



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

Concedido al Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19	ES	11	NUMERO	10	AT
		21	481.519		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			13-6-79.		

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31				
	NUMERO				
	26924/78		14-6-78		Gran Bretaña

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	52	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			G01N 21/24		

54	TITULO DE LA INVENCION
	"UN APARATO PARA LA DETERMINACION LUMINISCENTE DE LA CANTIDAD O CONCENTRACION DE UN ANALITO EN UNA MUESTRA"

71	SOLICITANTE (S)	(JX/5605/07)
	UNIVERSITY OF BIRMINGHAM	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
P.O. Box 363, Birmingham B15 2TT, Inglaterra

72	INVENTOR (ES)
	Larry Jan KRICKA, Thomas Patterson WHITEHEAD, Roger Abraham BUNCE, Timothy Joseph Nicholas CARTER y John Hamilton KENNEDY

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE	(P.- 72.231)
	DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ	

1fg

BAD ORIGINAL

1 Ha sido usual, por ejemplo en la investigación
médica y biomédica y en la investigación rutinaria y en el
establecimiento de diagnósticos, medir la concentración en
muestra de varias sustancias, denominadas "analitos" en lo
5 que sigue, haciendo que dichos analitos tomen parte en una
reacción luminiscente con otras sustancias predeterminadas,
seleccionadas de manera que la salida de luminiscencia en
la reacción esté inequívocamente relacionada con la concen-
tración del analito. Se han realizado mediciones más espe-
cialmente en sustancias presentes en fluidos corporales, por
10 ejemplo hormonas, medicamentos y constituyentes de la sangre.

Las publicaciones en las cuales se han descrito
tales mediciones incluyen la Memoria de la patente británi-
ca 1.461.877 de Wellcome Foundation; la Memoria de la paten-
te belga 856.182 de Haierg y "Proceedings of the First In-
15 ternational Symposium on Analytical Applications of Biolu-
minescence and Chemiluminescence", Bruselas 6 a 8 de Septiem-
bre de 1978.

Los métodos anteriores no siempre han demostrado
20 ser adecuados para trabajo rutinario de laboratorio en el
establecimiento de diagnósticos y el presente invento crea
medios para satisfacer adecuadamente las necesidades de tal
trabajo.

De acuerdo con un primer aspecto del invento, un
25 aparato para la determinación luminiscente de la cantidad o
concentración de un analito en una muestra tiene un miembro
que posee una pluralidad de celdas, destinada cada una a con-
tener una muestra y teniendo cada una una ventanilla a tra-
vés de la cual puede salir luz de la celda; una cámara de
ensayo destinada a recibir al menos parte del miembro que

1 contiene una celda; un fotodetector dispuesto para recibir
luz emitida desde una celda dispuesta en un puesto de ensa-
yo en dicha cámara de ensayo y a dar una señal de salida de
pendiente de dicha luz emitida; y medios de transporte des-
5 tinados a mover las celdas sucesivamente hasta el puesto de
ensayo.

De acuerdo con otro aspecto del invento, se crea
un método de determinar la cantidad o concentración de un
analito en una muestra, en el cual se lleva a cabo una reac-
10 ción luminiscente cuya salida de luz depende de dicha canti-
dad o concentración, y la salida de luz se usa para determi-
nar dicha cantidad o concentración, haciéndose reaccionar el
analito de la muestra y una cantidad conocida del mismo ana-
lito etiquetada con una sustancia etiquetadora con un reac-
15 tivo específico para dar un producto de reacción, y pudien-
do determinarse la cantidad o concentración de analito eti-
quetado reaccionado o sin reaccionar, y la sustancia etique-
tadora y, por tanto, el analito etiquetado, midiendo la sa-
lida de luz de una reacción luminiscente en la cual toma par-
20 te la sustancia etiquetadora.

La expresión "reactivo específico" usada en lo
que antecede supone un reactivo elegido para reaccionar con
el analito particular a determinar. Por ejemplo, el analito
puede ser un antígeno, en cuyo caso el reactivo específico
25 podría ser un anticuerpo, o viceversa.

La reacción luminiscente puede ser una quémilumi-
niscente o una reacción bioluminiscente.

El invento será descrito ahora a modo de ejemplo
con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

30 La fig. 1 muestra una vista en planta de un apa-

1 rato de acuerdo con el invento, habiéndose omitido la parte superior del mismo;

la fig. 2 muestra un alzado lateral de las partes mostradas en la fig. 1;

5 la fig. 3 muestra una sección parcial dada por la línea 3-3 de la fig. 1; y

la fig. 4 muestra una sección parcial dada por la línea 4-4 de la fig. 1.

10 El aparato puede usarse en la determinación de la cantidad o concentración de un analito en una muestra líquida. El analito puede ser un antígeno, por ejemplo, una proteína, o puede ser un nucleótido, por ejemplo, dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) o trifosfato de adenosina (ATP) o un sustrato a partir del cual puede producirse uno de ellos. En un caso en que el analito es un antígeno, la muestra y una cantidad conocida de un antígeno etiquetado son hechos reaccionar con un anticuerpo para el antígeno y el producto de esta reacción es separado, por ejemplo por precipitación, del antígeno no reaccionado. El antígeno etiquetado se prepara uniendo a un antígeno que es idéntico al analito una molécula que puede tomar parte en una reacción luminiscente. La molécula etiquetadora puede ser un reactivo luminiscente, por ejemplo luminol, pero con preferencia es un enzima capaz de catalizar una reacción luminiscente. Un ejemplo de tal enzima es la peroxidasa.

25 La solución que queda después de la separación del producto de la reacción del antígeno con el anticuerpo contiene antígeno etiquetado y analito, dependiendo la proporción de la cantidad de analito presente en la muestra original. Tales soluciones obtenidas a partir de diferentes

1 muestras originales se colocan en respectivas celdas del
aparato ilustrado en los dibujos.

El aparato comprende un miembro en forma de bloque
10 de aluminio u otro material buen conductor del calor. El
5 bloque tiene un número de celdas para recibir respectivas
soluciones que han de ensayarse. En el ejemplo particular
ilustrado, cada celda está definida por un elemento comer-
cialmente disponible de material plástico transparente co-
nocido generalmente como cubeta. Las cubetas están alojadas
10 en respectivas cavidades dispuestas en una fila junto a un
margen lateral del bloque 10 y pueden sacarse fácilmente
para limpiarlas, guardarlas o desecharlas, y sustituirse
por otras cubetas. Junto a una pared de la cubeta, el blo-
que está formado con una respectiva abertura 12 a través de
15 la cual puede salir la luz de la celda.

El aparato comprende además una cámara de ensayo
13 que puede recibir todo el bloque 10 en el cual están so-
portadas las cubetas. En un extremo de la cámara 13 hay una
abertura 14 a través de la cual el bloque 10 puede insertar-
20 se en la cámara. En un puesto de prueba, hay en una pared
lateral de la cámara una ventanilla o abertura 15 a través
de la cual la luz emitida por una celda puede salir de la
cámara y entrar en un foto-detector montado junto a una
pared lateral de la cámara y encima de la abertura 15. El
25 foto-detector, con preferencia, es un tubo foto-multiplica-
dor 16. Cerca de la abertura 14 están previstos cierres pa-
ra la luz en la cámara para impedir que la luz entre en la
cámara por entre el bloque 10 y las paredes de la cámara.
También está prevista una trampa de luz entre la abertura
30 15 y los cierres de la abertura 14. La cámara, en general,

1 es estanca a la luz, salvo en cuanto a la abertura 15.

5 Una aleta 17 cargada por muelle está dispuesta para cerrar normalmente la cámara en una posición entre la abertura 14 y la abertura 15 cuando no está el bloque 10 en la cámara. Esta aleta impide que la luz ambiente entre en el tubo foto-multiplicador. Cuando el bloque 10 es insertado en la cámara, la aleta 17 es empujada a una posición inoperante ilustrada en la fig. 2.

10 Estén previstos medios de transporte para mover el bloque 10 a lo largo de la cámara 13 por pasos para orientar las cubetas 11 al puesto de ensayo sucesivamente. Los medios de transporte comprenden un motor eléctrico 18 que acciona un rodillo 19 guarnecido de caucho por medio de una transmisión 20 de correa y polea. El motor y el rodillo están montados en un soporte 21 que puede pivotar alrededor de un eje vertical 22 y es empujado por un muelle 23 para moverse en torno a su pivote en tal dirección que el rodillo 19 sea empujado contra una superficie lateral del bloque 10 cuando el último está presente en la cámara 13. La leva 24 sirve como tope para impedir una acción excesiva de raspado del rodillo 19 sobre el bloque 10 cuando se extrae o inserta este último.

20 En una posición predeterminada con relación a cada cubeta 11 está formada en el bloque 10 una respectiva ánima transversal 26. Para percibir la llegada de cada cubeta al puesto de ensayo, está prevista en la cámara 13 a un lado del bloque 10 una fuente 27 de luz infra-roja y en el lado opuesto del bloque un foto-transistor 28. Cuando una cubeta está situada en el puesto de ensayo, en alineación con la abertura 15, el manantial de luz infra-roja y

1 el foto-transistor están alineados con una correspondiente
de las ánimas 26. El motor 18 es un servo-motor de c.c. ca-
paz de situar el bloque 10 con una cubeta exactamente en el
puesto de ensayo.

5 Para entregar un reactivo luminiscente a cada cel-
da se dispone un inyector de reactivo que comprende un tu-
bo 29 (fig. 4) que está conectado a una pipeta automática
de entrega (no mostrada) y montado para movimiento de vai-
vén a lo largo de una trayectoria vertical que se extiende
10 hacia arriba desde el puesto de ensayo. El tubo está asegu-
rado al pistón de una unidad neumática 30 de pistón y cilin-
dro que puede bajar el tubo desde la posición de reposo in-
dicada con línea llena en la fig. 4 a la posición de inyec-
ción indicada por línea de puntos y trazos en la fig. 4 y
15 subir luego el tubo a su posición de reposo, en la que está
por completo por encima del nivel de las cubetas 11 y el
bloque 10. Cuando está en su posición de inyección, se ex-
tiende hasta dentro de una cubeta en el puesto de ensayo has-
ta cerca del fondo de la celda definida por ella.

20 Es suministrado aire a la unidad 30 de pistón y
cilindro a través de una válvula operada eléctricamente (no
representada) que está conectada en un circuito eléctrico de
medios de control 32 y que en sí son de tipo usual. El fo-
to-transistor 28 y el motor 18 están también conectados en
25 circuito de los medios de control. Los medios de control 32
pueden ajustarse para establecer un ciclo predeterminado de
tiempo que puede variar desde un segundo a diez minutos. Los
medios de control proporcionan una indicación visual de la
posición del bloque 10 para identificar la celda particular
que está alineada con el tubo foto-multiplicador.

1 En un caso en que cada solución a ensayar contie-
ne un antígeno etiquetado por el enzima peroxidasa u otro
enzima adecuado, se introduce una cantidad conocida de so-
lución, junto con un primer reactivo luminiscente y, posi-
5 blemente, un diluyente, en una de las cubetas 11 mientras
el bloque 10 está retirado de la cámara 13. Las soluciones
derivadas de otras muestras pueden introducirse de modo aná-
logo en las otras cubetas. El bloque es entonces vibrado pa-
ra mezclar a fondo las soluciones y éstas son llevadas a una
10 temperatura predeterminada por medios de regulación de la
temperatura empotrados en el bloque 10. Los medios de regu-
lación de la temperatura pueden comprender, por ejemplo, un
elemento calentador, un tubo de circulación para fluido frío
o caliente, o un elemento enfriador o calentador eléctrico
15 de Peltier; todos ellos controlables por un termostato. El
bloque es llevado entonces a la cámara 13 e insertado en la
cámara hasta que se aplique al rodillo 19. Los medios de con-
trol del aparato son activados entonces para provocar el fun-
cionamiento cíclico del aparato para ensayar la solución con-
20 tenida dentro de cada celda por turno. Cuando una celda ha
sido movida al puesto de ensayo, el tubo 29 es bajado dentro
de esa celda y es inyectado un volumen predeterminado de un
segundo reactivo luminiscente a tal velocidad que ocurra rá-
pidamente la mezcla de los líquidos dentro de la celda. Es-
25 to permite que tenga lugar la reacción luminiscente y que
seca emitida luz desde la celda a través de la ventanilla
constituída por la pared transparente de la cubeta y la aber-
tura 12. El tubo foto-multiplicador 16 proporciona una se-
ñal de salida que depende de la luz emitida por la celda.
30 Después de que ha transcurrido un intervalo de tiempo pre-

1 determinado, el tubo 29 es subido a su posición de reposo,
y la celda siguiente es avanzada al puesto de ensayo.

5 En el caso en que el primer reactivo sea peróxido de hidrógeno, el segundo reactivo luminiscente puede ser luminol. La concentración del enzima en cada celda depende de la cantidad de analito en la muestra que corresponde a esa celda. Las variaciones en la cantidad de analito en las diferentes muestras dan como resultado variaciones correspondientes en la rapidez con la cual ocurre la reacción luminiscente dentro de las diferentes celdas y esto da como resultado diferentes regímenes de salida de luz de las celdas.

10 Aunque sería posible usar uno de los reactivos luminiscentes como etiqueta en el antígeno, preferimos usar el enzima como etiqueta. Como la cantidad de enzima presente no disminuye a medida que prosigue la reacción luminiscente, se obtiene una salida relativamente constante del foto-multiplicador, después de un paso inicial durante el cual la salida aumenta rápidamente. Además, la presencia de una proteína en el enzima no inhibe usualmente la acción catalítica del enzima; al paso que la presencia de una proteína en el luminol da como resultado un impedimento estérico o inactivación que reduce el régimen de la reacción luminiscente y, por tanto, la sensibilidad del procedimiento para las variaciones en la cantidad de analito presente en la muestra inicial.

20 La salida del tubo foto-multiplicador 16 puede representarse gráficamente mediante un registrador de gráficas, integrada sobre el período durante el cual está siendo percibida la luz emitida desde la celda por el tubo 6 o so-

1 bre una parte seleccionada de dicho período, o tratada de
cualquier otro modo.

5 El aparato puede usarse en la determinación de la
concentración del ATP en una muestra. El ATP reacciona con
luciferina luminosa en presencia del enzima luciferasa lu-
minosa para producir monofosfato de adenosina ATP. Es emi-
tida luz cuando ocurre esta reacción. Un volumen predeter-
minado de la muestra que contiene ATP y una solución de lu-
ciferasa luminosa son colocados en una cubeta 11 y mezclados
10 por agitación, ajustándose la temperatura de la solución a
un valor predeterminado. La cubeta, soportada en el bloque
10, es llevada entonces al puesto de ensayo donde se inyec-
ta un volumen predeterminado de una solución de luciferina
luminosa en la solución a través del tubo 29 de tal modo que
15 las soluciones se mezclen rápidamente. La luz emitida duran-
te la reacción es percibida por el tubo foto-multiplicador
16, cuya salida se usa para determinar la concentración de
ATP en la muestra. Un procedimiento adecuadamente modifica-
do puede usarse para determinar la concentración en una
20 muestra de un sustrato desde el cual puede producirse ATP.

El aparato puede usarse también en el análisis de
una muestra sólida, colocándose tal muestra en una cubeta y
añadiéndose desde el tubo 29 un reactivo que favorezca una
reacción luminiscente de la muestra.

25 Un dispositivo electrónico de estado sólido o
una película puede usarse como foto-detector en lugar del
tubo foto-multiplicador.

En general, preferimos etiquetar el antígeno, el
anticuerpo o una proteína conjuntiva específica con un en-
zima capaz de catalizar una reacción luminiscente. Alterna-

1, 5 10
tivamente, la etiqueta podría ser un reactivo que participa-
se en una reacción luminiscente o un precursor de tal reac-
tivo o un catalizador de una reacción luminiscente. Por ejem-
plo, un antígeno podría etiquetarse con un aldehído alifático
co (por ejemplo, tetradecilaldehído, dodecilaldehído) a tra-
vés de una reacción fotoquímica del aldehído con 4-fluoro-
-3 nitrofenil azida y reacción nucleófila subsiguiente del
producto de reacción con el antígeno. El antígeno etiquetado
podría determinarse luego por medio de una reacción biolumi-
niscente en la que interviene luciferasa bacteriana/ATP re-
ductasa.

15 20 25
Para mantener la uniformidad de la temperatura en-
tre el contenido de las diferentes celdas de la cubeta 11
ha resultado ser ventajoso el siguiente modo de trabajo del
aparato. El bloque 10 es insertado a través de la abertura
14 para que se aplique contra el rodillo 19, gracias al cual
es movido total e ininterrumpidamente a la cámara de ensayo
13 hasta que acciona un interruptor límite 31 que forma par-
te de los medios de control 32 del aparato. El funcionamien-
to de este interruptor invierte el motor 18 para sacar al
bloque 10 fuera de la cámara de ensayo, después del mencio-
nado funcionamiento cíclico para ensayar las muestras de ca-
da cubeta 11 por turno. De este modo, las muestras pueden
resultar afectadas por la temperatura ambiente sólo después
de que han sido ensayadas.

En esta Memoria, el término "luz" implica radia-
ción electromagnética, no sólo de longitud de onda óptica,
sino también infra-roja y ultra-violeta; y puede extenderse
desde longitudes de onda de radio a las de rayos X.

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un aparato para la determinación luminiscente de la cantidad o concentración de un analito en una muestra, caracterizado por tener un miembro que incluye una pluralidad de celdas destinada cada una a contener una muestra y teniendo cada una una ventanilla a través de la cual puede salir luz de la celda; una cámara de ensayo destinada a recibir el miembro que contiene al menos una celda; un fotodetector dispuesto para recibir luz emitida desde una celda dispuesta en un puesto de ensayo en dicha cámara de ensayo y para dar una señal de salida dependiente de dicha luz emitida; y medios de transporte destinados a mover las celdas sucesivamente al puesto de ensayo.

15

20

2ª.- Un aparato según la reivindicación 1ª, caracterizado porque cada celda tiene una parte de pared transparente que forma la ventanilla de la celda.

25

3ª.- Un aparato según la reivindicación 1ª o la 2ª, caracterizado porque cada celda está definida por un elemento que es desmontable de dicho miembro para limpiarlo, almacenarlo o tirarlo.

30

4ª.- Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque los medios de

1 transporte incluyen un motor eléctrico que acciona al miembro a través de una correa y una polea, y un rodillo guardado de caucho que se apoya sobre el miembro.

5 5ª.- Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la temperatura del contenido de las celdas del miembro puede regularse por unos medios reguladores de la temperatura empotrados en dicho miembro.

10 6ª.- Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por tener medios de exclusión de la luz que impiden que la luz ambiente entre en la cámara de ensayo a través de cualquier abertura de la misma.

15 7ª.- Un aparato según la reivindicación 6ª, caracterizado porque dichos medios de exclusión de la luz incluyen una aleta cargada por muelle que coopera con el miembro cuando dicho miembro esté al menos en parte en la cámara de ensayo.

20 8ª.- Un aparato según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por medios de entrega para entregar una cantidad predeterminada de reactivo dentro de una celda en dicho puesto de ensayo.

25 9ª.- Un aparato según la reivindicación 8ª, caracterizado porque los medios de entrega incluyen un reactor de reactivo dispuesto para moverse en vaivén dentro y fuera de una celda, y para entregar reactivo a dicha celda, en esencia en el fondo de la misma.

30 10ª.- Un aparato según la reivindicación 8ª o la 9ª, caracterizado por tener medios de control ajustables para controlar a los medios de transporte y a los medios de

1 entrega para establecer el funcionamiento cíclico en que
un ciclo comprende mover una celda al puesto de ensayo, en-
tregar reactivo a la celda, detectar la salida de luz de
esa celda, durante un período predeterminado, y mover, fi-
5 nalmente, la celda apartándola del puesto de ensayo.

11ª.- Un aparato según la reivindicación 10ª,
caracterizado porque los medios de control son accionados
desde medios fotosensibles que se iluminan desde una fuen-
te de luz infra-roja a través de una ánima del miembro
10 cuando cualquier celda está en el puesto de ensayo.

12ª.- Un aparato según la reivindicación 10ª,
o la 11ª, caracterizado porque los medios de control están
dispuestos para mover primero el miembro por completo e
ininterrumpidamente hacia dentro de la cámara de ensayo y
15 para mover luego el miembro hacia fuera de la cámara de
ensayo de acuerdo con dicho funcionamiento cíclico.

13ª.- Un aparato para la determinación luminis-
cente de la cantidad o concentración de un analito en una
muestra.

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-
tecede, representado en los dibujos que se acompañan y con
los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de trece hojas escritas a
máquina por una sola cara.

25

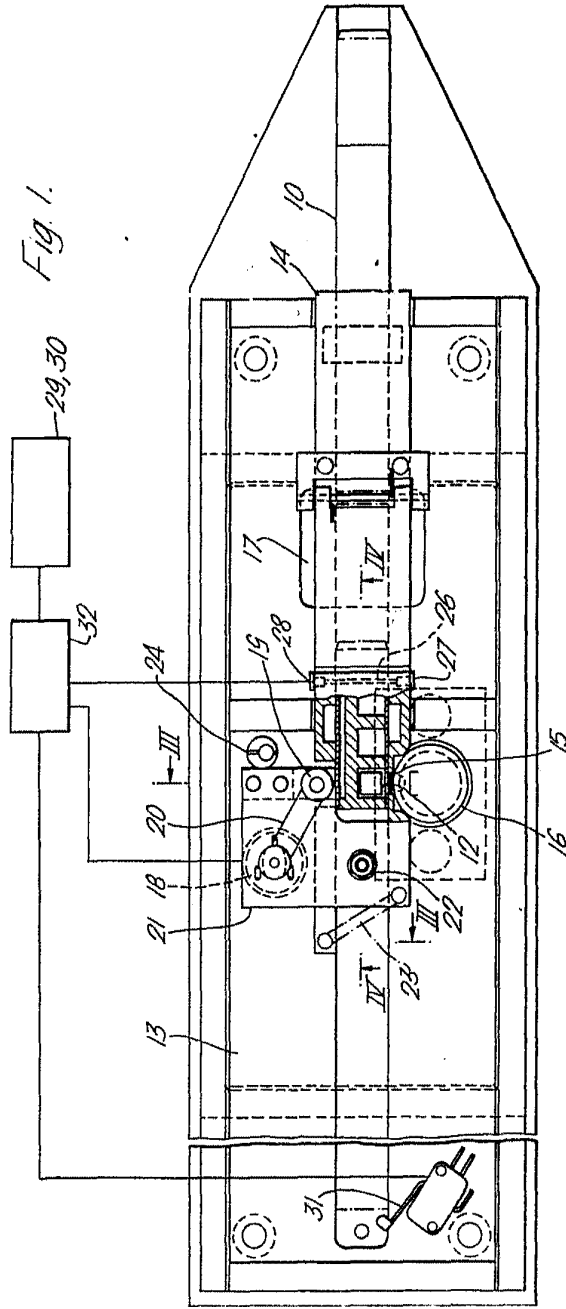
Madrid, 17. MAR 1990

P.A.

Oscar de Elizaburu
Por Poder.

30

Fig. 1.



Oscar de Elaburu
For Patent

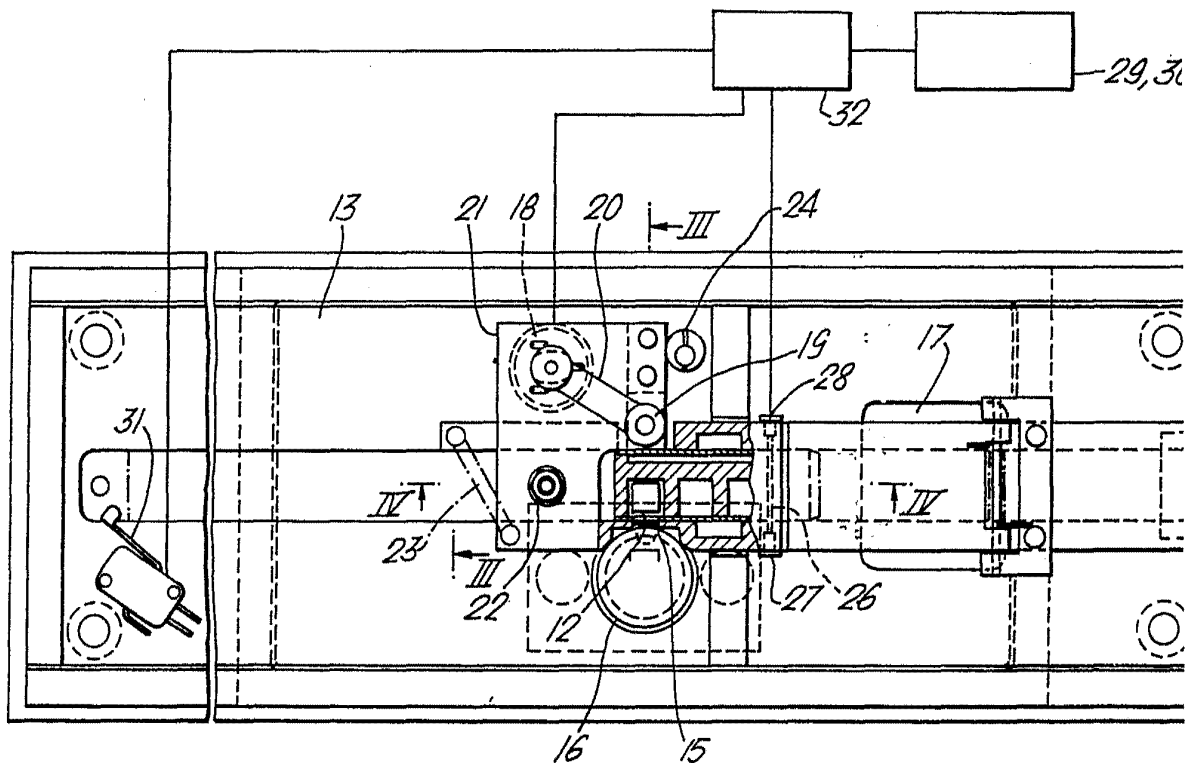
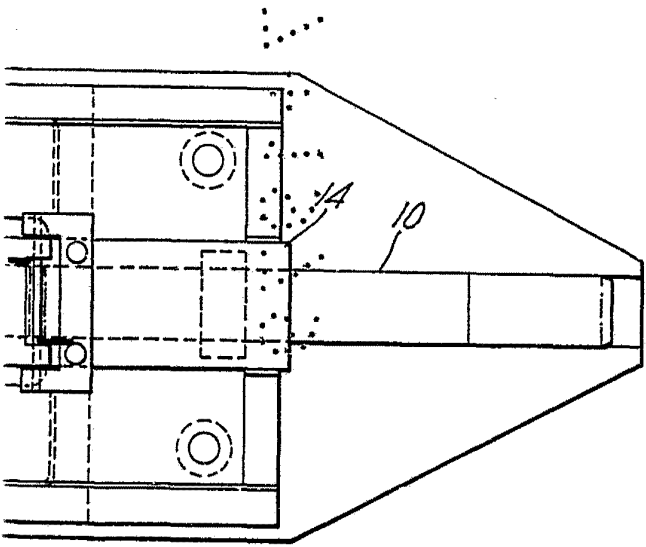
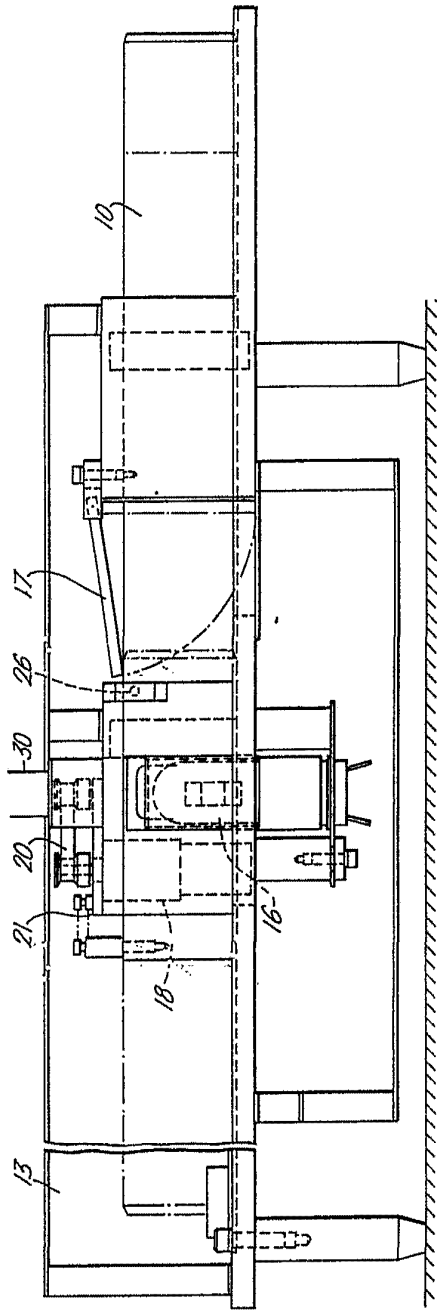


Fig. 1.

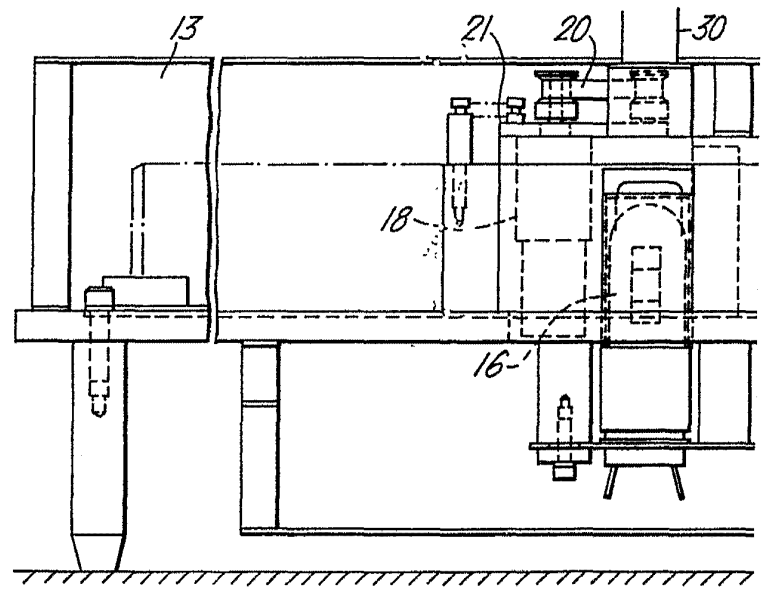


Oscar de Elabura
Por Poder.

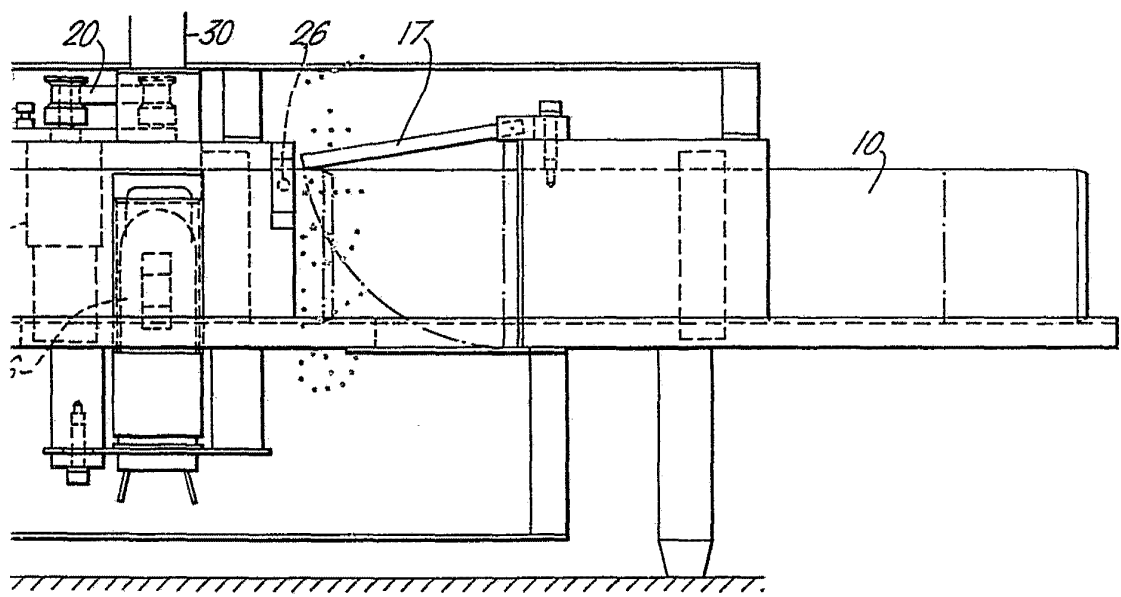
Fig. 2.



Oscar de Elizabeth
Per Page.

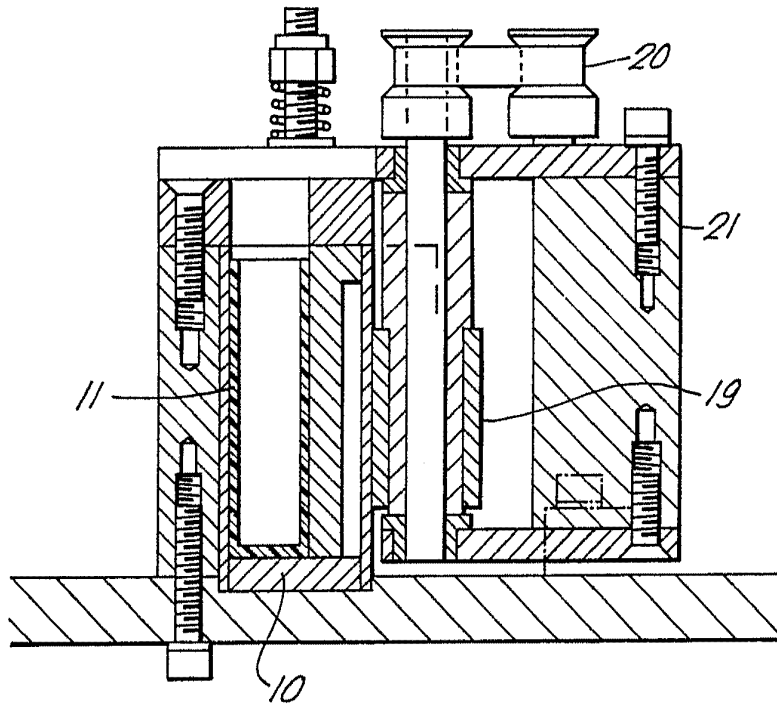


.....
Fig. 2.



Oscar de Elzaburu
Per Foder.

Fig. 3.



Oscar de Elzaburu
Por Poder

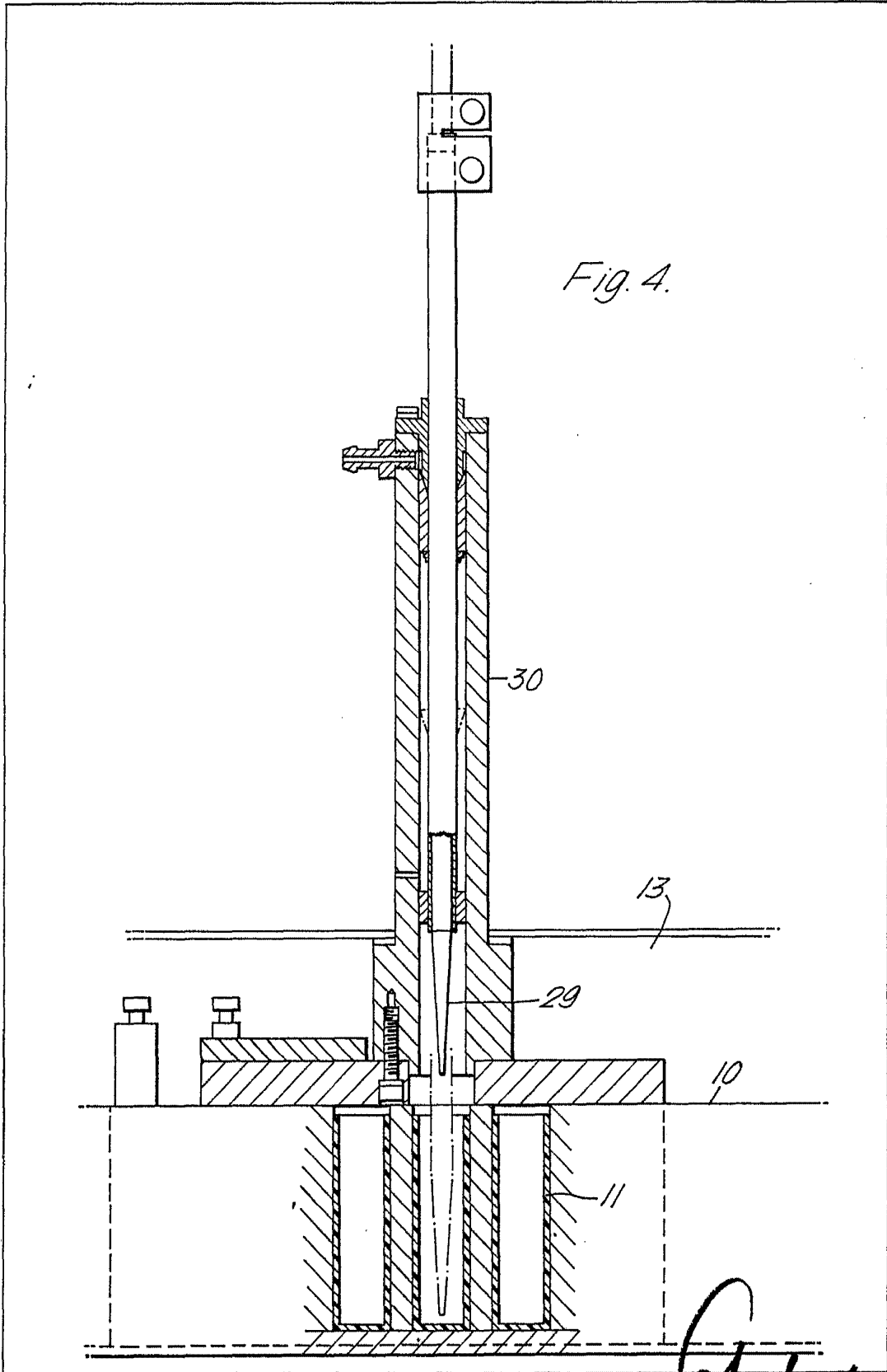


Fig. 4.

Oscar d'Elzaburo
For Feder.