

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B03C 1/01 (2006.01)

G01N 33/538 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08831120 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2171459**

54 Título: **Procedimiento de valoración de un analito en un medio líquido**

30 Prioridad:

27.07.2007 FR 0705530

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**BERTIN TECHNOLOGIES (100.0%)
10 BIS, AVENUE AMPERE PARC D'ACTIVITES DU
PAS DU LAC
78180 MONTIGNY-LE-BRETONNEUX, FR**

72 Inventor/es:

**COMPAIN, ERIC;
ROUZEAU, CATHERINE y
BIZET, KARINE**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 581 929 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

Procedimiento de valoración de un analito en un medio líquido

5 La invención se refiere a un procedimiento de valoración de al menos un analito en un medio líquido, comprendiendo este procedimiento una reacción del analito con ligandos injertados en partículas magnéticas contenidas en el medio líquido.

10 Se conoce, por el documento WO 03/044532, un procedimiento de valoración de este tipo, que consiste en aplicar un campo magnético a un medio líquido que contiene el analito que va a valorarse y partículas magnéticas funcionalizadas en superficie con ligandos específicos del analito que va a valorarse. El campo magnético tiene una intensidad suficiente como para provocar la formación de cadenas o de cúmulos de partículas magnéticas y su aplicación al medio líquido se mantiene durante una duración suficiente como para que el analito se acople o se asocie con los ligandos de las partículas magnéticas, tras lo cual se anula el campo, lo que provoca la separación de las partículas magnéticas cuyos ligandos no han reaccionado con el analito que va a valorarse. Mediante observación directa con microscopio, o preferiblemente mediante medición de un parámetro como la densidad óptica del medio líquido, se puede determinar la presencia del analito en el medio líquido. Asimismo, se puede determinar su concentración mediante medición de la variación de la densidad óptica del medio líquido, entre un instante t_0 que corresponde al comienzo de la aplicación del campo magnético y un instante t_1 que sigue a la anulación del campo magnético al final de la reacción entre el analito y los ligandos.

El valor de la variación de la densidad óptica entre t_0 y t_1 se compara con curvas o con valores de calibración obtenidos con concentraciones conocidas del analito que va a valorarse.

25 Este procedimiento presenta la ventaja de tener un límite de detección más reducido que aquel de los procedimientos clásicos de aglutinación realizados en ausencia de campo magnético.

Los documentos WO 03/054523 A, US 2006/240572 A1 y WO 02/35205 A también dan a conocer procedimientos de valoración de un analito en un medio líquido.

30 La presente invención tiene concretamente como objetivo modificaciones de este procedimiento que permiten reducir todavía más su límite de detección y mejorar su robustez.

35 Propone con este fin un procedimiento de valoración de un analito en un medio líquido, que consiste en disponer en este medio partículas magnéticas funcionalizadas mediante ligandos específicos del analito que va a valorarse, en hacer actuar sobre el medio líquido un campo magnético que permite una unión de las partículas magnéticas y la formación de cúmulos de partículas magnéticas, y en determinar la presencia y la concentración del analito a partir de la variación de un parámetro como por ejemplo la densidad óptica del medio líquido, midiéndose el valor de este parámetro antes de aplicar el campo magnético, caracterizado porque comprende una repetición de ciclos que comprenden una primera fase de aplicación del campo magnético al medio líquido y una segunda fase en la que el campo magnético es nulo, midiéndose el parámetro al comienzo y al final de cada ciclo, siendo la duración de aplicación del campo magnético durante cada ciclo inferior a aquella de la reacción entre el analito que va a valorarse y los ligandos de las partículas magnéticas, consistiendo también el procedimiento en calcular a partir de las medidas anteriormente citadas un valor límite de la variación del parámetro para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético y en deducir a partir de ello la concentración del analito en el medio líquido.

La invención permite, de manera general, mejorar la relación señal/ruido de las mediciones y reducir el límite de detección en un factor al menos igual a 5.

50 El procedimiento según la invención comprende n repeticiones del ciclo de aplicación del campo magnético y de medición del parámetro durante la duración de la reacción entre el analito y los ligandos, estando comprendido n entre 2 y 100, y preferiblemente comprendido entre 5 y 60.

55 La duración total de aplicación del campo magnético durante los n ciclos es inferior o sustancialmente igual a la duración de la reacción entre los ligandos y el analito.

La duración de aplicación del campo magnético durante un ciclo está comprendida entre 1 segundo y 1 minuto y está preferiblemente comprendida entre 10 segundos y 50 segundos.

60 Preferiblemente, se realiza la medición del valor del parámetro anteriormente citado, al final de cada ciclo, durante un retorno al equilibrio en el medio líquido, es decir tras una dispersión al menos parcial de los cúmulos de partículas magnéticas.

65 El número de ciclos n se determina de modo que la duración total de aplicación del campo magnético sea igual a p veces la constante de tiempo de la variación del parámetro medido, siendo esta variación del tipo exponencial.

Preferiblemente, p es igual a 2.

De manera más general, p está comprendido entre 0,5 y 5.

5 Según otra característica de la invención, el procedimiento también consiste en calcular la variación al final de cada ciclo, del parámetro medido para una duración acumulada de aplicación del campo magnético desde el primer ciclo realizado, y en calcular mediante extrapolación un valor límite hacia el cual tiende el valor calculado para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético.

10 Los cálculos de variación del parámetro se realizan ventajosamente en tiempo real al final de cada ciclo.

Como variante, cuando esto sea posible, estos cálculos pueden realizarse tras el final de la reacción entre el analito y los ligandos. Los cálculos de las variaciones del parámetro en las duraciones acumuladas desde el primer ciclo y de la variación del parámetro para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético se acoplan y se tienen en cuenta las variaciones de constantes de tiempo que se deben a la reducción de movilidad del medio líquido en el cálculo de las variaciones del parámetro en las duraciones acumuladas de aplicación del campo magnético.

15 Ventajosamente, este procedimiento también consiste en identificar y en filtrar fenómenos parasitarios que influyen en el parámetro medido. El procedimiento consiste para ello en descomponer matemáticamente la evolución temporal del parámetro medido en una base de funciones que tienen constantes de tiempo representativas de la cinética del sistema y en conservar únicamente las funciones que tengan constantes de tiempo características de la unión específica de los ligandos y del analito que va a valorarse. Este tratamiento permite filtrar las mediciones del parámetro y mejorar la selectividad del procedimiento.

20 La invención se comprenderá mejor, y otras características, detalles y ventajas de la misma se desprenderán de manera más clara, después de la lectura de la siguiente descripción, realizada a modo de ejemplo en referencia a los dibujos adjuntos en los que:

30 - la figura 1 representa esquemáticamente un dispositivo de valoración según la invención;

- la figura 2 es una gráfica que ilustra las principales etapas del procedimiento de valoración según la invención;

35 - la figura 3 es una gráfica que ilustra las principales etapas de una variante del procedimiento de valoración según la invención.

Como ya se ha indicado, este procedimiento es, de manera general, del mismo tipo que el descrito en el documento WO 03/044532 y utiliza partículas coloidales (que tienen unas dimensiones comprendidas preferiblemente entre 100 y 1000 nm) de un material superparamagnético, que pueden organizarse rápidamente en cadenas o en cúmulos de partículas bajo el efecto de un campo magnético y separarse rápidamente al final de la aplicación del campo magnético.

40 Estas partículas se funcionalizan en superficie con ligandos específicos de analitos que van a valorarse, realizándose la funcionalización de las partículas magnéticas mediante ligandos de manera clásica, tal como se describe por ejemplo en el documento WO 03/044532.

45 Se dispone un volumen determinado de una disolución 10 de partículas coloidales magnéticas funcionalizadas con una muestra de analito que va a valorarse en un recipiente 12 adecuado de material de plástico transparente. Se hace actuar un campo magnético con una intensidad de aproximadamente 10 a 40 mT sobre el recipiente 12 por ejemplo disponiéndolo entre dos imanes permanentes o sobre un electroimán 21 o entre dos electroimanes y se mide la densidad óptica del medio 10 líquido utilizando para ello una fuente 14 luminosa como por ejemplo un generador de láser asociado a un componente 16 óptico adecuado para iluminar el recipiente 12 y un fotodetector 18 como por ejemplo un fotodiodo, o un conjunto de fotodetectores, como por ejemplo una cámara CCD o CMOS, cuya salida está conectada a una entrada de medios 20 de tratamiento de la información que controlan la fuente 14 luminosa y los fotodetectores 18 y que aportan en la salida una señal DO de densidad óptica del medio líquido cuya variación en función del tiempo está representada en la gráfica de la figura 2. Los medios 20 también permiten controlar medios de aplicación y de interrupción del campo magnético (por ejemplo el electroimán 21), para sincronizar las mediciones con la presencia del campo magnético en el interior del medio 10 líquido.

50 Según la invención, se aplica el campo magnético de manera cíclica al medio 10 líquido que contiene la muestra que va a valorarse, comprendiendo cada ciclo dos fases y teniendo una duración que es inferior a la duración de reacción entre el analito y los ligandos fijados a las partículas magnéticas. La primera fase se caracteriza por la aplicación del campo magnético (Bon en la figura 2) y tiene una duración que es superior al tiempo de formación de los cúmulos de partículas magnéticas. La segunda fase se caracteriza por un campo magnético nulo (Boff en la figura 2) y tiene una duración que es al menos igual o superior al tiempo de dispersión de los cúmulos de partículas y si es posible de las uniones no específicas entre las partículas y que es inferior a la constante de tiempo de disociación de las uniones específicas entre los ligandos y el analito. La densidad óptica del medio líquido se mide al

comienzo de cada ciclo y al final de cada ciclo. Preferiblemente, la densidad óptica se muestrea durante toda la duración del procedimiento, siendo el periodo de muestreo pequeño en relación a la duración del ciclo y a las constantes de tiempo características del sistema. Está normalmente comprendido entre 10 ms y 1 segundo. La duración de la aplicación del campo magnético en cada ciclo se determina para que estos ciclos puedan repetirse n veces durante la duración de la reacción entre los ligandos y el analito que va a valorarse. Este parámetro n está generalmente comprendido entre 2 y 100, preferiblemente entre 5 y 60, y en la práctica puede ser igual a 20 ó 30 aproximadamente. Por razones de simplificación y de legibilidad de los dibujos, es igual a 4 en las figuras 2 y 3.

La duración de aplicación del campo magnético durante cada ciclo está comprendida de manera general entre un segundo y un minuto y preferiblemente entre 10 segundos y 50 segundos, en función de la duración total de la reacción entre ligandos y analitos.

En la gráfica de la figura 2, la curva C1 representa la variación de la densidad óptica del medio líquido medida en número de órdenes de magnitud de atenuación de la luz, en función del tiempo medido en segundos, en el caso de un medio líquido que contiene una fuerte concentración del analito que va a valorarse, representando la curva C2 la variación de la densidad óptica del mismo medio líquido que contiene una concentración muy pequeña de analito que va a valorarse.

En el tiempo t_0 , la densidad óptica del medio líquido se mide una primera vez en ausencia de campo magnético, después se aplica el campo magnético (fase Bon). La densidad óptica del medio líquido aumenta de manera muy rápida, después se interrumpe el campo magnético en el tiempo t_1 , lo que provoca una disminución muy rápida de la densidad óptica del medio líquido (fase Boff). El intervalo de tiempo t_0-t_1 es en este caso de aproximadamente 20 segundos. La densidad óptica del medio líquido se mide de nuevo en el tiempo t_2 tras un retorno parcial al equilibrio en el medio líquido, siendo el intervalo t_1-t_2 de aproximadamente 20 segundos, después se aplica el campo magnético de nuevo durante una duración de aproximadamente 20 segundos y posteriormente se interrumpe en el instante t_3 , midiéndose la densidad óptica del medio líquido de nuevo en el instante t_4 tras un retorno al equilibrio, y así sucesivamente. Los ciclos de aplicación y de interrupción del campo magnético y de medición de la densidad óptica del medio líquido se repiten hasta que se consigue un avance suficiente de la reacción entre los ligandos y el analito que va a valorarse, pudiendo ser la duración de esta reacción del orden de varios minutos. Las adquisiciones de los valores del parámetro óptico a cada fin de ciclo se ilustran en los puntos P1. Estos puntos permiten calcular mediante interpolación una curva C3 de tipo exponencial y extrapolar un valor límite ΔDO^∞ que es aquel que alcanzaría el parámetro tras un número infinito de ciclos.

Los valores P1 son valores medios de densidad óptica normalmente a lo largo de 5 segundos. Cuando, como en el documento WO 03/044532 anteriormente citado, la densidad óptica se mide una vez antes de aplicar el campo magnético y una vez tras aplicar del campo, la duración total de adquisición de la medida es de aproximadamente 10 segundos. Además, el procedimiento sigue siendo largo ya que hay que esperar a que el medio líquido se estabilice completamente tras la interrupción del campo magnético.

Cuando, según la invención, estas mediciones se repiten 30 veces para la adquisición de los valores P1, el tiempo total de adquisición es de aproximadamente 300 segundos, lo que permite ganar un factor igual a $\sqrt{30}$, es decir de aproximadamente 5 a 6, en la relación señal/ruido del valor ΔDO^∞ . En este caso el ruido es, entre otros, el ruido óptico, que se debe a la agitación de las partículas en el medio líquido, que entran y que salen del volumen de medición y el ruido de la cadena de adquisición de la medida que comprende la fuente 14 luminosa, los fotodetectores 18 y los medios de digitalización y de tratamiento de la señal. Además, la extrapolación del valor límite permite reducir la duración del procedimiento al tiempo que se limita la influencia de las variaciones de las constantes de tiempo debidas por ejemplo a la temperatura.

Esta mejora de la relación señal/ruido permite reducir de manera significativa el límite de detección del procedimiento de valoración.

Puede reducirse adicionalmente este límite de detección utilizando la variante del procedimiento ilustrada en la figura 3. Esta variante tiene en cuenta fenómenos de deriva lenta como la sedimentación, la deriva térmica de los medios de medición y de las uniones no específicas, es decir partículas magnéticas coloidales que se unen de manera temporal sin que haya reacción entre los ligandos que éstas comprenden y el analito que va a valorarse.

Para ello, al final de cada ciclo de aplicación del campo magnético y de medición de la densidad óptica, se calcula mediante extrapolación (por medio de una curva C4) un valor límite P'1 de disminución de la densidad óptica del medio líquido tras una aplicación de campo acumulada desde el comienzo del primer ciclo y tras un retorno al equilibrio del medio líquido. La extrapolación permite optimizar la relación señal/ruido utilizando más mediciones y reducir los tiempos de ciclo.

Tras los n ciclos de aplicación del campo magnético y de medición de la densidad óptica, se calculan mediante extrapolación valores P'1 y mediante filtrado de fenómenos parasitarios una curva C'3 que pasa por los puntos P'1 y un valor límite ΔDO^∞ de la variación de la densidad óptica debida a las uniones específicas, es decir a las reacciones entre los ligandos de las partículas magnéticas y el analito que va a valorarse.

5 El cálculo tiene en cuenta los n valores $P'1$ calculados anteriormente de la variación de la densidad óptica medida, para duraciones acumuladas de aplicación del campo magnético, y se realiza la extrapolación para una duración infinita de aplicación del campo magnético. El filtrado consiste en guardar únicamente en los términos de crecimiento de la variación de densidad óptica aquellos cuyas constantes de tiempo corresponden a las uniones específicas. Esto permite eliminar un determinado número de fenómenos parasitarios que se han identificado durante las operaciones de calibración y cuyas constantes de tiempo no se corresponden con la reacción ligandos/analito que va a valorarse. En particular, las uniones no específicas corresponden a fuerzas de unión más pequeñas y tienen constantes de disociación más rápidas. Las constantes de tiempo de la reacción ligandos/analito que va a valorarse se calibran previamente para optimizar la selectividad.

10 El número de ciclos de aplicación del campo magnético y de medición de la densidad óptica se elige preferiblemente para que la duración total de aplicación del campo magnético sea igual a algunas veces la constante de tiempo de la curva de variación de la densidad óptica debida a las uniones específicas, siendo la duración total de aplicación del campo magnético de manera ideal igual a dos veces esta constante de tiempo.

15 Así pueden realizarse la mayor parte de los cálculos en tiempo real durante la duración de la reacción entre los ligandos y el analito que va a valorarse y se limita el tratamiento posterior al cálculo del valor límite $\Delta DO'_{\infty}$ de la variación de la densidad óptica debida a las uniones específicas.

20 Como variante, y si lo permiten la capacidad de cálculo de los medios 20 de tratamiento y la duración total de la medición, pueden realizarse los cálculos totalmente al final de la reacción de valoración. En este caso, los algoritmos de cálculo de los valores límites $P'1$ de la variación de la densidad óptica medida al final de cada ciclo y de la variación de la densidad óptica $\Delta DO'_{\infty}$ debida a las uniones específicas se acoplan de manera que pueden tenerse en cuenta en el cálculo de los valores $P'1$ las evoluciones de constantes de tiempo que se deben a la reducción de movilidad del medio líquido, pudiendo medirse este fenómeno a partir de la variación de la densidad óptica debida a las uniones específicas.

25 De manera general, la invención es aplicable a la detección de antígenos de cualquier tipo con la ayuda de ligandos específicos naturales o sintéticos de cualquier tipo. Permite reducir el límite de detección de un analito en un factor al menos igual a cinco.

30 Por ejemplo, en el caso de la detección de un fragmento recombinante de toxina botulínica con la ayuda de anticuerpos monoclonales, la invención ha permitido reducir el límite de detección de $2 \cdot 10^{-11}$ a $4 \cdot 10^{-12}$ moles de analito por litro de medio líquido.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de valoración de un analito en un medio líquido, que consiste en disponer en este medio partículas magnéticas funcionalizadas mediante ligandos específicos del analito que va a valorarse, en hacer actuar sobre el medio líquido un campo magnético que permite una unión de las partículas magnéticas y la formación de cúmulos de partículas magnéticas, y en determinar la presencia y la concentración del analito a partir de la variación de un parámetro como por ejemplo la densidad óptica del medio líquido, midiéndose el valor de este parámetro antes de aplicar el campo magnético, caracterizado porque comprende una repetición de ciclos que comprenden una primera fase de aplicación del campo magnético al medio líquido y una segunda fase en la que el campo magnético es nulo, midiéndose el parámetro al comienzo y al final de cada ciclo, siendo la duración de aplicación del campo magnético durante cada ciclo inferior a aquella de la reacción entre el analito que va a valorarse y los ligandos de las partículas magnéticas, consistiendo también el procedimiento en calcular a partir de las medidas anteriormente citadas un valor límite de la variación del parámetro para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético y en deducir a partir de ello la concentración del analito en el medio líquido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende n ciclos de aplicación del campo magnético y de medición del parámetro durante la duración de la reacción entre el analito y los ligandos, estando comprendido n entre 2 y 100.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque n está comprendido entre 5 y 60.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la duración de aplicación del campo magnético durante un ciclo está comprendida entre 1 segundo y 1 minuto.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la duración de aplicación del campo magnético durante un ciclo está comprendida entre 10 segundos y 50 segundos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque consiste en medir el valor del parámetro anteriormente citado al final de cada ciclo, tras un retorno al equilibrio en el medio líquido.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en determinar el número de ciclos n de modo que la duración total de aplicación del campo magnético sea igual a p veces la constante de tiempo de la variación del parámetro medido, siendo esta variación del tipo exponencial.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque p es igual a 2.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en calcular la variación, al final de cada ciclo, del parámetro medido para una duración acumulada de aplicación del campo magnético desde el primer ciclo realizado, y en calcular mediante extrapolación un valor límite hacia el cual tiende el valor calculado para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los cálculos de variación del parámetro se realizan en tiempo real al final de cada ciclo.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque los cálculos de variación del parámetro se realizan tras el final de la reacción entre el analito y los ligandos, porque se acoplan los cálculos de las variaciones del parámetro en las duraciones acumuladas desde el primer ciclo y de la variación del parámetro para un tiempo infinito de aplicación del campo magnético y porque se tienen en cuenta las variaciones de constantes de tiempo debidas a la reducción de movilidad del medio líquido en el cálculo de las variaciones del parámetro en las duraciones acumuladas de aplicación del campo magnético.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque consiste en identificar y en eliminar mediante filtrado fenómenos parasitarios que influyen en el parámetro medido, y, para ello, medir las constantes de tiempo de la reacción de los ligandos y del analito para concentraciones elevadas de analito, descomponer la evolución temporal de los valores medidos en una base de funciones que tienen constantes de tiempo diferentes y conservar únicamente los componentes de los valores medidos que tienen constantes de tiempo que corresponden a aquellas de la reacción ligandos-analito.

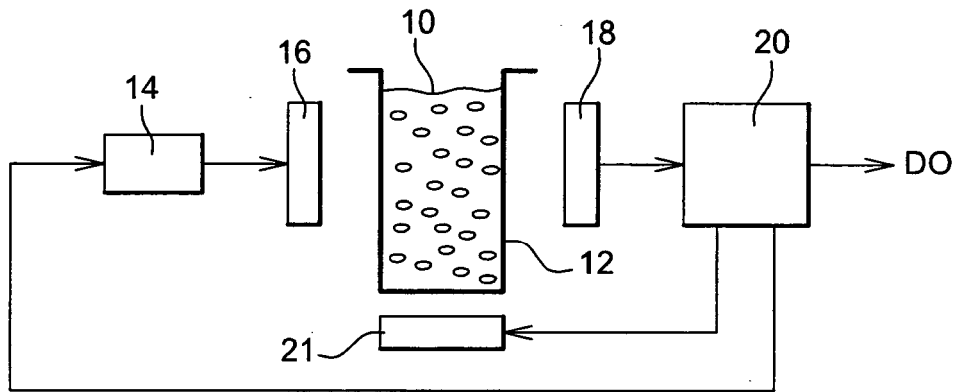


Fig. 1

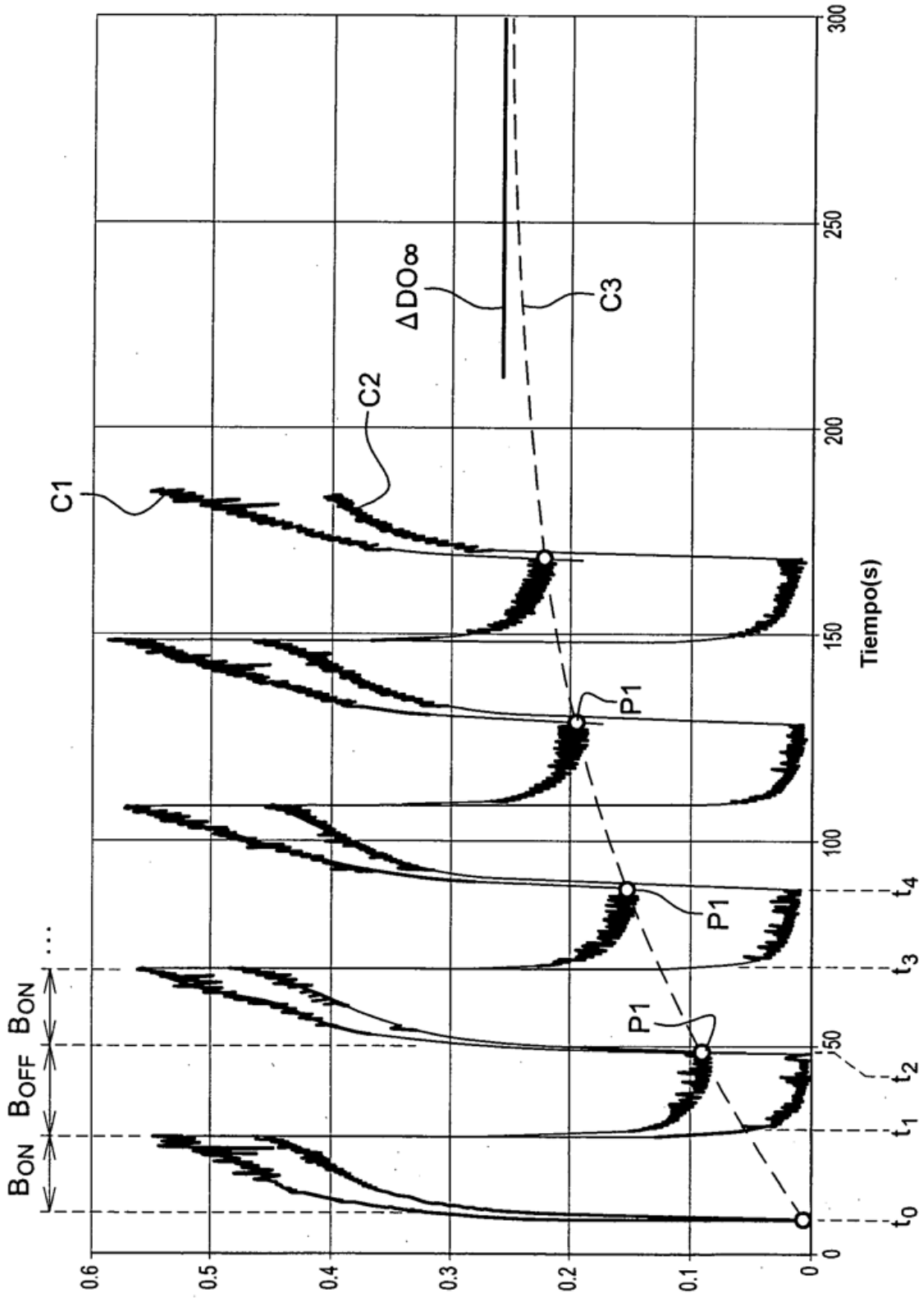


Fig. 2

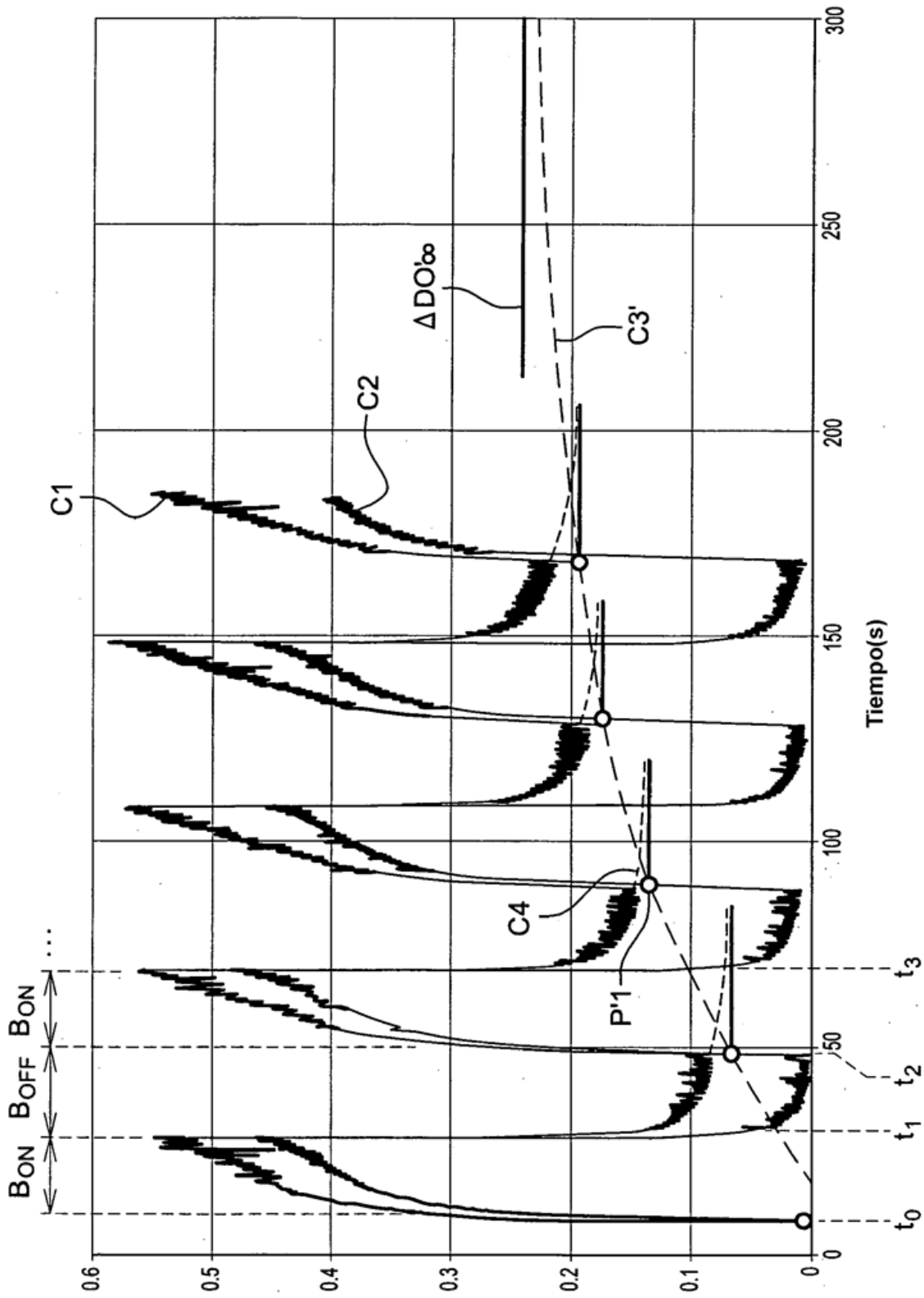


Fig. 3