

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 213**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/548** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2013 E 13718030 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2836834**

54 Título: **Etiqueta de ensayo**

30 Prioridad:

**13.04.2012 GB 201206530**

**13.04.2012 US 201261623729 P**

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

**28.04.2016**

73 Titular/es:

**VIVACTA LIMITED (100.0%)  
100 Guillat Avenue Kent Science Park  
Sittingbourne, Kent ME9 8GU, GB**

72 Inventor/es:

**ROSS, STEVEN;  
MCGETTRICK, AILEEN;  
RICHARDS, JULIE;  
DWYER, TIMOTHY;  
CAMERON, HELEN y  
CARTER, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 568 213 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

Etiqueta de ensayo

La presente invención se refiere a una etiqueta de ensayo y, de forma particular, a una etiqueta de ensayo basada en una partícula de carbono para su uso en un inmunoensayo.

5 Varios sistemas de ensayo utilizan partículas de carbono como el conjugado de detección (o etiqueta). Un ejemplo es una tira de flujo lateral que utiliza partículas de carbono que se visualizan mediante la vista. Otro ejemplo es el sistema de ensayo descrito en el documento WO 2004/090512, el cual emplea un dispositivo que tiene un transductor piroeléctrico/piezoeléctrico para la detección del calor generado por la iluminación de la etiqueta durante el ensayo. Las partículas de carbono son bien adecuadas para este sistema, ya que son fuertes absorbentes de radiación electromagnética en un rango de longitudes de onda, incluyendo la ultravioleta, visible y parte del espectro infrarrojo. 10 Las partículas de carbono tampoco tienen una masa particularmente densa, por lo que se suspenden bien en la muestra y no producen excesivos sedimentos, lo que podría provocar interferencias en un sistema de ensayo que utilice un transductor piroeléctrico/piezoeléctrico.

15 Las partículas de carbono se consideran, generalmente, que tienen una superficie "activa" que puede adsorber materiales hidrófobos. Por ejemplo, el carbón activo se utiliza en filtros de campanas de cocina, y las partículas de carbono se usan para purificar mezclas de reacciones químicas. En este último caso, se eliminan las impurezas poliméricas y/o hidrófobas, normalmente, de un recipiente de reacción mediante la adición de carbón activo, que adsorbe las impurezas. El carbón se separa por filtración.

20 Por esta razón, las partículas de carbono han sido utilizadas en ensayos durante algún tiempo, no como una etiqueta, sino como un medio de eliminación del exceso de reactivos no deseados. En particular, se han utilizado para eliminar el exceso de reactivos radiomarcados en inmunoensayos de competencia (por ejemplo, insulina, ácido fólico, T3 libre, T4 libre). Tales usos de las partículas de carbono se describen en US 3,442,819, US 4,028,465 y en N. Poznanski y W. J. Poznanski, Clin. Chem., 1969, 15, 908-918. En esta aplicación técnica, una reacción de competencia se lleva a cabo en solución entre una pequeña molécula radiomarcada y una pequeña molécula endógena, donde éstos 25 compiten por la unión con una cantidad fija de anticuerpo. La pequeña fracción de molécula que no se une al anticuerpo se retira a continuación mediante la adición de partículas de carbono que han sido pre-tratadas con dextrano (u otras macromoléculas). El dextrano permite a las moléculas pequeñas que pasen a través y se unan con el carbono, pero no las moléculas grandes, por lo que el carbono dextrano elimina la molécula pequeña no unida, pero no la fracción de molécula pequeña unida al anticuerpo. El carbono dextrano se filtra a continuación y el reactivo unido se cuantifica midiendo la radiactividad de la solución restante. 30

Estos documentos muestran al lector que las partículas de carbono son propensas a tener una mayor afinidad por pequeñas moléculas hidrofóbicas que por el dextrano. Un método común para la fijación de moléculas pequeñas a etiquetas coloidales es, en primer lugar, fijar la molécula pequeña, de forma covalente, a un soporte más grande (tal como una macromolécula) y luego unir el conjugado a la etiqueta, es decir, mediante adsorción pasiva. Sin embargo, 35 si se prepara un conjugado covalente de dextrano con una pequeña molécula hidrófoba, se podría esperar de unión del conjugado con el carbono mediante la unión de la molécula pequeña al carbono. Esto es, por lo tanto, poco probable que sea una buena manera de preparar conjugados de carbono de moléculas pequeñas, debido a que las moléculas pequeñas no serían accesibles.

40 Hay ejemplos en la literatura que describen el uso de partículas de carbono recubiertas de anticuerpo como etiquetas de ensayo. Por ejemplo, US 4,760,030 describe la adsorción pasiva de anticuerpos sobre partículas de carbono. Sin embargo, las partículas en US 4,760,030 requieren estabilización con aminoácidos con el fin de aplicar el anticuerpo sobre la partícula. También hay alguna referencia sobre el ensayo de tinta china (también conocido como el ensayo de Geck), que es un ensayo de aglutinación en donde las partículas de carbono y el anticuerpo se mezclan simultáneamente, y la aglutinación se lleva a cabo en presencia de un analito. Una vez más, se requieren 45 estabilizadores para formar el coloide de carbono.

US 5,252,496, US 5,559,041 y US 6,506,612 describen también uniones de anticuerpo a partículas de carbono. Estas patentes usan partículas de carbono Vulcan XC72, que debe ser estabilizado con el fin de formar un coloide en agua. Estas patentes describen el uso del 2% de dextrano 9.400 como agente estabilizante. El ejemplo 7 en la columna 13 de US 5,252,496 describe la inmovilización de un anticuerpo monoclonal en el carbono. En resumen, las partículas de 50 carbono se homogeneizan en regulador con el 2% de dextrano, el dextrano se describe como un "adyuvante en suspensión". Después de 2 h se añade isotiocianato de fluoresceína (FITC) y se incuba la suspensión durante 12 h, después se lava varias veces antes de que se añada el anticuerpo, siguiendo con un lavado adicional, y el almacenamiento del coloide en un regulador de almacenamiento adecuado.

55 No está del todo claro cuál es el mecanismo mediante el cual el anticuerpo se une a la partícula. En primer lugar, FITC sólo tiene un grupo funcional químicamente reactivo y por lo tanto no es un agente de reticulación, por lo que no existe un mecanismo mediante el cual el FITC podría unirse covalentemente al anticuerpo al dextrano. En segundo lugar, se utilizan isotiocianatos normalmente para la reacción con aminas (para obtener tioureas), pero también pueden

reaccionar con alcoholes (para dar tiocarbamatos) o ser hidrolizados a aminas. Dando un tiempo de incubación de 12 h, el FITC o bien reacciona con los grupos hidroxilo en el dextrano o bien se hidroliza. Parece que el mecanismo de unión propuesto es que el FITC, de alguna manera, se una a la superficie del carbono dextrano. No se espera que la fluoresceína se una al dextrano, lo que implica que el FITC se une (de forma pasiva adsorbido) sobre la superficie del propio carbono. El grupo isotiocianato no estaría entonces disponible para la unión a los grupos de lisina (aminas) en los anticuerpos.

US 6,506,612 también describe métodos por los cuales un agente de unión se une covalentemente a través de un agente de reticulación a una capa adsorbida, de forma primaria, de forma pasiva sobre una superficie de partícula de carbono. Las líneas 35-60 de la columna 8 describen dicho tipo de enlaces covalentes, en donde la capa adsorbida de forma pasiva es siempre una proteína. Por lo tanto, US 6,506,612 enseña que los dextranos se pueden utilizar inicialmente para estabilizar los coloides de carbono, pero que en última instancia, serán desplazados tanto por las pequeñas moléculas (tales como FITC) como por moléculas de proteínas (tales como BSA, avidina o anticuerpos), que se unirán más fuertemente al carbono que lo hará el dextrano. US 6,506,612 también describe un método para el pre-tratamiento de un anticuerpo con FITC antes del revestimiento sobre el carbono, el efecto probable en este caso es que la adición de grupos FITC al anticuerpo hace que sea más hidrófobo y por lo tanto que se una con más fuerza al carbono.

US 5,529,901 y US 5,641,689 describen un método para seleccionar un tipo de partícula de carbono (SB4 de Degussa) que formará un coloide en agua sin la adición de agentes estabilizantes, tales como dextrano, PEG, glicina etc. También describen la selección de SB4 (y partículas similares) para la conjugación directa de un componente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) que se une al analito. Por tanto, las enseñanzas de estas patentes se alejan de la utilización de dextrano como estabilizante. De hecho, describen el uso de dextrano para estabilizar la partícula como un paso innecesario, el cual se puede eliminar mediante el uso específicamente de estas partículas.

Las partículas de carbono que normalmente se han utilizado en los ensayos se conjugan usando un método de adsorción pasiva, véanse los documentos US 5,529,901 y US 5,641,689. Este método es específico para ciertos tipos de carbono, en particular Spezial Schwartz 4 (SB4) de Degussa/Evonik (partículas de carbono amorfas que tienen un tamaño medio de entre 100-200 nm), que forman un coloide estable en agua en ausencia de cualquier estabilizador. De forma alternativa, la mayoría de otras partículas de carbono requieren un estabilizador, tal como un detergente o una macromolécula (por ejemplo, dextrano, PEG, glicina, etc.). El método de adsorción pasiva es adecuado para la mayoría de los ensayos basados en anticuerpos, pero se debería señalar que la mayoría de los anticuerpos pierden actividad durante la adsorción pasiva, debido a que el anticuerpo se desnaturaliza ya que se une a la superficie (esto es similar a lo que ocurre cuando el anticuerpo es de forma pasiva adsorbido en la superficie de placas de microtitulación). Una regla de oro útil es que aproximadamente el 10% de los anticuerpos de forma pasiva adsorbido será activo, siendo el 90% restante inactivo, en gran parte debido a la desnaturalización del anticuerpo.

Para los ensayos que requieren una sensibilidad muy alta, es beneficioso tener una carga más alta de anticuerpos en las partículas de carbono, lo que requeriría una vía alternativa a la adsorción pasiva. Una mayor carga de anticuerpos desplaza el equilibrio termodinámico de la interacción anticuerpo-antígeno. Se prefiere una mayor carga de anticuerpo por partícula, en lugar de la simple adición de más partículas, de modo que el sistema no este sobrecargado con partículas (lo que conduce a la unión no específica). Además, el anticuerpo adsorbido de forma pasiva se encuentra en estrecha cercanía a la superficie del carbono, la cual puede hacer que el anticuerpo quede bastante impedido estéricamente. Tener el anticuerpo más lejos de la superficie del carbono puede tener beneficios, en términos de reducción del impedimento estérico. Por último, la adsorción pasiva de anticuerpos en el carbono conduce a la desnaturalización del anticuerpo, lo que potencialmente puede promover la unión no específica.

En inmunoensayos inmunométricos (también conocidos como tipo sándwich o de reactivo en exceso), como se describe en el documento WO 2004/090512, un anticuerpo (o un reactivo similar) se encuentra en el sensor y otro anticuerpo está sobre las partículas de carbono. Las partículas de carbono se unen después al sensor en presencia del analito que se está detectando. Ambos anticuerpos están presentes en un gran exceso.

En un ensayo de competencia, hay o bien (a) un anticuerpo sobre las partículas de carbono y un análogo del analito (es decir, una molécula pequeña) sobre el sensor o bien (b) un análogo (es decir, una molécula pequeña) sobre las partículas de carbono y un anticuerpo sobre el sensor. La unión tiene lugar en ausencia de analito, y es perturbada (reducida) en presencia de analito.

El término "molécula pequeña" es un término del estado de la técnica en el campo de los inmunoensayos que se utiliza para distinguir entre moléculas que se pueden medir en ensayos tipo sándwich y los que no pueden hacerlo. Para ser medida en un ensayo tipo sándwich, una molécula debe ser suficientemente grande para tener dos o más epítopos distinguibles (sitios de unión de anticuerpos), de modo que se pueden unir dos anticuerpos a la molécula al mismo tiempo, de forma que la molécula puede ser intercalada entre un anticuerpo captador y un anticuerpo indicador (o etiquetado). Si la molécula no puede formar un sándwich, cae en la clase de moléculas "pequeñas". El límite de peso molecular es de aproximadamente entre 2.000-5.000.

Al llevar a cabo ensayos de competencia no es un requisito adicional el tener un mayor control sobre los niveles de los diversos componentes en el sistema. Para un anticuerpo unido al carbono, es más difícil controlar la cantidad de anticuerpo activo utilizando adsorción pasiva. En el formato alternativo para los ensayos de competencia, es la molécula pequeña análoga la que debe ser unida a la superficie de la partícula de carbono. Esto generalmente no es posible con las moléculas pequeñas; o bien no se adsorben en la superficie, ya que son demasiado pequeñas o, si se adsorben a una superficie, no son nunca más reconocidas por los anticuerpos. Las moléculas pequeñas son por lo tanto generalmente conjugadas con portadores más grandes, tales como proteínas, y entonces el soporte se une a la superficie de interés, por ejemplo, la partícula de carbono.

Sin embargo, ahora se ha descubierto que es difícil preparar conjugados de carbono de molécula pequeña a través de la vía tradicional de unirlos covalentemente a las moléculas de proteína (por ejemplo,  $\alpha$ 2-macroglobulina, apoferritina,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -amilasa, colágeno (ovino), concanavalina A, hemocianina de lapa californiana, miosina, ureasa, tiroglobulina humana, tiroglobulina porcina y tiroglobulina bovina) y, posteriormente, unir estas proteínas a la superficie de las partículas de carbono. Esto puede ser debido a que las moléculas pequeñas son particularmente hidrófobas (por ejemplo, esteroides, fluoresceína, inmunosupresores). Esto puede hacer que los conjugados de molécula de proteína pequeña sean demasiado hidrófobos para recubrir partículas de carbono. Los materiales son ya sea "pegajosos" (que dan demasiado unión no específica) o inestables durante el tiempo en solución.

El documento WO 2005/121163 describe un procedimiento para el aislamiento de una o más proteínas a partir de una solución de proteína, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar una solución de proteína que comprende una o más proteínas específicas y que tiene un pH prestablecido y una fuerza iónica o conductividad prestablecidas, b) la aplicación de la solución de proteína a una columna de lecho empaquetado o de lecho expandido que comprende un adsorbente, y c) la obtención de una o más proteínas desde la columna; en el que la solución de proteína se ha complementado con un alcohol.

KR 2011-0128606 describe un compuesto de nanopartículas de platino magnético, nanopartículas de carbono poroso y se proporciona un método para fabricar el mismo para mejorar la actividad de la peroxidasa mediante la integración de nanopartículas de platino y nanopartículas magnéticas en los poros de carbono poroso. Las nanopartículas magnéticas se fijan a carbono poroso para obtener un compuesto de nanopartículas de carbono poroso magnético mediante la inmersión de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  en etanol y la implementación de un proceso de deposición en una atmósfera de gas inerte. Las nanopartículas de platino se fijan al compuesto de nanopartículas de carbono poroso magnético con el fin de obtener un complejo de nanopartículas de carbono poroso con nanopartículas de platino magnético mediante la inmersión de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en solución 1 M de hidróxido sódico/etilenglicol e implementar un proceso de deposición en una atmósfera de gas inerte. El compuesto de nanopartículas de platino magnético, nanopartículas de carbono poroso incluye actividad de peroxidasa.

Por lo tanto, hay una necesidad de un método mejorado para la conjugación de anticuerpos y moléculas pequeñas, así como otros agentes de unión potenciales, por ejemplo, ácidos nucleicos, a la superficie de partículas de carbono con el fin de aumentar la carga, el control de carga, reducir el impedimento estérico y mejorar la estabilidad, lo que mejora el rendimiento del ensayo mediante la reducción de la sensibilidad del ensayo y la mejora de la precisión.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una etiqueta de ensayo que comprende una partícula de carbono amorfo, un polímero de dextrano funcionalizado, de forma pasiva adsorbido sobre la superficie de la partícula de carbono y un primer miembro de un par de unión complementario unido covalentemente al polímero de dextrano funcionalizado.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una partícula de carbono conjugado empleando dextrano para unir la molécula de interés a la partícula de carbono.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos, en los que:

La figura 1 muestra una representación esquemática del dispositivo de detección química de WO 2004/090512, que se utiliza con la presente invención;

La figura 2 muestra un cartucho de acuerdo con la presente invención;

La figura 3 muestra un gráfico de los ensayos de capacidad de unión del carbono que utilizan conjugados de carbono 1 y 2;

La figura 4 muestra un gráfico de ensayos de troponina I que utilizan conjugados de carbono 1 y 2;

La figura 5 muestra un gráfico de BSA-dig(en)-FITC de ensayos de carbono durante 29 días;

La figura 6 muestra una gráfica de la reducción en la cámara 3 de la unión de BSA-dig(en)-FITC de conjugado de carbono;

La figura 7 muestra un gráfico de la cámara 3 de la unión después del lavado de BSA-dig(en)-FITC de conjugado de carbono;

La figura 8 muestra un gráfico de los ensayos de dextrano-FITC-digoxina durante 29 días; y.

La figura 9 muestra un gráfico de la cámara 3 de unión de dextrano-dig(en)-FITC conjugados durante 29 días.

5 La etiqueta de ensayo de la presente invención se basa en una partícula de carbono amorfo. Tales partículas son bien conocidas en el estado de la técnica y también se les conoce como Negro de carbono, Negro de humo, Negro de horno o negro térmico). Son partículas amorfas producidas por la combustión incompleta de hidrocarburos gaseosos o líquidos. El número CAS del negro de carbono es 1333-86-4.

10 El tamaño de las partículas de carbón dependerá de la naturaleza del ensayo, pero suelen tener un tamaño de partícula de entre 25-250 nm. Los tamaños de partícula para las partículas de carbono de la presente invención representan el diámetro de la partícula en su punto más ancho y pueden medirse mediante dispersión de luz dinámica.

Las partículas de carbono amorfo generalmente tienen una estructura porosa. La partícula de carbono utilizada en la presente invención tiene preferiblemente una densidad de 0.8 a 3 g/mL.

15 Las partículas de carbono de la presente invención forman coloides estables en suspensión en un medio acuoso. Dependiendo de la hidrofobicidad de las partículas de carbono (algunas tienen más grupos hidroxilo de superficie que otros), algunas partículas de carbono formarán un coloide estable en agua y otros requieren la presencia de un estabilizador. La presente invención usa preferiblemente partículas de carbono que forman un coloide estable en agua sin la presencia de un estabilizador (de hecho, sin la presencia de ninguna otra sustancia). Una prueba simple se puede aplicar para determinar si se ha formado o no un coloide estable: suspender 1% p/v de las partículas de carbono  
20 amorfo en 1 mL de agua desmineralizada y sonicar durante 30 s para formar un coloide; medir la densidad óptica del coloide usando un espectrómetro visible; un coloide estable no mostrará ningún cambio ( $\pm 1\%$ ) en la densidad óptica durante 1 h.

La etiqueta de ensayo también incorpora un polímero de dextrano funcionalizado adsorbido de forma pasiva sobre la superficie de la partícula de carbono.

25 El dextrano es un polímero de glucosa y se compone de unidades de glucano  $\alpha$ -D-glucosa ligada (típicamente 95%) y residuos de 1,3-glucosa como ramas (típicamente 5%). El dextrano no está sujeto a la degradación enzimática, a diferencia de la mayoría de otros polisacáridos.

30 El polímero utilizado en la presente invención es un dextrano funcionalizado, lo que significa que contiene grupos funcionales adicionales a los de otro modo presentes en el dextrano, que se puede utilizar para formar enlaces covalentes. Ejemplos de grupos funcionales incluyen un grupo amino, un grupo sulfato, una cetona, un aldehído, un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico/sulfónico activado (tal como un cloruro de ácido o un éster activado) y un grupo tiol. Algunos ejemplos específicos de dextranos funcionalizados, comercialmente disponibles, son aminodextrano, sulfato de dextrano, dietil aminoetilo dextrano y carboximetil dextrano. Una síntesis de aminodextranos se describe con más detalle en el documento US 5,776,706. El dextrano funcionalizado es  
35 preferentemente un aminodextrano.

El polímero de dextrano funcionalizado de la presente invención tiene típicamente un número de peso molecular promedio de entre 3-2.000 KDa, preferiblemente entre 5-100 KDa y más preferiblemente entre 7-5 kDa. El peso molecular puede ser medido por cromatografía de permeación en gel utilizando estándares de dextrano, disponibles comercialmente, de peso molecular conocido (por ejemplo, de Sigma Aldrich).

40 El dextrano funcionalizado está unido a la partícula de carbono por interacciones no covalentes. El dextrano funcionalizado se adsorbe de forma pasiva sobre la superficie de la partícula de carbono. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el dextrano se adsorbe en los poros presentes en la superficie de la partícula de carbono, desplazando de este modo las moléculas de agua dentro de los poros. La fuerza impulsora para la reacción es probablemente entrópica a causa de la liberación de las moléculas de agua unidas.

45 La etiqueta de ensayo también incluye un primer miembro de un par de unión complementaria, unido covalentemente al dextrano funcionalizado.

50 Con el fin de funcionar en un ensayo, la etiqueta debe contener parte de un par de unión complementaria. Como se explicó anteriormente, en un inmunoensayo inmunométrico (también conocido como tipo sándwich o reactivo en exceso), un anticuerpo generado para el analito se encuentra en el sensor y el otro anticuerpo para el analito se encuentra en las partículas de carbono. Las partículas de carbono se unen después al sensor en presencia del analito que va ser detectado. Ensayos análogos son posibles con otras macromoléculas, tales como proteínas o ácidos nucleicos. En este caso, el primer miembro del par de unión complementario es una macromolécula seleccionada de

entre un anticuerpo, una proteína o un ácido nucleico y el segundo miembro del par de unión complementario es el analito.

5 En un ensayo de competencia, hay o bien (a) un anticuerpo sobre las partículas de carbono y un análogo del analito (es decir, una molécula pequeña) sobre el sensor o bien (b) un análogo (es decir, una molécula pequeña) sobre el carbono partículas y un anticuerpo sobre el sensor. La unión tiene lugar en ausencia de analito, y es perturbado (reducido) en presencia de analito. En este caso, el primer miembro del par de unión complementario puede ser una pequeña molécula y el segundo miembro del par de unión complementario es el anticuerpo generado para la molécula pequeña. Ejemplos de la molécula pequeña son fármacos terapéuticos (por ejemplo, carbamazepina, ciclosporina, digoxina, teofilina y gentamicina), drogas de abuso (por ejemplo, opiáceos, cocaína y anfetamina), vitaminas (por ejemplo, vitamina D, vitamina B12 y ácido fólico) y hormonas (T3, T4, cortisol, progesterona, estradiol y testosterona).

10 La etiqueta de ensayo de la presente invención se puede preparar mediante un pre-tratamiento del polímero de dextrano para formar un conjugado de dextrano de molécula pequeña. Este conjugado a continuación, se puede unir a las partículas de carbono para generar un conjugado estable. Más de una pequeña molécula puede estar unida al dextrano, de modo que la partícula se puede utilizar en ensayos con controles o en ensayos multiplex.

15 La etiqueta de ensayo de la presente invención también se puede preparar uniendo el polímero de dextrano a las partículas de carbono y por separado, pre-tratando un anticuerpo, una proteína o un ácido nucleico con un reactivo, el cual se unirá covalentemente a los grupos funcionales en las partículas recubiertas con dextrano. Un ejemplo es el uso de aminodextrano, el cual se hace reaccionar para añadir grupos maleimida en la superficie del dextrano. El dextrano maleimido se aplica entonces sobre las partículas de carbono. El anticuerpo se introduce a través de un tiol enmascarado, el cual puede ser desenmascarado para reaccionar con el grupo maleimida en el dextrano. Tioles enmascarados pueden introducirse por reacción con S-acetil tioglicólico ácido N-succinimida (SATA). En una realización preferida, la etiqueta de ensayo comprende además un enlazador entre el dextrano funcionalizado y la pareja de unión complementaria. Por ejemplo, los grupos maleimida pueden ser introducidos en el dextrano mediante la adición de un reactivo heterobifuncional, tal como el succinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), o por análogos de SMCC, donde se sustituye el separador ciclohexano por separadores alternativos de mayor longitud, tales como separadores de polialquilenglicol. Tras la unión del anticuerpo activado SATA al carbono maleimido dextrano, es ventajoso introducir una etapa de extinción para desactivar grupos maleimida y tiol sin reaccionar, por lo general mediante la adición de un inhibidor de maleimida (por ejemplo mercaptoetanol) primero, seguido por un inhibidor de tiol (por ejemplo, N maleimida etil, o una maleimida de polialquileño). Estos reactivos inhibidores entonces se pueden eliminar por centrifugación y lavado del coloide de carbono.

20 Una guía útil para los tamaños del primer miembro del par de unión complementario son: la molécula pequeña tiene preferiblemente un peso molecular de 5.000 o menos y la macromolécula (por ejemplo, anticuerpo, proteína o ácido nucleico) tiene un peso molecular superior a 5.000, por ejemplo, de entre 5.001-1.000.000.

25 Una ventaja de proporcionar un enlazador es que permite a la macromolécula, por ejemplo, el anticuerpo, proteína o ácido nucleico, formar la estructura terciaria correcta mediante la prevención de la interacción estérica con la partícula de carbono y permitir la solvatación completa del anticuerpo, proteína o ácido nucleico. Se ha encontrado que esto mejora la relación señal: ruido mediante la reducción de la unión no específica en el ensayo. Un enlazador preferido es polietilenglicol, por ejemplo, PEG12.

30 En consecuencia, la presente invención también proporciona un método para preparar una etiqueta de ensayo que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar una partícula de carbono amorfo, un polímero de dextrano funcionalizado y un primer miembro de un par de unión complementario;
- (ii) adsorber de forma pasiva el polímero de dextrano funcionalizado sobre la superficie de la partícula de carbono amorfo;
- 45 (iii) hacer reaccionar el polímero de dextrano funcionalizado con el primer miembro del par de unión complementario para formar un enlace covalente entre los grupos funcionales en el polímero de dextrano funcionalizado y el primer miembro del par de unión complementario,

en el que las etapas (ii) y (iii) se puede realizar en cualquier orden, pero siguiendo a la etapa (i).

50 Preferiblemente, el método comprende además hacer reaccionar el polímero de dextrano funcionalizado con una molécula bifuncional, antes de la reacción con el primer miembro del par de unión complementario, para formar un enlazador entre el dextrano funcionalizado y el primer miembro del par de unión complementario. Otras características preferidas de la etiqueta de ensayo descrito en el presente documento se aplican igualmente a este método.

55 La etiqueta de ensayo de la presente invención encuentra aplicabilidad general en el campo de los ensayos. Sin embargo, la etiqueta se utiliza preferentemente en el dispositivo descrito con referencia a WO 2004/090512. En consecuencia, la presente invención también proporciona un dispositivo para la realización de un ensayo, que comprende:

la etiqueta de ensayo como se describe en el presente documento; una fuente de radiación adaptada para generar una serie de impulsos de radiación electromagnética a una longitud de onda tal que la absorción de la radiación por la etiqueta genere energía por desintegración no radiante;

- 5 una cámara de muestra que contiene un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, los cuales son capaces de transducir la energía generada por la desintegración no radiante en una señal eléctrica; y un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor.

10 La figura 1 muestra un dispositivo 1 para su uso de acuerdo con la presente invención que se basa en la generación de calor en una partícula 2 (en el presente documento, la partícula de carbono de la etiqueta de ensayo), en la irradiación de la partícula 2 con radiación electromagnética (la partícula se muestra por encima de la superficie del transductor). En aras de la simplicidad, sólo la partícula se muestra en la figura 1 (los componentes restantes del dispositivo se describirán con más detalle a continuación). La figura 1 muestra el dispositivo 1 en presencia de una partícula 2. El dispositivo 1 comprende un transductor 3 piroeléctrico o piezoeléctrico que tiene recubrimientos de electrodos 4.5. El transductor 3 es preferiblemente una película de fluoruro de polivinilideno polarizado o una película de copolímero de VDF-trifluoroetileno. Los recubrimientos de los electrodos 4.5 son preferiblemente transparentes y más preferiblemente formado a partir de óxido de indio y estaño, aunque sería suficiente cualquier material de electrodo transparente o semitransparente, por ejemplo, PEDOT (poli (3,4-etilendioxitiofeno)). Los electrodos tienen preferiblemente un espesor de aproximadamente 35 nm, aunque casi cualquier espesor es posible desde un límite inferior de 1 nm por debajo del cual la conductividad eléctrica es demasiado bajo y un límite superior de 100 nm por encima del cual la transmisión óptica es demasiado baja (no debería ser inferior a 80%T). En un modo de realización particularmente preferido, el transductor es una película recubierta de óxido de fluoruro de polivinilideno de indio y estaño. Una capa adicional se puede aplicar al transductor 3, tal como una capa de polímero de parileno, para la adsorción pasiva de los reactivos en el sensor. Una realización preferida es que la capa de parileno se aplique, a continuación, sobre una capa de estreptavidina polimerizada.

25 La partícula 2 se muestra próxima al transductor 3. Una característica inherente de las partículas de carbón utilizadas en la presente invención es que la partícula 2 genera calor cuando se irradia por una fuente 6 de radiación electromagnética (típicamente denominada "luz"), preferentemente la luz visible. La fuente de luz puede ser, por ejemplo, un LED. La fuente 6 de luz ilumina la partícula 2 con luz de longitud de onda apropiada. Aunque no se desea estar limitado por la teoría, se cree que la partícula 2 absorbe la luz para generar un estado excitado, que luego se somete a la descomposición no radiante, generando de esta manera la energía, indicada por las líneas curvadas en la figura 1. Esta energía es principalmente en forma de calor (es decir, movimiento térmico en el medio ambiente), aunque también se pueden generar otras formas de energía, principalmente una onda de choque. La energía es, sin embargo, detectada por el transductor y convertida en una señal eléctrica. El dispositivo está calibrado para la partícula particular que está siendo medida y, por tanto, la forma precisa de la energía generada por la desintegración no radiante no tiene que ser determinada. A menos que se especifique lo contrario, el término "calor" se usa aquí para significar la energía generada por la desintegración no radiante. La fuente 6 de luz se coloca de modo que ilumine a la partícula 2. Preferiblemente, la fuente 6 de luz está colocada opuesta al transductor 3 y a los electrodos 4.5 y la partícula 2 se ilumina a través del transductor 3 y de los electrodos 4.5. La fuente de luz puede ser una fuente de luz interna dentro del transductor en el que la fuente de luz es un sistema de ondas guiadas. La guía de onda puede ser el propio transductor o la guía de onda puede ser una capa adicional unida al transductor. La longitud de onda de la iluminación depende de la naturaleza precisa de la partícula utilizada.

45 La energía generada por la partícula 2 es detectada por el transductor 3 y se convierte en una señal eléctrica. La señal eléctrica es detectada por un detector 7. La fuente 6 de luz y el detector 7 están ambos bajo el control del controlador 8. La fuente 6 de luz genera una serie de pulsos de luz que se denominan "luz entrecortada". En principio, un único destello de luz, es decir, un pulso de radiación electromagnética, sería suficiente para generar una señal del transductor 3. Sin embargo, con el fin de obtener una señal reproducible, una pluralidad de destellos de luz se utilizan lo cual requiere en la práctica luz entrecortada. La frecuencia a la que se aplican los pulsos de radiación electromagnética puede ser variada. En el límite inferior, el retardo de tiempo entre los impulsos debe ser suficiente para el retardo de tiempo entre cada pulso y la generación de una señal eléctrica que se determine. En el límite superior, el retardo de tiempo entre cada pulso no debe ser tan grande como para que el período necesario para registrar los datos llegué a extenderse de forma irrazonable. Preferiblemente, la frecuencia de los impulsos es de entre 1-50 Hz, más preferiblemente de entre 1-10 Hz y más preferiblemente de 2 Hz. Esto corresponde a un retardo de tiempo entre pulsos de 20-1.000 ms, 100-1.000 ms y 500 ms, respectivamente. Además, la denominada relación "marca-espacio", es decir, la relación desde la señal de encendido hasta la señal de apagado es preferiblemente uno, aunque otras relaciones se pueden usar sin efecto perjudicial. Hay algunas ventajas al usar un pulso de encendido más corto con una señal de apagado más larga, con el fin de permitir que el sistema se aproxime al equilibrio térmico antes de que el siguiente impulso perturbe el sistema. Las fuentes de radiación electromagnética que producen luz entrecortada con diferentes frecuencias de corte o distintas relaciones marca-espacio son conocidas en el estado de la técnica. El detector 7 determina el retardo de tiempo entre cada pulso de luz de la fuente 6 de luz y la señal eléctrica correspondiente detectada por el detector 7 desde el transductor 3. Este retardo de tiempo es una función de la distancia, d. Cuando las partículas se unen directamente a la superficie, la señal mide preferiblemente entre 2-7 ms. Para la medición de partículas a través de la profundidad de la cámara, se usan retrasos de tiempo más largos, por

ejemplo, entre 10-50 ms. El sistema también se puede configurar para medir el pico máximo en la señal, cuyos retardos de tiempo pueden cambiar a lo largo del proceso de medición.

Se puede utilizar cualquier método para determinar el retardo de tiempo entre cada pulso de luz y la señal eléctrica correspondiente que proporcione resultados reproducibles.

5 Hay que señalar que la partícula 2 puede estar separada de la superficie del transductor y que una señal se puede detectar todavía. Además, no sólo la señal es detectable a través de un medio de intervención, sino que se pueden distinguir diferentes distancias,  $d$ , (esto se ha denominado "establecimiento de perfiles en profundidad") y la intensidad de la señal recibida es proporcional a la concentración de la partícula 2 a la distancia particular,  $d$ , de la superficie del transductor 3. Por otra parte, se constató que la naturaleza del medio en sí mismo influye en el retardo de tiempo y en la magnitud de la señal para un retardo de tiempo dado.

10 El propósito de la partícula es la de absorber la radiación electromagnética generada por la fuente de radiación para generar energía por desintegración no radiante. La desintegración radiante se convierte entonces en una señal eléctrica por el transductor. La longitud de onda de la radiación electromagnética es tal que la absorción de la radiación por las partículas genera energía por desintegración no radiante. La longitud de onda de la radiación es preferiblemente entre 300-1.000 nm.

15 Los glóbulos rojos están presentes en una muestra de sangre, es decir, sangre entera (no separada). Estas células tienden a sedimentarse con el tiempo en un sistema estático, tal como un tubo de ensayo o un recipiente, ya que son más densas que el plasma circundante en la que se dispersan. El sistema descrito en el documento WO 2004/090512 se establece normalmente para minimizar la señal de los glóbulos rojos, mediante el uso de una longitud de onda de luz a la que se reduce al mínimo la señal de los glóbulos rojos (alrededor de 690 nm), y también mediante la medición de la señal unos pocos milisegundos después del pulso de luz, limitando de este modo la salida al calor generado en estrecha proximidad al transductor.

20 La muestra será típicamente del orden de microlitros (por ejemplo, 1 a 100  $\mu\text{L}$ , preferiblemente 1 a 30  $\mu\text{L}$ ). Con el fin de mantener una muestra de fluido, el transductor está situado preferiblemente en una cámara, la cámara tiene una o más paredes laterales, una superficie superior y una superficie inferior. En consecuencia, el transductor está situado preferiblemente dentro de una cámara para mantener la muestra en contacto con el transductor. Preferiblemente, el transductor esté integrado con la cámara, es decir, que forma una de las paredes laterales, o de las superficies superior o inferior que definen la cámara. En un modo de realización preferido, la cámara tiene una superficie superior y una superficie inferior y el transductor forma parte de la superficie superior. La muestra puede simplemente ser retenida mediante fuerzas de tensión superficial, por ejemplo, dentro de un canal capilar. La profundidad de la cámara es típicamente de entre 50  $\mu\text{m}$  a 1 cm, preferiblemente de entre 150 - 250  $\mu\text{m}$ .

25 El dispositivo de la presente invención puede contener una pluralidad de cámaras, preferiblemente en comunicación fluida. El dispositivo, preferiblemente, contiene además un pasaje de recogida de muestra alargado que tiene un extremo de recogida de muestras que está en contacto con el exterior del dispositivo y un extremo de suministro de muestras que está en comunicación fluida con la cámara(s) de la muestra, como se muestra en el núcleo 21 en la figura 2. Véase el documento WO 2011/027147 para más detalles.

30 En un modo de realización preferido, el dispositivo comprende además un pasaje de recogida de muestra alargado que tiene extremos abiertos y dispuestos para circular el fluido dentro del pasaje por acción capilar, en el que el pasaje tiene un extremo de recogida y un extremo de suministro y el extremo de suministro está en comunicación fluida con la cámara de muestra. El pasaje puede ser proporcionado a lo largo de una primera parte de su longitud con una región recubierta con un anticoagulante. Esta disposición permite que la muestra en contacto con el anticoagulante prevenga la coagulación en el pasaje de recogida.

35 El dispositivo puede tomar la forma de un lector independiente y un cartucho, o un dispositivo integrado. En el primero, el dispositivo está formado por un lector y un cartucho, en el que el cartucho es acoplable de forma desmontable con el lector, y en el que el lector incorpora a la fuente de radiación y al detector, y el cartucho incorpora al transductor y a la cámara. El lector es, preferiblemente, un lector portátil. El cartucho es, preferiblemente, un cartucho desechable.

La presente invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Sensor de película de PVDF

Una película piezo/piroeléctrica polarizada de fluoruro de polivinilideno (PVDF) bímorfo, recubierta de óxido de indio y estaño fue utilizada como el dispositivo de detección en los siguientes ejemplos. La superficie de óxido de indio y

estaño se recubrió con una capa de parileno (espesor aproximado de 1 micra) por un proceso de deposición en fase de vapor de gas. Este método implicaba la sublimación y la subsiguiente pirólisis de un precursor paraciclofano, seguido por una polimerización de radicales libres en la superficie. Véase el documento WO 2009/141637 para más detalles. A continuación, la película resultante se recubrió de una solución de poliestreptavidina (200 µg/mL en PBS (regulador de fosfato salino) - 10 mmol/L de regulador de fosfato conteniendo 2.7 mmol/L de KCl, 137 mmol/L de NaCl y Tween 0,05%) por incubación a temperatura ambiente durante la noche. La poliestreptavidina se preparó como se describe por Tischer y otros (US 5,061,640). La poliestreptavidina proporciona un sensor de unión universal al que se pueden unir otras moléculas a través de la reacción de biotina-estreptavidina de alta afinidad.

#### Ejemplo 2

##### 10 Preparación del cartucho

Como se muestra en la figura 2, un cartucho 14 se fabrica para llevar a cabo la medición. El cartucho 14 se fabrica de una película 15 piezo/piroeléctrica soportada sobre un rigidizador 16. Se aplicó a la superficie una película 17 de poliéster recubierta de adhesivo, sensible a la presión, troquelada para formar tres cámaras 18 de muestras. Se hicieron disposiciones para permitir conexiones eléctricas a las superficies superior e inferior de la película 15 piezo/piroeléctrica con el fin de detectar la carga generada. El cartucho 14 a continuación, se formó intercalando los componentes anteriores entre una cubierta 19 superior, a la que se aplicó una etiqueta 20, y un núcleo 21, sello 22 y cubierta inferior 23.

Las medidas se llevaron a cabo mediante la carga de las cámaras de muestra con la muestra. La película 15 piezo/piroeléctrica se irradió a través de los agujeros, en la cubierta 19 superior, con luz LED entrecortada de forma secuencial con LEDs. Para cada pulso LED, se midió un voltaje a través de la película 15 piezo/piroeléctrica utilizando un amplificador y convertidor analógico a digital (ADC). La señal ADC con resolución temporal se representó gráficamente en el tiempo.

#### Ejemplos 3-13

En los ejemplos que siguen, se llevaron a cabo ensayos utilizando controles positivos y negativos para mejorar la exactitud y la precisión de la medición. De los dos controles, uno define la tasa de unión máxima esperada bajo control de difusión y otro define la señal mínima esperada en ausencia de señal (normalmente ligeramente negativo debido a la sedimentación de partículas). La salida de señal se define de forma ratiométrica por estos dos controles.

#### Ejemplo 3

##### 30 Preparación de un coloide de carbono anti-cTnI (troponina anti-cardíaca I) por adsorción pasiva (conjugado de carbono 1)

400 µg de troponina I anti-cardíaca de un clon de anticuerpo monoclonal de ratón 560 (Hytest, Finlandia) se preparó en 2 mL de regulador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,2. A esto se añadió 1 mL de un 0,2% p/v de suspensión en agua de partículas de carbono SB4 (Degussa). La mezcla se dejó en agitación a R/T durante 2 h, después se diluyó mediante la adición de 6 ml de regulador de fosfato de potasio de 10 mM que contenía 4.5% de sacarosa, 0.15% de BSA (albumina de suero bovino) y 0,075% 20K PEG (regulador de lavado y almacenamiento). Esta solución fue después purificada mediante tres ciclos de centrifugación, granulación, lavado, sonicación y re-suspensión en el regulador de almacenamiento. Finalmente, se añadieron 4.5 µL de conservante Proclin 950 y la solución se almacenó a 4°C.

#### Ejemplo 4

##### 40 Preparación de un coloide de carbono dextrano anti-cTnI por reacción primaria con un reactivo de dextrano seguido de la unión covalente de anticuerpo anti cTnI (conjugado de carbono 2)

Se disolvieron 10 KDa aminodextrano (Invitrogen) en 5 mg/mL en un regulador de fosfato 0,1 M, pH 7.5 y 11.6 mL de esta solución se incubaron durante 60 minutos a 20°C con 3.300 µL de una solución 30 mg/mL (en DMSO (dimetilsulfóxido)) de N-hidroxisuccinimida-PEG12-maleimida (Thermo Fisher), equivalente a un exceso molar 20:1, sobre aminodextrano. Después de 60 minutos la reacción se interrumpió con glicina (86.73 mg) y después se purificó en una columna de Sephadex G50, eluyendo con un regulador de fosfato 0.1 M, pH 7.5. El pico del producto se analizó con el ensayo de ácido sulfúrico fenol para determinar una concentración de 1.776 mg/mL. La maleimida aminodextrano se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Se sonicaron 100 mg de partículas de carbono SB4 (Degussa) en agua (50 mL) durante 0.5 h. A partir de la suspensión resultante 1.667 mL de coloide de carbono se mezcló con una solución de aminodextrano-maleimida (2.252 mL) y un regulador de fosfato 0.1 M, pH 7.5 (8.859 mL). La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 30 s luego mezclada con rodillo durante 90 minutos. La mezcla entonces se centrifugó y se granuló durante 15 minutos y se descartó el

sobrenadante. La mezcla se resolubilizó por sonicación en regulador de fosfato 0.01 M, pH 7.2 (10 mL) durante 30 s y la suspensión se centrifugó de nuevo. Se llevaron a cabo un total de tres ciclos de lavado.

5 En paralelo, 11.66 mg de anticuerpo anti-troponina, clon 560 (HyTest) se desalaron en regulador fosfato usando una sola columna desechable PD-10 Sephadex G25M y luego se activaron con 5 equivalentes de N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA) (Thermo-Fisher) (90 µL de una solución de 1 mg/mL en DMSO) a 20°C durante 1 h, después se desprotegeron usando regulador de hidroxilamina (315 µL) durante 15 min. El anticuerpo tiolado se purificó sobre 2 columnas desechables PD-10 Sephadex G25M en un regulador de fosfato 0.1 M, pH 7.5, dando una solución que contiene 1.76 mg/mL de anticuerpo. El nivel de incorporación de tiol se midió como 1.9 tioles por anticuerpo usando el ensayo de Ellman.

10 Después del ciclo de lavado final del carbono aplicado sobre maleimida aminodextrano, se descartó el sobrenadante y se añadió el anticuerpo tiolado (10 mg, 5.682 mL) junto con 4.318 mL de un regulador de fosfato 0.1 M, pH 7.5. La mezcla se resolubilizó por sonicación durante 30 s después la reacción se mezcló mediante rodillo durante 1 h 45 minutos antes de ser inhibida con 2-mercaptoetanol (200 µL, 1 mg/mL en agua) durante 15 minutos, después se inhibió con PEG12-maleimida (Thermo Fisher) (180 µL, 10 mg/mL) durante otros 15 minutos. Después, la mezcla se  
15 centrifugó como antes y se sometió a un período de tres ciclos de lavado antes de una resolubilización final en un regulador de fosfato 0.01 M, PH 7, 2 + 0,1% de BSA + 3% de sacarosa + 0,05% de PEG 20K (375 µL) con 60 s de sonicación.

20 De manera similar, un conjugado de carbono se preparó exactamente en las mismas condiciones que el anterior, excepto que el anticuerpo no se activó con SATA. Todos los pasos de preparación y de lavado se llevaron a cabo de una manera similar.

#### Ejemplo 5

Comparación de las capacidades de unión de dos coloides de carbono anti-cTnI diferentes

25 Los conjugados de carbono anti-cTnI de los ejemplos 3 y 4 se diluyeron en soluciones de troponina cardíaca I en solución salina tamponada de fosfato más 0,5% de albúmina de suero bovino. La concentración final de la troponina fue de 50 ng/mL y la concentración final de sólidos de carbono varió de 0,000039% p/v a 0,0035% p/v. Se realizó también un control sin conjugado de carbono añadido. El volumen total de la reacción fue de 500 µL. La concentración de sólidos de carbono fue comprobada mediante la medición de la densidad óptica de la solución a 450 nm y comparando frente a una curva estándar preparada con la suspensión SB4 de carbono en agua. Después de la incubación durante 30 minutos, los sólidos de carbono se retiraron de cada mezcla de reacción por centrifugación.  
30 Después se diluyeron 50 µL de cada mezcla en 450 µL de suero libre de troponina y la concentración de troponina no unida en cada muestra se midió en un analizador de inmunoensayo Abbott Architect Clinical. La cantidad de troponina unida en cada concentración de sólidos de carbono se calculó por sustracción, entonces esto se representó gráficamente y el conjugado de carbono total requerido para unir al 50% de la troponina para cada uno de los dos conjugados se interpoló a partir de los datos (mostrados en la figura 3).

35 La concentración de troponina unida se rige por la ecuación de equilibrio:

$$K_a = \frac{[Ab * Ag]}{[Ab][Ag]}$$

40 donde  $[Ab*Ag]$  es la concentración de complejo de troponina-anticuerpo,  $[Ag]$  es la concentración de troponina libre y  $[Ab]$  es igual a la concentración de anticuerpo en la mezcla de reacción con sitios de unión disponibles. En un 50% de unión, la concentración de troponina libre y complejada es igual, por lo que la ecuación para el equilibrio (la ley de acción de masas) simplifica de  $K_a = 1/[Ab]$ . Dado que el mismo anticuerpo se utiliza para cada conjugado, el porcentaje de sólidos de carbono necesario para lograr un 50% de unión, proporciona una medida directa de la cantidad relativa de anticuerpo activo para los dos conjugados. Se puede observar que alrededor de cinco veces más de conjugado adsorbido de forma pasiva (0.00025% de sólidos) se requiere para unir al 50% de la troponina en comparación con el conjugado de dextrano (0,00005% de sólidos), lo cual indica que hay alrededor de cinco veces más de anticuerpo  
45 activo en el conjugado de dextrano.

#### Ejemplo 6

Inmunoensayo de cTnI utilizando coloide de carbono recubierto de forma pasiva con anticuerpo

50 Se realizó un inmunoensayo para la troponina I utilizando el conjugado de carbono preparado en el Ejemplo 3. El ensayo se llevó a cabo utilizando el sistema detector piroeléctrico descrito en el documento WO 2004/090512, utilizando controles, tal y como se describió anteriormente en este documento. En resumen, tres áreas separadas de un sensor PVDF se aplicaron en tres anticuerpos diferentes, el primero un anticuerpo de control negativo no específico, el segundo un anticuerpo monoclonal dirigido contra la troponina (clon Hytest 19C7) y el tercero un anticuerpo anti-ratón de cabra policlonal. Los anticuerpos habían sido previamente biotinilados, y fueron aplicados sobre una superficie

de estreptavidina polimerizada universal que previamente había sido aplicada sobre el sensor de PVDF. El sensor fue encerrado en un dispositivo fluídico fabricado a partir de una pieza moldeada por inyección y una serie de adhesivos sensibles a la presión troquelados, como se muestra en la figura 2, que genera tres cámaras separadas, interconectadas por tres mediciones separadas. Se prepararon muestras de plasma humano, mezclado con el conjugado de carbono 1 y el regulador (35 mM HEPES, 42 mM EGTA, 280 mM NaCl, 1.22% Tween), ya sea con niveles de troponina indetectables, o sobrecargados con complejo ITC de troponina humana de alrededor de 1 ng/mL. El conjugado de carbono se diluyó 1:12, para dar una concentración final de carbono de aproximadamente 0,004% p/v. Las tres áreas de la superficie del sensor fueron expuestas a la mezcla de reacción y se iluminaron secuencialmente mediante LEDs de alta potencia (690 nm). La señal piroeléctrica generada en cada área se amplificó y se controló a lo largo de 10 minutos. A continuación, se calculó la tasa de cambio de la señal en cada cámara durante los 10 minutos, y se calculó la tasa de unión de partículas de carbono para el anticuerpo anti-troponina en el área 2 en relación a las otras dos áreas. Por tanto, la señal cinética en la cámara 3 se definió como 1.00, la señal de cinética en la cámara 1 se definió como 0.00, y el resultado del ensayo es donde la señal cinética en la cámara 2 se encuentra entre las otras 2 cámaras. Si hay suficientes anticuerpos en las partículas de carbón, entonces todas las partículas se unirán a la superficie anti-ratón de cabra en la cámara 3, y la tasa de unión se registrará exclusivamente por cinética de difusión. Se llevaron a cabo diez repeticiones en cada concentración, para generar una señal media y una desviación estándar en la medición.

Los datos se muestran en la figura 4, con barras de error SD 1. La señal en presencia de 1 ng/mL de troponina I era aproximadamente de 0.11, es decir, la unión se llevó a cabo en el 11% de la tasa de difusión máxima. La magnitud de la señal y la imprecisión observadas dieron una sensibilidad analítica de alrededor de 120 pg/mL.

#### Ejemplo 7

Inmunoensayo para cTnI utilizando coloide de carbono recubierto activamente con anticuerpo

Un inmunoensayo para troponina se llevó a cabo utilizando el conjugado de carbono preparado en el ejemplo 4. La única diferencia entre este experimento y el que se describe en el ejemplo 6 fue que el conjugado de carbono era diferente, todas las demás condiciones de ensayo fueron idénticas. En este caso, la señal observada (ver la figura 4) fue casi cuatro veces mayor, pero la imprecisión en el nivel cero-analito se mantuvo relativamente sin cambios. Esta mejora en la relación señal-ruido redujo la sensibilidad analítica a 35 pg/mL. Se observó que las señales en las cámaras 1 y 3 fueron similares en ambos ejemplos 6 y 7, el principal cambio fue en la cámara 2. Se concluyó que el nivel más alto de anticuerpo activo en el conjugado 2 llevó a más de troponina a estar unida a la partícula, y por lo tanto, hubo un aumento en la velocidad de unión de las partículas a la superficie del sensor en la cámara 2. Un experimento de control también se llevó a cabo utilizando el conjugado del ejemplo 4 que se había preparado sin activación SATA del anticuerpo. Esto no dio ninguna señal distinguible en las cámaras 2 o 3, lo que indica que el anticuerpo no se une al dextrano maleimido a menos que el anticuerpo tenga grupos tiol libres disponibles para formar un enlace covalente.

#### Ejemplo 8

Preparación de co-conjugado de albúmina de suero bovino con fluoresceína y digoxigenina

La albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) se disolvió a 15 mg/mL en solución de hidrógeno carbonato de sodio 0.1 M, y 2.267 mL (34 mg de BSA) de esta solución se incubaron durante 60 minutos a 20°C con 251 mL de una solución de 20 mg/mL (en DMSO) de éster de N-hidroxisuccinimida digoxigenina (Roche). Después de 60 minutos, 518 µl (7 mg) de esta solución se retiraron y se añadieron 61 µl de una solución 15 mg/mL (en DMSO) de éster de N-hidroxisuccinimida de fluoresceína (Perbio) a esta parte alícuota. Esta solución se incubó durante 60 min a 20°C. Las relaciones molares calculadas de digoxigenina: BSA y fluoresceína: BSA fueron 20:1 y 15:1, respectivamente.

El producto BSA-digoxigenina-fluoresceína en bruto se purificó en un regulador PBS, pH 7.1 que contenía azida sódica al 0.1% en una sola columna de PD-10 Sephadex G25M (GE), produciendo 1.6 mL de una solución que contiene aproximadamente 4.30 mg/mL de BSA, que se filtró a 0.2 µm (filtro Minisart, Sartorius).

#### Ejemplo 9

Preparación de co-conjugado de amino dextrano con fluoresceína y digoxigenina

Se disolvieron 70 KDa aminodextrano (Invitrogen) en 5.0 mg/mL en solución de hidrógeno carbonato de sodio 0.1 M, y 1.0 mL (5 mg aminodextrano) de esta solución se incubó durante 60 minutos a 20°C de forma simultánea con 19 µL de una solución 5.0 mg/mL (en DMSO) de éster de digoxigenina N-hidroxisuccinimida (Roche) y 14 µL de una solución de 5.0 mg/mL (en DMSO) de éster de fluoresceína N-hidroxisuccinimida (Perbio), estando ambos reactivos en un exceso molar 2:1 sobre aminodextrano.

El producto de aminodextrano-digoxigenina-fluoresceína en bruto se purificó en un regulador PBS, pH 7.1 que contenía azida sódica al 0.1% en una sola columna de PD-10 Sephadex G25M (GE), produciendo 2.7 mL de una solución que

contenía aproximadamente 1.67 mg/mL de aminodextrano . Se añadió Proclin 950 (27 µl) y la solución se filtró a 0.2 micras (filtro Minisart, Sartorius).

#### Ejemplo 10

Preparación de co-conjugado de carbono, albúmina de suero bovino con digoxigenina/fluoresceína

5 El conjugado de albúmina de suero bovino a partir del Ejemplo 8 se diluyó a 150 µg/mL en regulador de fosfato 10 mM, después se añadió 1 mL de esta solución a 0.5 mL de una solución 0.2% de SB4 de carbono en agua desionizada. Después de 2 h, se añadió 3 mL del regulador de lavado/almacenamiento del Ejemplo 3, a continuación, la mezcla se centrifugó, se granuló, se lavó y se suspendió (en el mismo regulador), y finalmente se re-constituyó en 2.5 mL del regulador de almacenamiento y se mantuvo a 4°C.

10

#### Ejemplo 11

Preparación de digoxigenina dextrano de carbono / fluoresceína co-conjugado

15 El conjugado de dextrano del Ejemplo 9 se diluyó a 25 µg/mL en regulador de fosfato 10 mM, después se añadió 1 mL de esta solución a 0.5 mL de una solución 0.2% de SB4 de carbono en agua desionizada. Después de 2 h, se añadió 3 mL del regulador de lavado/almacenamiento del Ejemplo 3, a continuación, la mezcla se centrifugó, se granuló, se lavó y se suspendió (en el mismo regulador), y finalmente se re-constituyó en 2.5 mL del regulador de almacenamiento y se mantuvo a 4°C.

15

#### Ejemplo 12

Rendimiento del ensayo y la estabilidad del carbono BSA con digoxigenina/fluoresceína

20 Un ensayo competitivo para la digoxina se llevó a cabo utilizando el conjugado de carbono preparado en el Ejemplo 10. El ensayo se llevó a cabo utilizando el sistema detector piroeléctrico que se describe en el documento WO 2004/090512, utilizando controles, tal como se describe más arriba. En resumen, tres áreas separadas de un sensor PVDF se aplicaron en tres anticuerpos diferentes, el primero un anticuerpo de control negativo no especificado, el segundo un anticuerpo monoclonal dirigido contra la digoxina (Jackson Immunoresearch clon HY-A.1) y el tercero un anticuerpo monoclonal anti-FITC. Los anticuerpos habían sido previamente biotinilados, y se aplicaron sobre una superficie de estreptavidina polimerizada universal que previamente había sido aplicada sobre el sensor de PVDF. El sensor fue encerrado en un dispositivo fluídico fabricado a partir de una pieza moldeada por inyección y una serie de adhesivos sensibles a la presión, troquelados, como se muestra en la figura 2, el cual generó tres cámaras separadas, interconectadas para tres mediciones separadas. Se prepararon muestras de plasma humano, mezclado con el conjugado de carbono 8 y el regulador (Tris 66 mM, 14 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.05% de Tween 20), bien con niveles de digoxina indetectables, o sobrecargadas con digoxina purificada a alrededor de 5 ng/mL. El conjugado de carbono se diluyó 1:14 en la muestra, para dar una concentración final de carbono de aproximadamente 0,0035% p/v. Las tres áreas de la superficie del sensor fueron expuestas a la mezcla de reacción y las tres áreas fueron iluminadas secuencialmente mediante LEDs de alta potencia (690 nm). La señal piroeléctrica generada en cada área se amplificó y se controló a lo largo de 10 minutos. A continuación, se calculó la tasa de cambio de la señal en cada cámara durante los 10 minutos, y se calculó la tasa de unión de partículas de carbono para el anticuerpo anti-digoxina en la cámara 2 en relación a las otras dos cámaras. Se llevaron a cabo diez repeticiones en cada concentración para generar una señal media y una desviación estándar en la medición. En este ejemplo, se esperaba una señal alta en la cámara 2 en ausencia de digoxina, ya que el anticuerpo en la superficie reconoce la digoxigenina en la superficie de la partícula de carbono. Si la digoxina está presente en la muestra, entonces esto perturba la unión en la cámara 2 bloqueando los sitios de unión de anticuerpos en la superficie del sensor. El ensayo se repitió durante varios días, con la muestra preparándose de nuevo cada vez, utilizando conjugado de carbono 8, el cual se almacenó en formato líquido a 4°C.

25

30

35

40

Los datos se muestran en la figura 5, con barras de error SD 1. En el día cero del ensayo se realiza como se espera, dando una señal alta en ausencia de la digoxina, y una señal baja en presencia de digoxina. Sin embargo, puede verse que el rendimiento del ensayo cambia cuando transcurre el tiempo, con la señal en ausencia de digoxina reduciéndose cuando se almacena el conjugado de carbono. La señal en la cámara 1 de estos ensayos (el control de unión mínima) permanece en gran medida sin cambios con el tiempo, es la señal en las cámaras 2 (anti-digoxina) y 3 (anti-FITC), la que está cambiando, con la señal cayendo con el transcurso del tiempo en ambas cámaras. La figura 6 muestra la tasa de unión en la cámara 3 a través del tiempo. La señal en la cámara 3 es independiente de la concentración de digoxina, ya que la unión es del grupo de fluoresceína sobre la partícula de carbono. La caída de la señal podría sugerir que el conjugado BSA-digoxigenina-FITC se está desorbiendo de la superficie de la partícula de carbono con el tiempo cuando se almacena. Cualquier BSA no unido-digoxigenina-FITC en solución se completaría por los sitios de unión en la superficie y descendería la tasa de unión. Esto fue confirmado por la centrifugación, el granulado, el lavado y la re-suspensión del conjugado de carbono. Esto condujo a un aumento en la unión en la cámara 3, como se muestra en la figura 7.

50

55

Ejemplo 13

Rendimiento del ensayo y la estabilidad del carbono dextrano con digoxigenina/fluoresceína

5 Un ensayo competitivo para la digoxina se llevó a cabo utilizando el conjugado de carbono preparado en el Ejemplo 11. Las condiciones de reacción fueron idénticas a las utilizadas en el Ejemplo 12, excepto por el conjugado de carbono. Los recuentos de ensayo ratiométrico se muestran en la figura 8. Se observa que la señal de ensayo final (salida ratiométrica) no muestra ningún cambio durante los 29 días que el carbono fue almacenado a 4°C. Los valores de la cámara 3 se muestran en la figura 9, lo que confirma que no hubo deterioro en el conjugado durante este período.

Reivindicaciones

1. Una etiqueta de ensayo que comprende una partícula de carbono amorfo, un polímero de dextrano funcionalizado adsorbido de forma pasiva sobre la superficie de la partícula de carbono y un primer miembro de un par de unión complementario unido covalentemente al polímero de dextrano funcionalizado.
- 5 2. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en la reivindicación 1, en la que la partícula de carbono tiene un tamaño de partícula de entre 25-250 nm.
3. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en las reivindicaciones 1 o 2, en la que el dextrano funcionalizado tiene un peso molecular promedio de entre 3-2.000 KDa.
- 10 4. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dextrano funcionalizado contiene al menos un grupo funcional seleccionado entre un grupo de sulfato, una acetona, un aldehído, un ácido carboxílico, un ácido sulfónico, un ácido carboxílico/sulfónico activo y un grupo tiol.
5. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en la reivindicación 4, en la que el dextrano funcionalizado es un aminodextrano.
- 15 6. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el primer miembro del par de unión complementario es una molécula pequeña.
7. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el primer miembro del par de unión complementario se selecciona entre un anticuerpo, una proteína y un ácido nucleico.
8. Una etiqueta de ensayo según se reivindica en la reivindicación 7, en la que la etiqueta de ensayo además comprende un enlazador entre el dextrano funcionalizado y el primer miembro del par de unión complementario.
- 20 9. Un método para preparar una etiqueta de ensayo que comprende las siguientes etapas:
  - (i) proporcionar una partícula de carbono amorfo, un polímero de dextrano funcionalizado y un primer miembro del par de unión complementario;
  - (ii) adsorber de forma pasiva el polímero de dextrano funcionalizado sobre la superficie de la partícula de carbono amorfo;
  - 25 (iii) hacer reaccionar el polímero de dextrano funcionalizado con el primer miembro del par de unión complementario para formar una unión covalente entre los grupos funcionales en el polímero de dextrano funcionalizado y el primer miembro del par de unión complementario,
 en donde las etapas (ii) y (iii) se pueden realizar en cualquier orden, pero siguiendo a la etapa (i).
- 30 10. El método según se reivindica la reivindicación 9, que además comprende hacer reaccionar el polímero de dextrano funcionalizado con una molécula bifuncional antes de la reacción con el primer miembro del par de unión complementario, para formar un enlazador entre el dextrano funcionalizado y el primer miembro del par de unión complementario.
11. Un dispositivo para realizar un ensayo que comprende:
  - 35 una etiqueta de ensayo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
  - una fuente de radiación adaptada para generar una serie de impulsos de radiación electromagnética a una longitud de onda tal que la absorción de la radiación por la etiqueta genere energía por desintegración no radiante;
  - una cámara de muestra que contiene un transductor que tiene un elemento piroeléctrico o piezoeléctrico y electrodos, el cual es capaz de transducir la energía generada por la desintegración no radiante en una señal eléctrica; y
  - un detector que es capaz de detectar la señal eléctrica generada por el transductor.
- 40 12. Un dispositivo según se reivindica en la reivindicación 11, en el que la cámara tiene una superficie superior y una superficie inferior y el transductor forma la superficie superior.
13. Un dispositivo según se reivindica en las reivindicaciones 11 o 12, en el que el dispositivo está formado por un lector y por un cartucho, en el cual el cartucho es acoplable de forma desmontable con el lector, y en el cual el lector incorpora a la fuente de radiación y al detector, y el cartucho incorpora a la etiqueta, al transductor y a la cámara.

45

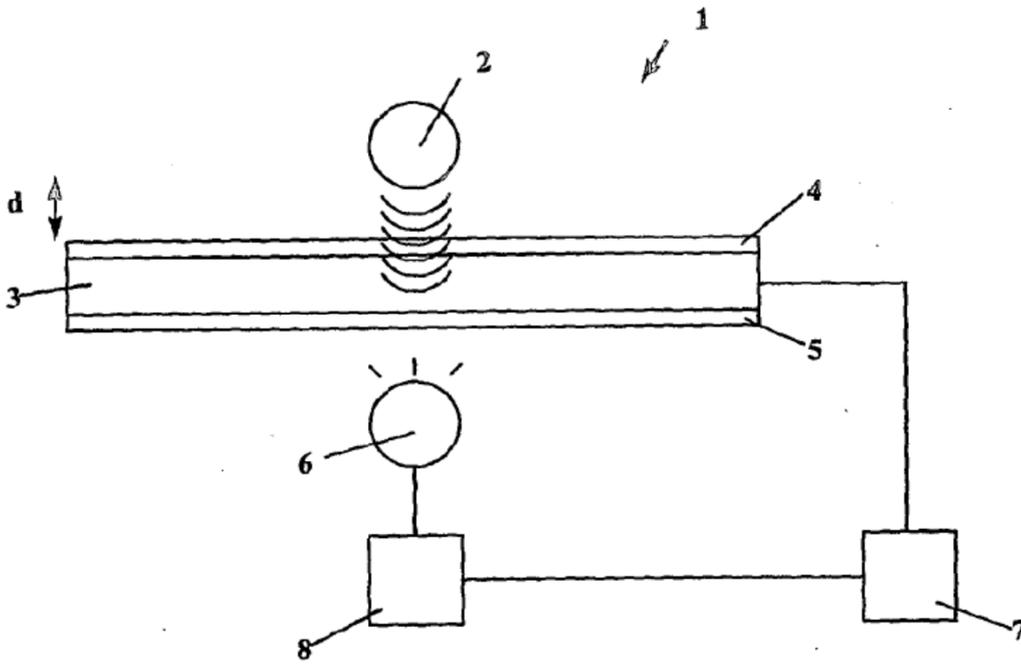


Fig. 1

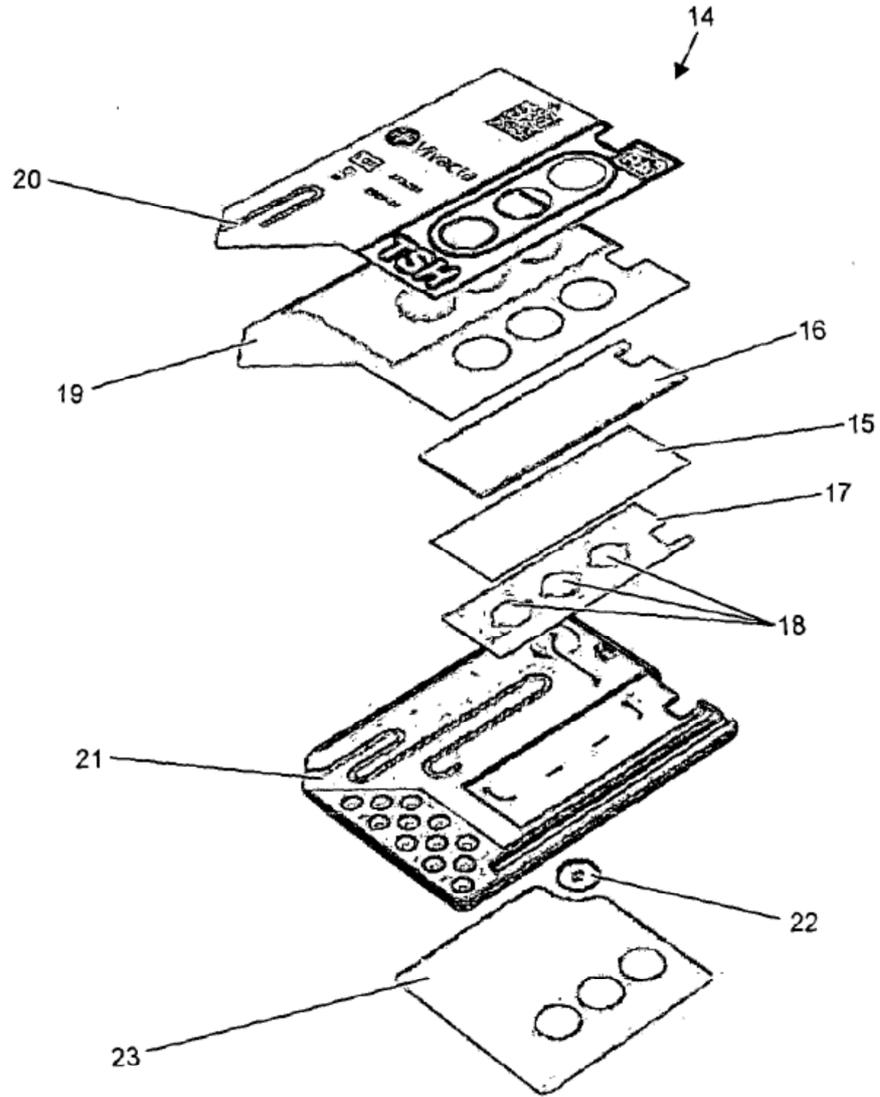


Fig. 2

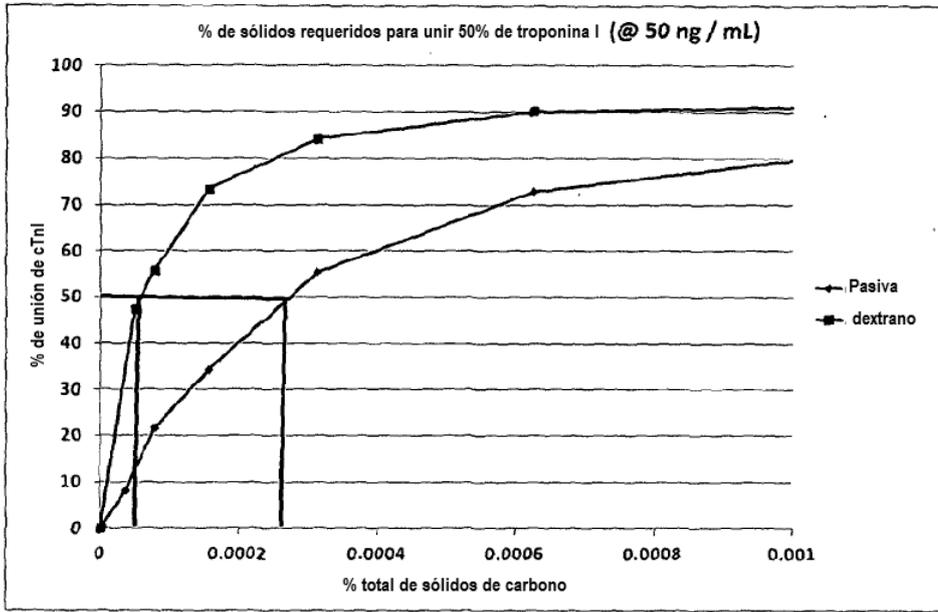


Fig. 3

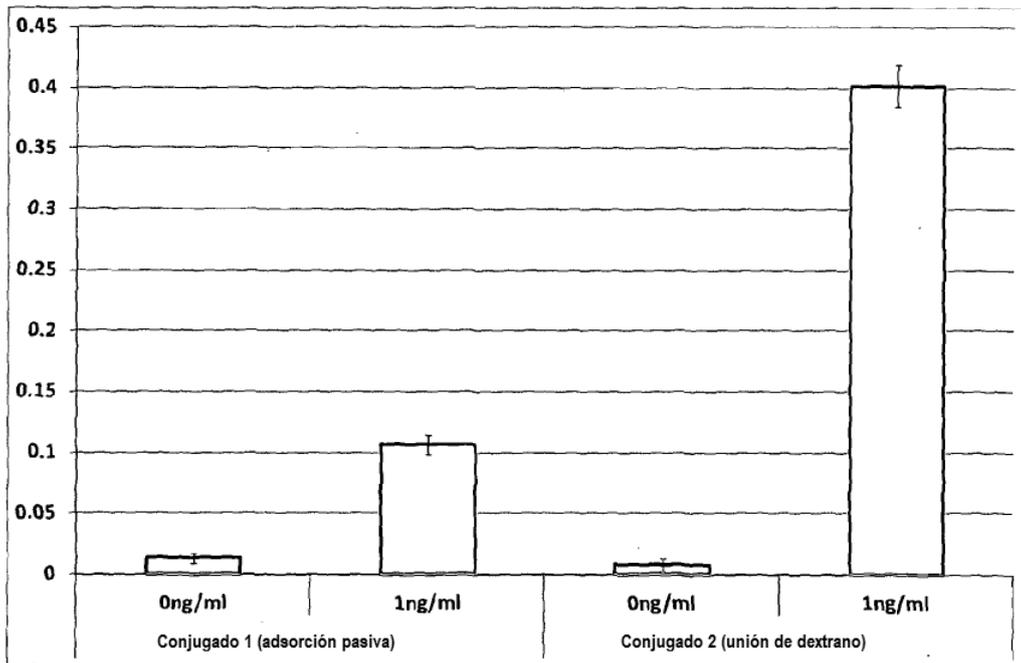


Fig. 4

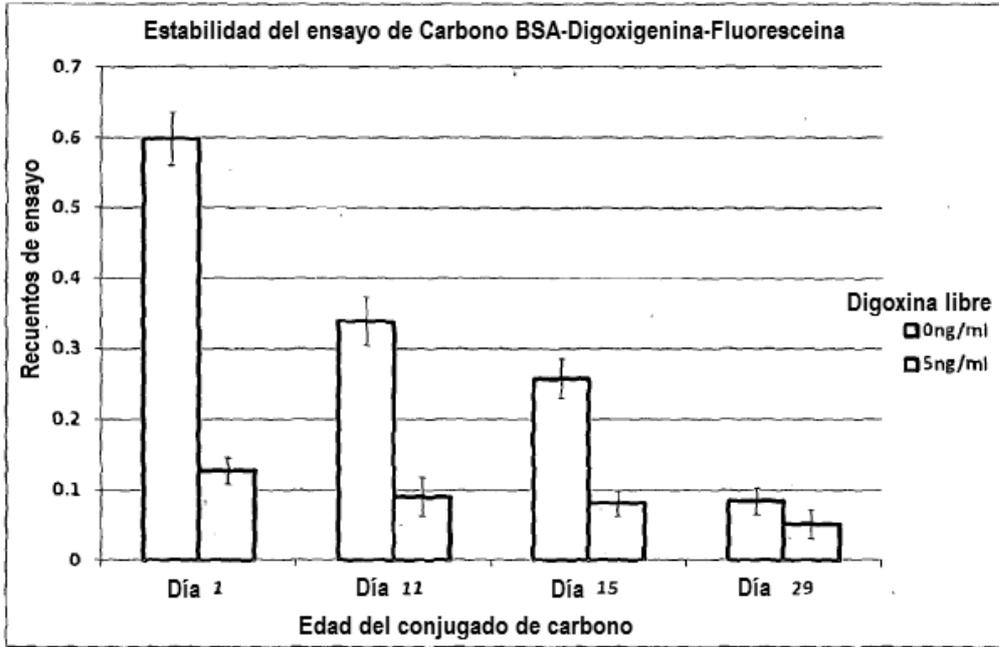


Fig. 5

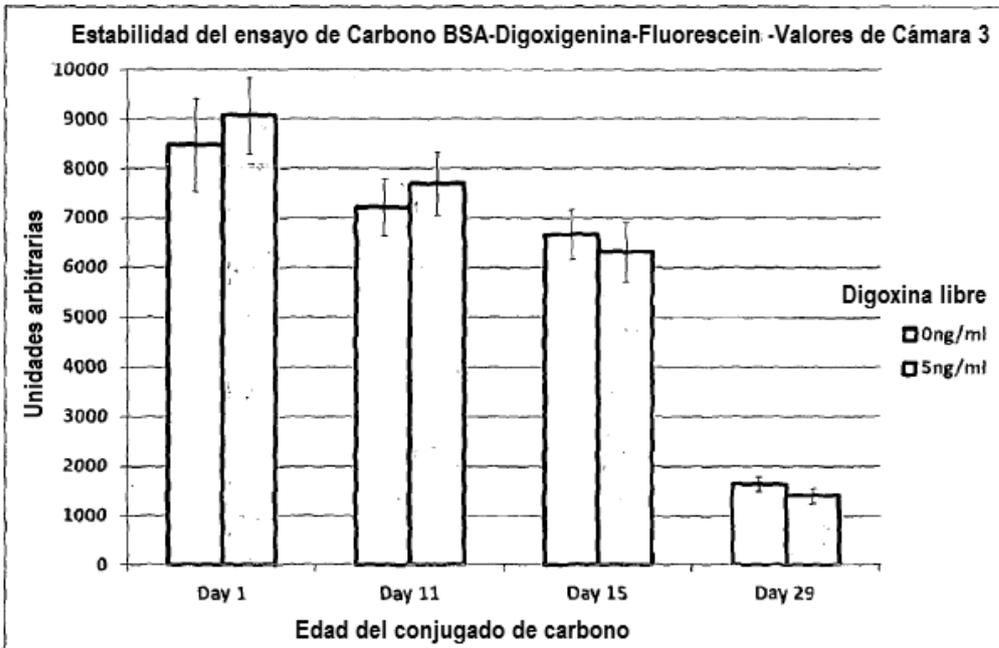


Fig. 6

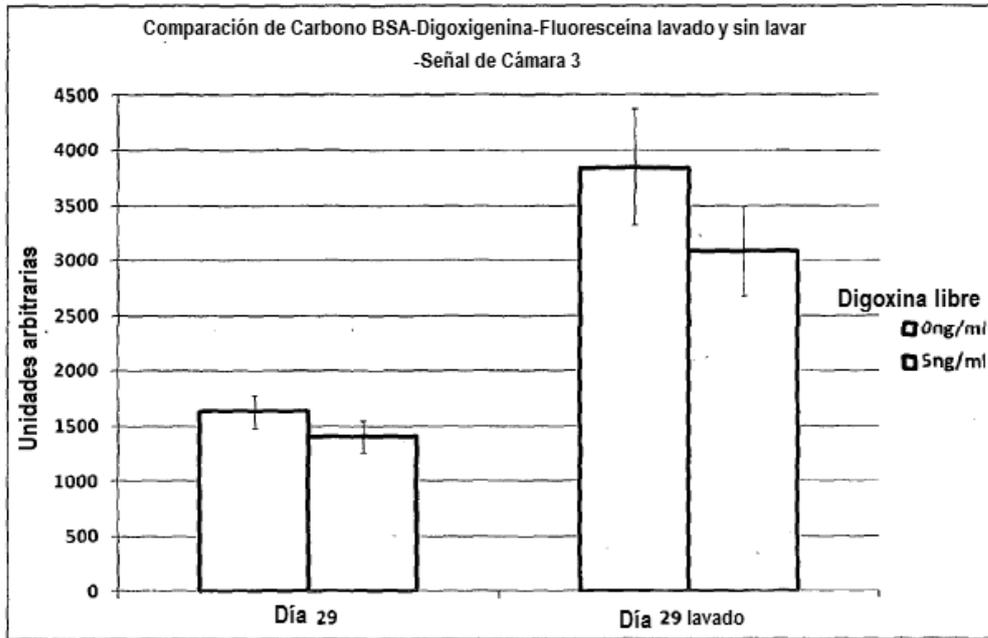


Fig. 7

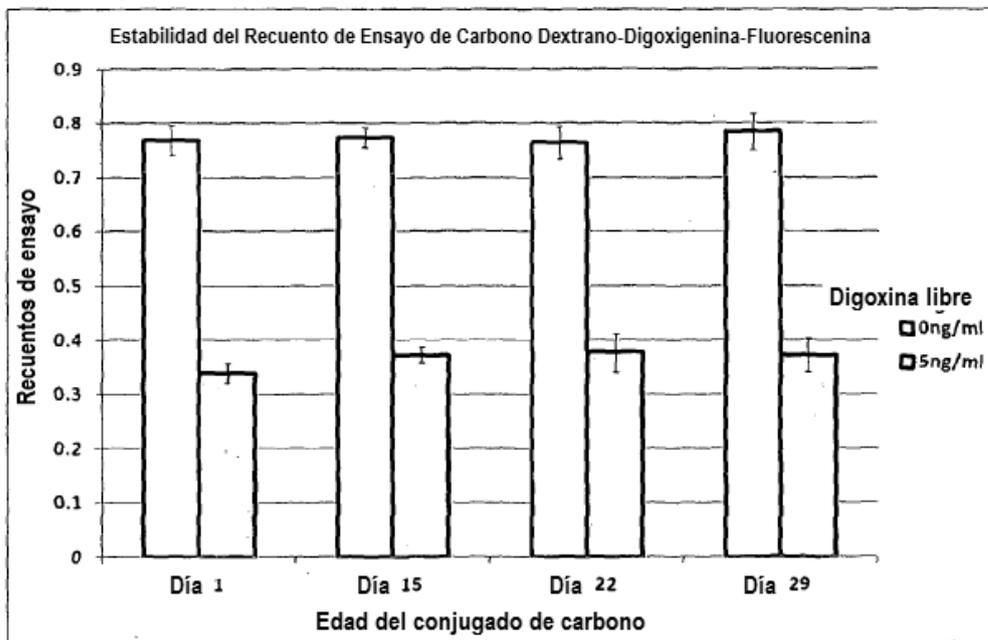


Fig. 8

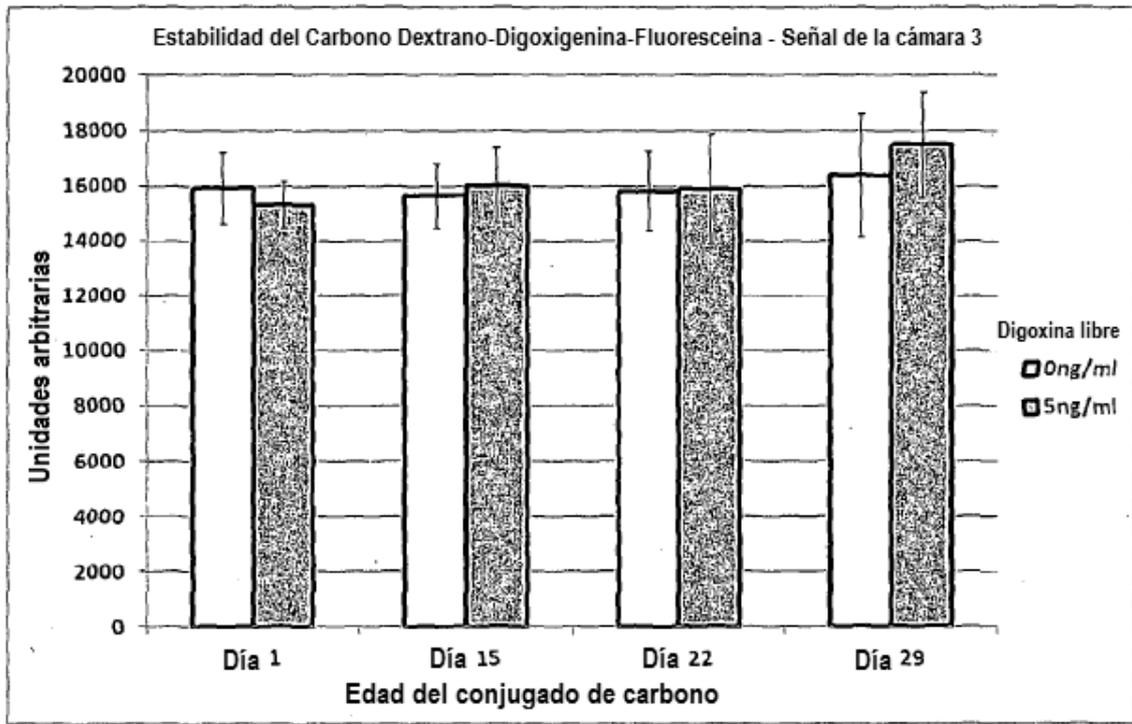


Fig. 9