea

Allescheria boydii

25 *Phialophora jeanselmei*

Microsporum gypseum

Trichophyton mentagrophytes

Keratinomyces ajelloi

Microsporum canis

30 *Microsporum adouini*

Trichophyton rubrum

Virus

Adenovirus

Virus de herpes

- Herpes simplex*
- Varicella (varicela)*
- Herpes Zoster (culebrilla)*
- Virus B*
- 5 *Cytomegalovirus*
- Virus de plaga
- Variola (viruela)*
- Vaccinia*
- Poxvirus bovis*
- 10 *Paravaccinia*
- Molluscum contagiosum*
- Picornavirus
- Virus de polio*
- Coxsackievirus*
- 15 *Echovirus*
- Rhinovirus*
- Mixovirus
- Parainfluenza (1-4)*
- Virus de paperas
- 20 Virus de la enfermedad de Newcastle
- Virus de sarampión
- Virus de peste bovina
- Virus de moquillo
- Virus sincicial respiratorio
- 25 Virus de rubéola
- Arbovirus
- Virus de encefalitis equina oriental*
- Virus de encefalitis equina occidental*
- Virus sindbis*
- 30 *Virus chikugunya*
- Virus del bosque en Semliki*
- Virus Mayaro*
- Virus de encefalitis de San Luis*
- Rickettsia prowazekii*

Virus de encefalitis de California

Virus de la fiebre por garrapatas de Colorado

Virus de la fiebre amarilla

Virus de dengue

5 Reovirus

Reovirus tipos 1-3

Retrovirus

Virus de inmunodeficiencia humana I y II (VIH)

Virus linfotrópico de células T humanas I & II (VLTH)

10 Hepatitis

Virus de hepatitis A

Virus de hepatitis B

Virus de hepatitis C

Virus de tumor

15 *Virus de leucemia de Rauscher*

Virus de Gross

Virus de leucemia de Maloney

Virus de papiloma humano

20 Además, puede ser deseable detectar tejido o células, normales o enfermos, de un paciente. La presencia o la ausencia de ciertas células cancerosas circulantes, u otras por ejemplo, puede ser un diagnóstico de enfermedad. De esta manera, las células endógenas de un paciente humano son analitos que pueden ser detectados ventajosamente usando las composiciones, métodos y kits descritos en la presente.

25 El término "molécula de afinidad", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier molécula que sea capaz de enlazarse específicamente con otra molécula. En una modalidad, la molécula de afinidad es un anticuerpo. En otra modalidad, la molécula de afinidad es un antígeno. En otras modalidades de la invención, las moléculas de afinidad pueden incluir, sin limitación: ácidos nucleicos (ADN, ARN, APN y ácidos nucleicos que son mezclas de los mismos o que incluyen derivados o análogos de nucleótidos); las moléculas de receptor biológico, tales como el receptor de insulina; ligandos para receptores (por ejemplo, insulina para el receptor de insulina); y moléculas biológicas, químicas u otras que tienen afinidad por otra molécula, tal como biotina y avidina. Las moléculas de afinidad de la presente divulgación no necesitan comprender una molécula que se encuentra enteramente en la naturaleza, sino puede consistir de solamente una porción, fragmento o subunidad de una molécula que se encuentra naturalmente o no naturalmente, tal como por ejemplo el fragmento de Fab de un anticuerpo. La molécula de afinidad puede comprender además un marcador que puede ser detectado.

35 Las moléculas de afinidad pueden generarse por cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos pueden encontrarse en un antisuero, prepararse a partir de un cultivo de tejido de hibridoma sobrenadante o fluido de ascitis, o pueden derivarse a partir de un sistema de expresión recombinante, como se conoce bien en el arte. Los fragmentos, porciones o subunidades de, por ejemplo, un anticuerpo, receptor u otras especies puede generarse por medios químicos, enzimáticos u otros, produciendo, por ejemplo, moléculas bien conocidas (por ejemplo, Fab, Fab') o novedosas. La presente invención también contempla que las moléculas de afinidad pueden incluir moléculas recombinantes, químicas e híbridas, tales como anticuerpos humanizados o primatizados, y otras formas de anticuerpo de ocurrencia no natural. Aquellos con habilidad en la técnica reconocerán que los ejemplos no limitantes dados arriba, que describen diversas formas de anticuerpos, también pueden extenderse a otras moléculas de afinidad tales como las formas recombinantes, químicas, híbridas, truncadas, etc. Las moléculas de no anticuerpo pueden usarse en los métodos de la presente invención.

Con los términos “que se enlaza específicamente” y “enlazamiento específico”, tal como se usa en la presente, se quiere decir que un anticuerpo u otra molécula, especialmente una molécula de afinidad de la divulgación, se enlaza a una diana tal como un antígeno, ligando u otro analito, con mayor afinidad de la que se enlaza a otras moléculas en las condiciones especificadas de la presente divulgación. Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, tal como se conoce en la técnica, son moléculas de polipéptido que contienen regiones que pueden enlazarse con otras moléculas, tales como antígenos. En diversos aspectos de la divulgación, “que se enlaza específicamente” puede significar que un anticuerpo u otra molécula de afinidad, se enlaza a una molécula de analito diana con una afinidad mayor en al menos 10^6 veces, preferiblemente una afinidad mayor de al menos 10^7 veces, más preferiblemente una afinidad mayor de al menos 10^8 veces y lo más preferiblemente una afinidad mayor de al menos 10^9 veces de la que se enlaza a moléculas no relacionadas con la molécula diana. De manera típica, el enlazamiento específico se refiere a afinidades en el rango de aproximadamente 10^6 veces hasta aproximadamente 10^9 veces mayores que el enlazamiento no específico. En algunos aspectos, el enlazamiento específico puede caracterizarse por afinidades mayores a 10^9 veces sobre el enlazamiento no específico. Siempre que aparezca un intervalo en la presente, tal como en 1-10 o uno a diez, el intervalo se refiere sin limitación a cada número entero o unidad de medida en el intervalo dado. De esta manera, 1-10 significa cada uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y cualquier subunidad entre los mismos.

“Anticuerpos policlonales” o “PAbs” son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales pueden inmunizarse animales hospederos, tales como conejos, ratones y cabras mediante inyección con un antígeno o un conjugado soporte de hapteno, opcionalmente suplementado con adyuvantes. Los anticuerpos policlonales pueden ser no purificados, purificados o parcialmente purificados de otras especies en un antisuero. Las técnicas para la preparación y la purificación de anticuerpos policlonales son bien conocidas en el arte y se describen en diversas referencias generales y más específicas, que incluyen pero no se limitan a *Kabat & Mayer, Experimental Immunochimistry*, segunda edición, (Thomas, Springfield, IL (1961)); *Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)); y *Weir, Handbook of Experimental Immunology*, quinta edición, (Blackwell Science, Cambridge, MA (1996)).

“Anticuerpos monoclonales” o “Mabs”, los cuales son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo, tal como mediante cultivo continuo de líneas celulares. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridoma de Köhler y Milstein, *Nature*, 256:495-7 (1975); y la patente estadounidense No. 4,376,110, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kosbor, et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-30 (1983)), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole, et al., en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, pp. 77-96 (1985)). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. La hibridoma que produce el MAb de esta invención puede cultivarse in vitro o in vivo. La producción de altos títulos de MAbs in vivo hace a este un método de producción actualmente preferido.

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); Takeda, et al., *Nature*, 314:452-54 (1985)) empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico puede ser una molécula en la cual se derivan diferentes porciones de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un MAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena (patente estadounidense No.4,946,778; Bird, *Science* 242:423-26 (1988); Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-83 (1988); y Ward, et al, *Nature*, 334:544-46 (1989)) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única de gen adecuados para usarse en la presente divulgación. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman típicamente mediante enlazamiento de fragmentos de cadena pesada y ligera de la región de Fv a través de un puente de aminoácido, lo que da lugar a un polipéptido de cadena sencilla.

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen pero no se limitan a: los fragmentos de $F(ab')_2$ que pueden producirse mediante digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos de Fab que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos de $F(ab')_2$. De manera alternativa, pueden construirse librerías de expresión de Fab (Huse, et al., *Science*, 246:1275-81 (1989)) para permitir una identificación rápida y fácil de los fragmentos de Fab monoclonal con la especificidad deseada.

El término “hapteno”, tal como se usa en la presente, se refiere a un determinante antigénico pequeño, proteínico o no proteínico, el cual es capaz de ser reconocido por un anticuerpo. De manera típica, los haptenos no suscitan una formación de anticuerpo en un animal a no ser que sea parte de una especie más grande. Por ejemplo, los haptenos de péptido pequeños frecuentemente se acoplan a una proteína soporte tal como la hemocianina de lapas hendidas a fin de generar una respuesta de anticuerpo anti-hapteno.

“Antígenos” son macromoléculas capaces de generar una respuesta de anticuerpo en un animal y ser reconocidas por el anticuerpo resultante. Tanto antígenos como haptenos comprenden al menos un determinante antigénico o “epítopo”, el cual es la región del antígeno o del hapteno que se enlaza al anticuerpo. De manera típica, el epítopo sobre un hapteno es la molécula entera.

5 “Receptor” o “receptor biológico” típicamente se refiere a una estructura molecular dentro o sobre la superficie de una célula caracterizada por enlazar selectivamente una sustancia específica (por ejemplo, un “ligando”) y dar lugar a un efecto fisiológico específico que acompaña el enlazamiento. Ejemplos de receptores incluyen receptores de superficie celular para hormonas de péptido, neurotransmisores, antígenos, fragmentos de complemento e inmunoglobulinas, y receptores citoplásmicos para hormonas esteroides. Tal como se usa en la presente, no obstante, el receptor se aislará y se purificará de modo típico y no necesitará efectuar o ser capaz de efectuar un efecto fisiológico u otro biológico. Los métodos de la presente divulgación explotan el enlazamiento selectivo del receptor a la sustancia específica.

15 El término “ligando” se refiere generalmente a una molécula que se enlaza a un receptor. De manera típica, un ligando es una molécula pequeña, soluble, tal como una hormona o neurotransmisor. El término “soporte sólido” se refiere a cualquier fase sólida que puede usarse para inmovilizar, por ejemplo, un analito, un anticuerpo o un complejo. Los soportes sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen las paredes de los pozos de una bandeja de reacción, tal como una placa de microtitulación, las paredes de los tubos de ensayo, gránulos de poliestireno, gránulos paramagnéticos o no magnéticos, membranas de nitrocelulosa, membranas de nylon, micropartículas tales como partículas de látex y glóbulos rojos de oveja (o de otro animal). Los materiales típicos para soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a poli (cloruro de vinilo) (PVC), poliestireno, celulosa, nailon, látex y derivados de los mismos.

Además, el soporte sólido puede estar recubierto, derivado o modificado de otra manera para promover la adición de las moléculas deseadas (por ejemplo analitos) y/o para impedir enlazamiento no específico u otras interacciones no deseadas. La elección de una “fase sólida” específica usualmente no es crítica y puede seleccionarse por alguien con habilidad en la técnica, dependiendo del ensayo empleado. De esta manera, las partículas de látex, micropartículas, gránulos para magnéticos o no magnéticos, membranas, tubos plásticos, paredes de pozos de microtitulación, trocitos de vidrio o de silicio y glóbulos rojos son todos soportes sólidos adecuados. De manera conveniente, el soporte sólido puede seleccionarse para admitir diversos métodos de detección. Por ejemplo, pueden usarse placas de 96 o 384 pozos para ensayos que serán automatizados, por ejemplo mediante estaciones de trabajo robotizadas, y/o aquellos que serán detectados usando un lector de placa, por ejemplo. Para los métodos descritos en la presente que puedan involucrar un paso de detección autorradiográfico o quimioluminiscente utilizando una visualización con base en película, el soporte sólido puede ser una membrana delgada tal como una membrana de nitrocelulosa o de nylon. En los métodos descritos en la presente, en los cuales se realizan inmunoensayos de sándwich, típicamente se emplean las paredes de los pozos de una bandeja de reacción. También pueden usarse gránulos paramagnéticos como un soporte sólido. Los métodos adecuados para inmovilizar moléculas en fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófugas, covalentes y similares, y combinaciones de las mismas. Sin embargo, el método de inmovilización típicamente no es importante y puede involucrar mecanismos de adsorción no caracterizados. Un “soporte sólido”, tal como se usa en la presente, puede referirse de esta manera a cualquier material que es insoluble, o que puede hacerse insoluble mediante una reacción subsiguiente. El soporte sólido puede elegirse por su capacidad intrínseca de atraer e inmovilizar un reactivo de captura. Como alternativa, la fase sólida puede retener un receptor adicional el cual tiene la capacidad de atraer e inmovilizar un reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia que está cargada opuesta mente con respecto al reactivo de captura mismo o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura.

Una molécula receptora adicional puede ser cualquier miembro de enlazamiento específico el cual se inmoviliza sobre (adhiera a) la fase sólida y que tiene la capacidad de inmovilizar un reactivo de captura a través de una reacción de enlazamiento específico. La molécula receptora adicional permite la inmovilización indirecta del reactivo de captura a una fase sólida antes o durante la realización del ensayo. La fase sólida puede ser entonces una superficie de vidrio o de silicio de un tubo de ensayo, pozo de microtitulación, lámina, gránulo, micropartículas, trocitos (chips) de plástico, plástico derivado, metal paramagnético o no magnético, u otras configuraciones conocidas por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica.

“Péptido” generalmente se refiere a una cadena corta de aminoácidos enlazados por enlaces de péptido. De manera típica, los péptidos comprenden cadenas de aminoácidos de alrededor de 2-100, más típicamente alrededor de 4-50 y lo más comúnmente alrededor de 6-20 aminoácidos. “Polipéptido” generalmente se refiere a secuencias de cadenas individuales, rectas o ramificadas, de aminoácidos que típicamente son más largas que los péptidos. “Polipéptidos” usualmente comprenden al menos alrededor de 100 a 1000 aminoácidos en longitud, más típicamente al menos alrededor de 150 a 600 aminoácidos y frecuentemente al menos alrededor de 200 hasta aproximadamente 500 aminoácidos. “Proteínas” incluyen polipéptidos individuales así como también complejos de cadenas de polipéptidos múltiples que pueden ser los mismos o diferentes. Cadenas múltiples en una proteína pueden caracterizarse mediante estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, como también la estructura de secuencia primaria de aminoácidos; pueden mantenerse juntas, por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro; y pueden incluir modificaciones post-sintéticas tales como, sin limitación, glicosilación, fosforilación, truncamientos u otros

procesamientos. Los anticuerpos tales como las proteínas IgG, por ejemplo, están constituidas de manera típica de cuatro cadenas de polipéptido (es decir de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) que se mantienen juntas mediante enlaces de disulfuro. Además, las proteínas pueden incluir componentes adicionales tales como metales asociados (por ejemplo, hierro, cobre y azufre) u otros grupos. Las definiciones de péptidos, polipéptidos y proteínas incluyen, sin limitación, formas biológicamente activas e inactivas; formas desnaturalizadas y nativas, así como también formas variantes, modificadas, truncadas, híbridas y quiméricas de las mismas. Los péptidos, oligopéptidos y proteínas descritos en la presente pueden derivarse de cualquier fuente o mediante cualquier método que incluye, pero no se limita a extracción de tejidos u otra ocurrencia natural u otros materiales; producción recombinante en organismos hospederos tales como células de bacterias, hongos, plantas, insectos o animales; y síntesis química usando métodos que son bien conocidos para el experto en la materia.

El término "conjugado", tal como se usa en la presente, se refiere a dos moléculas que se han unido de modo covalente o se han enlazado de alguna otra manera. Un conjugado de ácido nucleico se genera mediante enlace covalente de un ácido nucleico con una proteína, polipéptido u otra molécula de afinidad. En un aspecto preferido de la divulgación, la proteína, el polipéptido u otra molécula de afinidad se adhiere de modo covalente a un ácido nucleico por medio de un grupo de enlace para formar un conjugado.

Un "kit" para detectar la presencia de un analito en una muestra mediante los métodos de la divulgación puede comprender, a manera de ejemplo, al menos un medio de contenedor que tiene dispuesto en él mismo un par de enlazamiento específico para el analito seleccionado. El kit puede comprender, además, otros contenedores que comprenden uno o más de los siguientes: reguladores de pH, soluciones u otros reactivos y materiales necesarios para realizar la detección del analito; reactivos capaces de amplificar los componentes de sonda de ácido nucleico de los pares de enlazamiento; y reactivos capaces de detectar la presencia de componentes de ácido nucleico después de la amplificación. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para uso. El kit, si está destinado para uso diagnóstico, puede incluir también notificación de un uso aprobado por la FDA e instrucciones para el mismo.

De manera específica, un kit compartimentado incluye cualquier kit en el cual los reactivos están contenidos en contenedores separados. Tales contenedores incluyen pequeños contenedores de vidrio, contenedores plásticos o tiras de plástico o de papel. Tales contenedores permiten la transferencia eficiente de reactivos desde un compartimento a otro compartimento de modo que las muestras y los reactivos no se contaminan de modo cruzado y los reactivos o soluciones de cada contenedor pueden adicionarse de una forma cuantitativa desde un compartimento a otro. Tales contenedores pueden incluir un contenedor que aceptará una muestra de ensayo, un contenedor que contiene la sonda o los cebadores usados en el ensayo, contenedores que contienen reguladores de pH y reactivos (tales como soluciones salinas reguladas con fosfato, reguladores Tris de pH, y similares), y contenedores que contienen los reactivos usados para detectar el ácido nucleico marcador, el producto amplificado o similares. Alguien versado en la materia reconocerá fácilmente que los pares de enlazamiento y/o los materiales preformados, los suministros y los reactivos necesarios para preparar pares de enlazamiento pueden incorporarse fácilmente a uno de los formatos establecidos del kit que son bien conocidos en la técnica.

Un kit para acoplar ADN a un anticuerpo u otra molécula de afinidad mediante los métodos de la divulgación puede comprender al menos un medio de contenedor que tiene dispuesto en él mismo el ADN liofilizado activado. El kit puede comprender además otros contenedores que comprenden uno o más de los siguientes: reactivos, reguladores de pH y agentes capaces de detectar la presencia de ácido nucleico después de la reacción. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para uso. Un kit para hacer y usar las composiciones y métodos para aislar y ensayar analitos descritos en la presente puede incluir la microburbuja ya fabricada o la película delgada usada para crear la microburbuja. Asimismo, la microburbuja del kit puede o puede no tener ya la molécula de afinidad adherida. El kit puede comprender además otros contenedores que comprenden uno o más de los siguientes: reactivos, reguladores de pH y agentes capaces de hacer las microburbujas o útiles para emplearlas en métodos de aislamiento de afinidad, purificación, concentración, etc. Preferiblemente, el kit comprende además instrucciones para uso. Alguien con habilidad en la técnica reconocerá fácilmente que los métodos descritos en la presente pueden incorporarse fácilmente a uno de los formatos de kit establecidos y que son bien conocidos en la técnica.

En la presente se describen además composiciones y métodos novedosos para aislar y ensayar analitos, incluyendo también células, virus, subcomponentes celulares y moléculas solubles desde una solución. Estos se basan en microburbujas recubiertas para enlazar específicamente el analito diana (célula, virus, subcomponente celular o molécula soluble). Las microburbujas están recubiertas con, o hechas de otra manera para exhibir en su superficie exterior, una molécula de afinidad. Las composiciones y métodos descritos en la presente también pueden usarse para concentrar analitos que incluyen pero no se limitan a anticuerpos, antígenos, proteínas y ácidos nucleicos.

En un aspecto, las microburbujas recubiertas con molécula de afinidad comprenden además un marcador detectable. En otra modalidad, la molécula de afinidad misma es el marcador detectable. La cantidad, o presencia o ausencia del analito, especie o microburbuja puede cuantificarse o detectarse por virtud del marcador. El marcador en la microburbuja es un ácido nucleico que puede amplificarse y detectarse. Las técnicas usadas para llevar a cabo la detección pueden incluir pero no limitarse a PCR, secuenciación de nucleótido, secuenciación de PCR, tecnología de balizas moleculares, hibridación, hibridación seguida de PCR, fluorescencia, radio-etiquetado, fosforescencia y

- absorbancia. Ejemplos de reactivos que pueden usarse para detección incluyen pero no se limitan a radioetiquetas, etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), fluorescencia, fosforescencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, etiquetas de afinidad (por ejemplo biotina, avidina o estreptavidina) y otros reactivos bien conocidos por aquellos con habilidad en la técnica. Estos aspectos no son limitantes y pueden concebirse otros aspectos que se usan con la invención.
- En ciertos métodos descritos en la presente, las microburbujas son microburbujas de proteína que pueden estar comprendidas de cualquier péptido, polipéptido, proteína o combinaciones de los mismos. Péptidos, polipéptidos, proteínas, tanto sintéticas como de ocurrencia natural, y combinaciones de los mismos están contemplados por la invención. Las microburbujas de proteína pueden formarse fácilmente en microburbujas por medio de la introducción de un gas. En la presente invención, la proteína es albúmina.
- Las microburbujas de proteína descritas en la presente se forman típicamente mediante la introducción de un gas a una solución de proteína, por ejemplo mediante sonicación (sometimiento a ultrasonido). Las burbujas pueden llenarse con cualquier gas incluyendo, pero no limitándose a oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, helio, gases de fluorocarbono y diversas combinaciones de los mismos, tales como aire. El gas puede introducirse a la proteína por medio de un proceso que comprende calentar una solución de proteína. Sin limitarse a una teoría específica, el calentamiento puede servir para estabilizar las microburbujas de proteína desnaturizando la proteína. Las microburbujas de proteína pueden estabilizarse, por ejemplo, desnaturizando la proteína, fijando la proteína, reticulando la proteína o mediante tratamiento con Cr⁺⁺⁺. Las microburbujas se estabilizan mediante reticulación con aldehídos tales como glutaraldehído o formaldehído.
- Las microburbujas de proteína se encuentran por lo general en el intervalo de 0.1 a 100 μm, típicamente 1 a 50 y frecuentemente 2 a 20 o 2 a 30 μm en diámetro.
- De acuerdo con la divulgación, la molécula de afinidad puede ser un receptor, un ligando o un anticuerpo. Como alternativa, la molécula de afinidad puede ser biotina, avidina o estreptavidina. En un aspecto de la divulgación, las microburbujas son biotinizadas y luego recubiertas con estreptavidina, lo cual crea una microburbuja que puede recubrirse fácilmente con un ligando biotilado tal como un anticuerpo. En otro aspecto, las microburbujas son microburbujas recubiertas con ligando.
- El recubrimiento de las microburbujas con una molécula de afinidad puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica. De manera ventajosa, las proteínas contienen grupos funcionales amina que pueden servir como la base para numerosas modificaciones y reacciones de acoplamiento tales como la reacción con aldehídos. Además, el experto en la materia reconocerá que los materiales que constituyen las microburbujas, por ejemplo proteína, vidrio y similares, pueden derivarse o funcionalizarse químicamente para interactuar de modo covalente con diversos tipos de moléculas de afinidad. El experto en la materia estará familiarizado con una variedad de reactivos, productos y kits comerciales para acoplar proteínas y otras moléculas a las microburbujas de la invención. La molécula de afinidad puede acoplarse directamente a la proteína usando, por ejemplo, un reactivo heterobifuncional tal como sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato.
- En otro aspecto de la divulgación, la molécula de afinidad se acopla indirectamente a la proteína mediante la interacción de al menos otra molécula, por ejemplo. En un aspecto de la divulgación, las microburbujas se acoplan directamente a la estreptavidina y la molécula de afinidad es biotinizada, de modo que la estreptavidina y la biotina interactúan para acoplar la molécula de afinidad a la proteína. Las interacciones de biotina y avidina/estreptavidina son bien conocidas en la técnica ya que son métodos para acoplar estas moléculas a otras especies. También puede hacerse referencia a un libro de texto general o más específico o a un manual de laboratorio que describen la química, biología e interacciones de biotina, avidina y estreptavidina, y/o los métodos para acoplar biotina y avidina/estreptavidina a otras moléculas. Véase, por ejemplo, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook* (Savage, et. al., eds. Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1992)
- En la presente también se describen microburbujas recubiertas hechas usando microburbujas de vidrio, tales como aquellas suministradas por 3MTM. Las burbujas de vidrio de borosilicato pueden tratarse con hidróxido de sodio para exponer una superficie de silicio y luego reaccionar con un agente silanante tal como un 3-amino-propil-trietoxi silano, creando una superficie recubierta con una amina primaria. La microburbuja puede hacerse reaccionar con NHS-biotina para formar una microburbuja de vidrio biotinizada, la cual puede recubrirse luego con estreptavidina, si se desea. Esta microburbuja de estreptavidina puede luego recubrirse fácilmente con un ligando biotilado tal como un anticuerpo biotilado; como alternativa, las microburbujas de vidrio recubiertas con epoxi pueden hacerse reaccionar directamente con ligandos o recubrirse directa o indirectamente mediante métodos conocidos por aquellos con habilidad en la técnica.
- En la presente se describen métodos para aislamiento por afinidad o se proporcionan ensayos de afinidad de una especie. De acuerdo con estos métodos, el método comprende los pasos de proporcionar microburbujas recubiertas con una molécula de afinidad en una solución, poner en contacto las microburbujas con una especie que interactúa con la molécula de afinidad en una solución, generando de esta manera microburbujas recubiertas con la especie y separar las microburbujas recubiertas con la especie de la solución; en un método preferido, permitir que las

microburbujas recubiertas con la especie floten hacia la parte superior de la solución, separando de esta manera la especie de la solución. De esta forma, todas las formas de especies pueden ser aisladas por afinidad o ensayadas por afinidad incluyendo proteínas (antígeno, anticuerpos, ligandos, receptores, hormonas), ácidos nucleicos, lipoproteínas, grasas, triglicéridos, azúcares, carbohidratos, virus, células, componentes celulares, orgánulos subcelulares y componentes de orgánulos subcelulares, así como también complejos de los mismos.

La presente divulgación se refiere a métodos para concentración de células por afinidad. De acuerdo con estas modalidades, el método comprende los pasos de proporcionar microburbujas recubiertas con una molécula de afinidad en una solución, poner en contacto las microburbujas con células que interactúan con la molécula de afinidad en una solución, generando de esta manera microburbujas recubiertas con las células, y separar las microburbujas recubiertas con las células de la solución; en un aspecto preferido, permitir que las microburbujas recubiertas con las células floten a la parte superior de la solución, separando de esta manera las células de la solución. De esta manera, las células pueden concentrarse.

Las microburbujas recubiertas de la divulgación se enlazan a las células diana, separándose ellas mismas de esta manera de la solución de contacto y de especies que no son diana. En ciertos aspectos donde el tiempo de separación es importante, la solución que contiene las microburbujas pueden centrifugarse o someterse a una trampa de burbuja para seguir efectuando la separación más rápidamente.

Las microburbujas de albúmina de la divulgación tienen la propiedad útil de ser capaces de destruirse fácilmente y están hechas para desaparecer visualmente aplicando presión o vacío a la solución, o adicionando una pequeña cantidad de un detergente o surfactante. Este aspecto de la divulgación es particularmente útil cuando es deseable aislar las células diana desprovistas de la microburbuja de captura. Por ejemplo, puede ser deseable caracterizar el fenotipo de una célula aislada por afinidad o liberar la célula aislada para mayor análisis o propagación. El método de la presente divulgación proporciona, en algunos aspectos, un medio simple para liberar las células de la microburbuja de captura que evita reactivos potencialmente dañinos tales como las enzimas, los químicos severos y los extremos de pH. En otro aspecto, las células pueden liberarse de la microburbuja por medios enzimáticos o químicos.

Las microburbujas de la presente divulgación tienen una ventaja adicional sobre las partículas sólidas para aplicaciones de afinidad en las que la fuerza o la gravedad normal y la fuerza del empuje del aire de la microburbuja se encuentran en direcciones diferentes, dando lugar de esa manera a una reducción significativa en el enlazamiento no específico y el atrapamiento de especies que típicamente se hunden hacia el fondo del recipiente de reacción durante la separación. La separación puede mejorarse con las células no enlazadas que se ven forzadas hacia fuera de las microburbujas en un campo bajo de centrifuga, tal como con una velocidad modesta de centrifuga, en condiciones que no afecten adversamente las microburbujas.

Tal como se describe más adelante, en los ejemplos, los experimentos con microburbujas de albúmina recubiertas con un anticuerpo antibacteriano, mezcladas con una suspensión de bacterias han dado lugar a esterilización de la suspensión, con todas las bacterias coaisladas con las microburbujas. De manera similar, en experimentos de control, las microburbujas sin anticuerpo específico mostraron poco enlazamiento no específico, dando lugar a bacterias no detectables que se copurifican con las microburbujas después de la separación.

En la presente también se describen métodos para generar microburbujas para usar en aislamiento por afinidad o ensayo de afinidad, los cuales comprenden proporcionar microburbujas y recubrir las microburbujas con una molécula de afinidad.

Se entenderá que la aplicación de las enseñanzas de la presente divulgación a un problema o situación específicos estará dentro de las capacidades de alguien que tiene habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas contenidas en la presente. La divulgación se seguirá ilustrando mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Los siguientes ejemplos, que incluyen experimentos y resultados alcanzados, se suministran para propósitos ilustrativos solamente y no deben interpretarse como limitantes de la presente divulgación.

Ejemplos

Microburbujas de albúmina

Ejemplo 1: Preparación de microburbujas de albúmina

Una solución de albúmina (humana) al 5%, USP (Bayer Corporation, Elkhart, IN) fue diluida al 1% con solución salina normal saturada de aire a temperatura ambiente. Se colocaron 20 ml de la solución diluida en un vaso de vidrio de 50 ml y se sumergió en un baño de agua a 85 °C por debajo del nivel de 25 ml del vaso. Se monitoreó la temperatura de la solución de albúmina usando termómetro digital mientras se agitaba suavemente la solución. A una temperatura de proceso de 73 °C, se colocó la sonda de un aparato de ultrasonido Branson Digital Sonifier®, Modelo 450 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) en contacto con la superficie de la solución de albúmina y se sometió a ultrasonido inmediatamente al 80% de la amplitud durante 10 segundos. El vaso se retiró del baño de

agua, se colocó sobre hielo picado y se agitó suavemente hasta que la temperatura se redujo a 40 °C. La suspensión de microburbujas de albúmina se transfirió a una garrafa flexible de 150 ml (Flexboy® Bag, Stedim, Concord, CA) a temperatura ambiente. El proceso se repitió varias veces con solución recién hecha hasta que se llenó la bolsa. La suspensión de microburbujas fue ajustada a 0.05% de azida de sodio y la bolsa se almacenó verticalmente bajo refrigeración durante al menos 24 horas. El proceso de someterse a ultrasonido convirtió aproximadamente 5% de la albúmina soluble en microburbujas insolubles de albúmina llenadas con aire.

Ejemplo 2: Preparación de microburbujas de albúmina estabilizadas con cromo

En algunos experimentos se estabilizaron microburbujas de albúmina mediante tratamiento con Cr⁺⁺⁺. Las microburbujas de albúmina se dejaron flotar y la fase líquida se retiró y se reemplazó con sulfato de cromo potasio de 5 mM. Las microburbujas se mantuvieron en suspensión mediante agitación suave y se incubaron en un baño de agua a 60 °C por 30 minutos. A continuación de la incubación, se retiró la solución de cromo lavando tal como se describe más adelante y se reemplazó con albúmina de suero humano al 1% en solución salina normal. Las microburbujas de albúmina tratadas con cromo fueron tratadas tal como se describe para las microburbujas no tratadas.

Ejemplo 3: Preparación de microburbujas de albúmina recubiertas de biotina

La solución de albúmina no convertida se drenó por debajo de la capa flotante de microburbujas y se reemplazó con solución salina fría, saturada de aire, regulada con fosfato, pH 7.4 (PBS), que contiene 0.2% de alcohol polivinílico (peso atómico 30,000-70,000) (PVA/PBS). Las microburbujas se re-suspendieron mediante agitación suave y se transfirieron a jeringas plásticas desechables, equipadas con una llave de paso montada en la parte inferior. Las microburbujas se lavaron para quedar libres de albúmina soluble residual mediante centrifugación repetida a 200 x g, a 4 °C durante 5 minutos; se drenó y se repuso la solución con PVA/PBS fría recién preparada, saturada con aire. Las microburbujas de albúmina lavadas se suspendieron aproximadamente 25% v/v en PVA/PBS y fueron biotiniladas mediante reacción con sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) hexanoato (sulfo-NHS-LC-biotina; EZ-Link™ sulfo-NHS-LC-biotina, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) a una concentración de 0.01 a 1.0 mg/ml mientras se agitaba suavemente a temperatura ambiente por al menos una hora. La biotina no reaccionada se retiró mediante varios lavados, con centrifugación, con PVA/PBS fría, saturada con aire a 4 °C. El alcance del etiquetado con biotina fue evaluado disolviendo una alícuota de microburbujas suspendidas en PVA/PBS que contenía 0.1% de Triton X-100 y determinando la concentración de proteína (ensayo de proteína BCA, Pierce) y biotina (ensayo de ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno)-benzoico). Las reacciones de biotinilación típicas de las microburbujas de albúmina producen proporciones molares de 40% a 500% de biotina a albúmina. La disponibilidad de biotina sobre la superficie de las microburbujas de albúmina fue confirmada observando la asociación espontánea de microburbujas-biotina con partículas paramagnéticas de estreptavidina libres de nucleasa BioMag (Polysciences, Inc., Warrington, PA) en suspensión. Las microburbujas de albúmina recubiertas de biotina se almacenaron bajo refrigeración en PVA/PBS que contenía 0.05% de azida de sodio.

Ejemplo 4: Preparación de microburbujas de albúmina recubiertas de estreptavidina

Las microburbujas de albúmina llenas de aire se recubrieron con estreptavidina (Prozyme, San Leandro, CA) indirectamente exponiendo microburbujas-biotina a un exceso de estreptavidina. En estas condiciones se impidió la reticulación de microburbujas. Las microburbujas de albúmina también se recubrieron con estreptavidina directamente mediante un reactivo de reticulación de proteína bifuncional.

Para recubrimiento indirecto, se trató completa y rápidamente una suspensión de microburbujas de albúmina recubiertas con biotina, suspendidas en PVA/PBS mediante la adición de solución de 10 mg/ml de estreptavidina para producir una concentración final de 1 mg/ml, mezclando continuamente con vórtice. La estreptavidina no reaccionada se retiró mediante lavado con centrifugación tal como se describió antes. La naturaleza tetravalente de estreptavidina aseguró que todavía estuvieran disponibles los sitios de enlazamiento de biotina.

Como alternativa, las microburbujas de albúmina se recubrieron directamente con estreptavidina usando sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (s-SMCC). La estreptavidina a 10 mg/ml en PBS, pH 7.4, fue tratada con un exceso molar de 5 a 10 veces de n-succinimidil S-acetiltioacetato (SATA) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el SATA no reaccionado de la estreptavidina mediante FPLC usando una resina Sephadex G-25 equilibrada en PBS, y la proteína purificada se almacenó congelada. Precisamente antes de usar, se retiró el grupo protector acetilo de la estreptavidina modificada mediante tratamiento con PBS que contenía hidroxilamina de 50 mM y EDTA de 2.5 mM, pH 7.5, durante 2 horas a temperatura ambiente. Simultáneamente, se trató una suspensión de microburbujas de albúmina suspendidas en PVA/PBS con s-SMMC de 0.01 a 1 mg/ml mientras se agitaba suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de reactivo s-SMMC se retiró inmediatamente mediante lavado con centrífuga (repetido 4 veces) y las microburbujas de s-SMCC se combinaron con la estreptavidina modificada con sulfhidrilo. La estreptavidina se vuelve acoplada de modo covalente con la superficie de las microburbujas de albúmina mediante reacción del grupo funcional maleimida con el grupo sulfhidrilo de estreptavidina recientemente expuesto. Las microburbujas se lavaron para quedar libres de exceso de

estreptavidina mediante repetidos lavados con centrifugación, se suspendieron en PBS fría, saturada con aire, que contenía azida de sodio al 0.05% y se almacenó bajo refrigeración.

Ejemplo 5: Recubrimiento de microburbujas de albúmina con anticuerpo

5 Se obtuvo un anticuerpo a *E. coli* 0157:H7 purificado por afinidad a partir de KPL (Gaithersburg, MD) y fue biotinilado tal como se describe más adelante. El anticuerpo se disolvió en PBS, pH 7.4 y se calentó a 37 °C durante 30 minutos. La solución calentada fue tratada con un exceso molar de 8-12 veces de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) hexanoato (EZ-Link™ sulfo-NHS-LC-biotina) durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de reactivo de biotina fue retirado mediante cromatografía de filtración con gel G-25 Sephadex, eluyendo con PBS. El anticuerpo biotinilado fue concentrado mediante ultrafiltración usando un dispositivo de filtro Microcon® YM-30 (Millipore, 10 Bedford, MA) y almacenado bajo refrigeración en presencia de azida de sodio como conservante. Las microburbujas de albúmina recubiertas con avidina se re-suspendieron mediante agitación suave y se combinaron con un exceso molar de anticuerpo etiquetado con biotina en PBS. El exceso de material se retiró de las microburbujas insolubles mediante centrifugación y re suspensión repetidas, tal como se describió antes. Las microburbujas de albúmina recubiertas con anticuerpo se almacenaron en PVA/PBS que contenía azida de sodio, a 4 °C.

15 Ejemplo 6: Captura de células bacterianas sobre microburbujas recubiertas con anticuerpo.

Se obtuvo *E. coli* 0157:H7 de la colección de cultivos American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se propagó sobre Luria Bertani (LB) líquida y medio de agar a 37 °C. Las bacterias cultivadas en el medio líquido se diluyeron en series en PVA/PBS o PBS fría, estéril, que contenía BSA de 0.2% (BSA/PBS) a una densidad de aproximadamente 5000 células/ml. Se adicionó una décima de volumen de suspensión de microburbujas a la 20 suspensión de células y se agitó suavemente durante varios minutos a temperatura ambiente. Se dejaron flotar las microburbujas hacia la superficie de la mezcla por flotabilidad natural durante 10 minutos. Con una micropipeta se retiraron 10 µl de la fase líquida subyacente, se despejaron de microburbujas flotantes, se pusieron como una mancha sobre una placa de agar LB y se incubaron por una noche a 37 °C. Las muestras de control positivo de suspensión bacteriana produjeron aproximadamente 50 colonias/placa. La suspensión bacteriana tratada con 25 microburbujas recubiertas con anticuerpo quedó agotada de células formadoras de colonia. Las células bacterianas pudieron recuperarse de las microburbujas agitando suavemente la suspensión de microburbujas y colocando sobre la placa 10 µl de la suspensión, tal como se evidenció por las colonias formadas sobre las placas de LB resultantes después de una incubación de una noche. Este resultado indica que las células bacterianas fueron capturadas por 30 las microburbujas de albúmina recubiertas de anticuerpo. Las suspensiones bacterianas tratadas con microburbujas de albúmina recubiertas de estreptavidina o no recubiertas no lograron retirar células de la suspensión.

Ejemplo 7: Preparación de microburbujas modificando primero la albúmina y sometiendo después a ultrasonido.

Se encontró que las microburbujas de albúmina preparadas a partir de albúmina de suero biotinilado etiquetando la albúmina de suero con biotina antes de la formación de microburbujas enlazan avidina y/o estreptavidina. La 35 albúmina de suero bovino (BSA; Bovuminar Cohn Fraction V, Interger, Purchase, NY) fue disuelta en solución salina normal que contenía caprilato de sodio de 4 mM y triptofanato de sodio de 4 mM a 50 mg/ml, fue filtrada de manera estéril y almacenada en un contenedor de vidrio transparente, con iluminación fluorescente a temperatura ambiente durante dos semanas. Este tratamiento foto-oxidó los grupos sulfhidrilo libres que podían interferir con la formación de microburbujas. Se retiraron 20 ml de la solución de BSA y se ajustó a pH 8.5 con NaOH de 1 mM. Se adicionaron 25 µg de s-NHS-LC-biotina mezclando y el pH se mantuvo a 8.5 durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción 40 fue diluida a albúmina de 1% mediante la adición de solución salina normal y se sometió al proceso de ultrasonido tal como se describió antes para albúmina humana no modificada. Las microburbujas de albúmina resultante se lavaron varias veces con BSA al 1% en solución salina normal para retirar biotina no incorporada. Las microburbujas preparadas a partir de albúmina biotinilada fueron reactivas con avidina o estreptavidina y pudieron recubrirse con avidina o estreptavidina tal como se describió antes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para concentración por afinidad de células el cual comprende los pasos de:
 - (a) proporcionar en una solución microburbujas de albúmina recubiertas con una molécula de afinidad que se enlaza específicamente a las células;
 - 5 (b) poner en contacto en la solución a las microburbujas de albúmina con las células que interactúan con la molécula de afinidad que recubre las microburbujas de albúmina, generando de esta manera microburbujas de albúmina recubiertas con las células, y
 - (c) separar las microburbujas de albúmina recubiertas con las células usando un campo de centrifugación, concentrando de esta manera las células; y
 - 10 (d) destruir las microburbujas de albúmina tratando las microburbujas de albúmina recubiertas con las células con un detergente o surfactante.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual la molécula de afinidad se selecciona del grupo que consiste en: un receptor, un ligando, un anticuerpo, una hormona, ARN, ADN, APN o derivados o análogos de nucleótido, o en el cual la molécula de afinidades biotina, o en el cual la molécula de afinidades avidina o estreptavidina.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el cual la molécula de afinidad se selecciona del grupo que consiste en: un receptor, un ligando, un anticuerpo, una hormona, ARN, ADN, APN o derivados o análogos de nucleótidos.
4. El método de la reivindicación 1, en el cual la célula es una célula bacteriana.