



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 139 514**

② Número de solicitud: 009701805

⑤ Int. Cl.⁷: G01N 33/553

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **18.08.1997**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2000**

Fecha de concesión: **03.10.2000**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
03.07.2000

④ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2000**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.12.2000

⑦ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**
Pza. del Riego, 4 (edif. Histórico)
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑦ Inventor/es: **Costa García, Agustín;**
Fernández Abedul, M^a Teresa y
Concheso Suárez, Rosa Isabel

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Sistema de inyección en flujo que combina un reactor inmunológico y un detector electroquímico para su utilización en inmunoensayos enzimáticos.**

⑤ Resumen:

Sistema de inyección en flujo que combina un reactor inmunológico y un detector electroquímico para su utilización en inmunoensayos enzimáticos.

El sistema de la invención comprende una válvula de tres vías situada de forma previa al reactor y una válvula de cuatro vías intercalada entre el reactor inmunológico y el detector electroquímico.

ES 2 139 514 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Sistema de inyección en flujo que combina un reactor inmunológico y un detector electroquímico para su utilización en inmunoensayos enzimáticos.

Antecedentes

La detección electroquímica ha sido aplicada con frecuencia en inmunoanálisis debido a sus características de sensibilidad, sencillez y bajo coste. Dentro de ésta, la detección amperométrica ha sido empleada en inmunoensayos enzimáticos donde la intensidad de corriente producida al oxidarse el producto de la hidrólisis enzimática sobre un electrodo mantenidom a un potencial constante constituye la señal analítica (Kaneki N. et al. Anal. Chim. Acta, 1994, 284:253258; Blonder R. et al. Anal. Chem., 1996, 68:3151-3157).

La detección amperométrica combinada con el análisis por inyección en flujo (Wang J. et al. Anal. Chim. Acta, 1995, 300:127-132; Lu B. et al. Anal. Chim. Acta, 1997, 340:175-180) ha experimentado un gran auge debido a la rapidez, automatización y versatilidad que confiere este último al método analítico. Gran atención está recibiendo el diseño de nuevos detectores electroquímicos para celdas de flujo de pequeño tamaño y fácil manejo, ya que es importante la obtención de medidas rápidas y sensibles sin el uso de dispositivos técnicamente sofisticados (Luque de Castro M. D., Electroanalysis, 1992, 4:601-613; Stulik K., Anal. Chim. Acta, 1993, 273:435-441).

Estos procesos electródicos pueden tener lugar sobre distintos materiales, tanto metálicos, como no metálicos. El empleo de electrodos sólidos como electrodos de trabajo permite realizar cuantificaciones sensibles y selectivas de diversas especies (Adams R.N., "Electrochemistry at Solid Electrodes", 1969, Marcel Dekker, New York). El inconveniente de limpieza de estos electrodos ha sido subsanado empleando diferentes técnicas y existen determinaciones analíticas con resultados reproducibles y comparables a los obtenidos por otros métodos (Bishop E., Hussein W., Analyst, 1984, 109:229-234; Fernández-Abedul M.T., Costa-García A., Anal. Chim. Acta, 1996, 328:6771).

El oro es un material de gran estabilidad, ampliamente utilizado en electroanálisis y que además presenta una gran facilidad para la adsorción de proteínas (Ebersole R.C. et al. J. of Am. Chem. Soc., 1990, 112:3239-3241; Prime K., Whitesides G.M., Science, 1991, 252:1164-1167; Göpel W. et al. Enzyme Microb. Technol., 1992, 14:230-235), ventaja importante a la hora de diseñar inmunoensayos. Especial interés tienen dentro de los electrodos metálicos los de láminas de espesor muy pequeño (Wehmeyer K.R. et al. Anal. Chem., 1985, 57:19131916), utilizados para la posterior fabricación de arrays de ultramicroelectrodos (Heineman W.R. et al. Electroanalysis, 1991, 3:163-168), conjunto de ultramicroelectrodos, los cuales se unen todos bien de forma continua o de forma alterna, en un extremo o en los dos extremos.

Cuando la reacción inmunológica tiene lugar dentro del sistema de flujo es necesaria la in-

roducción de un reactor. En el caso de que el reactor y detector sean dispositivos independientes (Uditha de Alwis W., Wilson G.S., Anal. Chem., 1987, 57:2754; Stiene M., Bilitewski U., Analyst, 1997, 112:155-159; Palmer D.A. et al. Anal. Lett., 1993, 26:1425-1439), es importante el diseño de dispositivos sencillos y eficientes donde se inmoviliza el material necesario para la realización de inmunoensayos.

Hasta la fecha no se conoce ningún sistema de flujo que incorpore un reactor inmunológico y un detector electroquímico de lámina de oro para el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos. Las láminas de oro son fabricadas mediante la técnica de "sputtering", técnica de recubrimiento por vaporización térmica a bajo vacío, y tienen una larga duración, si bien su bajo coste no impide el uso de láminas de oro diferentes.

El reactor inmunológico puede sustituir a las convencionales placas ELISA mejorando reproducibilidad, rapidez y costo con parecidas características de universalidad, y el detector electroquímico se puede adecuar a las necesidades del reactor a través de las válvulas de unión y de los sustratos enzimáticos más convenientes.

El sistema objeto de la invención automatiza inmunoensayos enzimáticos de modo que el reactor inmunológico y el detector electroquímico son dispositivos independientes. Presenta, además, las siguientes ventajas:

- Las láminas de oro son de fabricación sencilla, rápida y barata.
- Al tratarse el reactor inmunológico de una celda de capa fina pueden realizarse inmunoensayos en continuo, ya que el pequeño espesor del mismo favorece la cinética de las reacciones disminuyendo el tiempo de análisis.
- Pueden realizarse las diferentes etapas del inmunoensayo con distintos tiempos de reacción, ya que gracias al uso de las dos válvulas puede producirse una parada de flujo de modo que coincida con el paso de la muestra inyectada en un sistema de flujo de muestra por el reactor.
- Es un dispositivo fácilmente miniaturizable, ya que detector y reactor están incluidos en bloques de metacrilato, y el resto son válvulas y tubos de conexión.
- La instrumentación necesaria para la utilización del sistema es barata.
- El sistema de flujo puede adaptarse a otro tipo de reactores y detectores.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un sistema de flujo para su utilización en inmunoensayos enzimáticos, cuyo esquema general aparece recogido en la Figura 1. El sistema de la invención comprende una bomba peristáltica monocanal (1) que bombea el portador. El inyector (2) es una válvula rotatoria hexagonal. Una válvula de 3 vías (3) es colocada de manera previa al reactor y entre los dos componentes básicos del sistema,

el reactor inmunoquímico (4) y el detector electroquímico (6) se intercala una válvula de 4 vías (5). Como registro se emplea un ordenador personal que además facilita el almacenamiento y tratamiento de los datos.

En este sistema es clave la presencia de las válvulas de 3 y 4 vías. En el caso de la válvula de 3 vías (3) su utilización permite que el flujo no pase por el reactor, sino que vaya directamente al detector, lo que es importante en dos casos concretos. En primer lugar, se ha comprobado que el paso de una disolución de H_2SO_4 0.1M a través del detector durante 10 minutos antes y después del trabajo diario asegura el buen funcionamiento del mismo. Esta disolución ácida no puede pasar por el reactor ya que produciría la desnaturalización del material proteico adsorbido; lo que hace necesario su desvío por otro canal hacia el detector.

En segundo lugar, es siempre importante desde el punto de vista analítico registra la señal que produce el analito o en este caso el sustrato o cualquier disolución inyectada sin pasar por el reactor, desviándose directamente al detector. De la misma forma, el empleo de una válvula de 4 vías (5) intercalada entre el reactor y el detector permite la realización de distintos tratamientos en el reactor sin que esto influya en el detector. Los productos de las distintas etapas de un inmunoensayo analítico - incubación con antígeno/anticuerpo, lavado, etc. - que provocarían el envenenamiento del detector, van directamente al deshecho, de modo que por el detector sólo pasa la disolución con la sustancia que genera la señal analítica.

El uso de estas dos válvulas permite además la parada del flujo en el espacio entre válvulas, desviando el mismo hacia el detector por el canal auxiliar, de modo que haciendo coincidir la parada de la muestra inyectada en el reactor se pueden registrar las señales con distintos tiempos de reacción.

El tratamiento independiente de reactor y detector supone, por lo tanto, una ventaja a la hora de optimizar ambos para el buen desarrollo de inmunoensayos.

A continuación se describen los componentes básicos del sistema.

El detector, cuyo esquema se muestra en la Figura 2, consiste en una lámina de oro de 100 nm de espesor (9) depositada mediante la técnica de sputtering sobre un soporte de kaptón. El kaptón es un material de tipo plástico de color ámbar con buenas características de resistencia, ductilidad, etc. Un cable conductor (10) fijado mediante una resina epoxy de plata (11) hace de conexión con el potencióstato. El electrodo de trabajo se incluye junto con un separador (8) que delimita la superficie del electrodo entre los 2 bloques de metacrilato (7 y 12) de una celda de flujo de fabricación propia. A la salida de la misma se encuentran los electrodos de referencia y auxiliar, permitiendo este último el paso de la disolución al deshecho.

El diseño del reactor es análogo al del detector: una lámina de oro de 100 nm de espesor sobre un soporte de kaptón sobre el cual se inmovilizan los anticuerpos. Esta lámina se incluye junto con

el separador en dos bloques de metacrilato con orificios para la entrada y salida del flujo. Este diseño permite también la inclusión tanto en el detector, como en el reactor de un separador adicional para limitar el área de reacción o detección en función de las necesidades del método. Para la inmovilización de anticuerpos sobre la lámina de oro se puede emplear una adsorción pasiva, una inmovilización a través de monocapas de tioles funcionalizados, enlaces covalentes a través de reactivos bifuncionales, etc.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Experimentos realizados, empleando un reactor de lámina de oro de 100 nm de espesor inmovilizando anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina mediante el procedimiento seguido por Duan y Meyerhoff (Anal. Chem., 1994, 66:1369-1377) y como sustrato *p-aminofenilfosfato* (PAPP) sintetizado siguiendo el procedimiento de Heineman y col. (Anal. Biochem., 1991, 192:90), mostraron el buen funcionamiento del sistema. El paso a través del reactor con una velocidad de flujo de 2 mL/min de una disolución de PAPP 4 mM produce un aumento en la señal indicando que en la lámina del reactor hay adsorbidos anticuerpos con fosfatasa alcalina. Ésta produce la hidrólisis a *p-aminofenol* que se oxida sobre la lámina de oro del detector mantenida a un potencial de 300 mV. Si bien no hay parada de flujo, éste pasade manera continua a través del reactor. La reacción enzimática sucede quizás favorecida por la gran relación área/volumen del mismo ya que se trata de una celda de capa fina y por lo tanto su espesor es muy pequeño. Señales sucesivas correspondientes a señales de *p-aminofenol* (PAP) cuando la muestra inyectada en un sistema de flujo de PAPP se ha mantenido durante 1, 5, 10, 15 ó 20 minutos en el reactor, muestran un aumento alcanzando una meseta a tiempos de reacción largos. La señal obtenida con el paso continuo del flujo a través del reactor puede ser controlada, con lo que disminuyen los tiempos de análisis y, en caso de necesitar una mayor sensibilidad, se efectúa registro de señales con parada de flujo.

La desviación estándar relativa para 10 medidas sucesivas obtenidas inyectando una disolución 2 mM de PAPP parando el flujo un minuto, es decir, que el tiempo de reacción enzimática es de un minuto, es de un 4.4%.

Ejemplo 2

Experimentos semejantes realizados con otro sustrato (naftilfosfato) manteniendo el electrodo a un potencial de 500 mV que es donde aparece la meseta de la curva hidrodinámica del naftol, muestran resultados semejantes. Al igual que en el caso del PAPP, también se produce un aumento paulatino hasta alcanzar una meseta a tiempos largos. En este caso, la desviación estándar relativa para 9 medidas realizadas parando el flujo durante 2,5 minutos es del 5%. La instrumentación básica necesaria para la presente invención consiste en una bomba peristáltica, una válvula de inyección y un potencióstato acoplado a un registrador o a un ordenador personal que permita el mejor almacenamiento y tratamiento de los datos.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de inyección en flujo que combina un reactor inmunológico y un detector electroquímico, para su utilización en ensayos enzimáticos, **caracterizado** porque utiliza un reactor consistente en una celda de flujo que incluye una lámina delgada de oro depositada sobre Kaptón.

2. Sistema de inyección en flujo, según la reivindicación anterior, **caracterizado** por la utilización de enzimas como marcas para el seguimiento de la reacción de reconocimiento biológico.

3. Sistema de inyección en flujo, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la utilización de marcas no enzimáticas.

4. Sistema de inyección en flujo, según la reivindicación 1, que utiliza un reactor que incluya

láminas delgadas conductoras, semiconductoras o aislantes depositadas sobre materiales aislantes o conductores.

5. Sistema de inyección en flujo, según las reivindicaciones anteriores, cuyo reactor tiene adsorbida sobre la lámina delgada una parte proteica necesaria para las interacciones bioquímicas.

6. Sistema de inyección en flujo, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la utilización de dos válvulas, una entre inyector y reactor y otra entre reactor y detector.

7. Sistema de inyección en flujo, según las reivindicaciones anteriores, que utiliza un reactor en el que tienen lugar reacciones de reconocimiento biológico y reacciones catalíticas, y un detector donde se verifica el seguimiento de las citadas reacciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

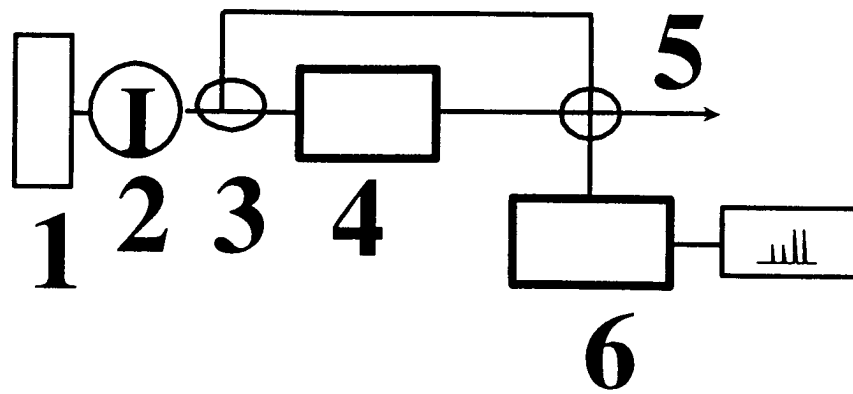


FIGURA 1

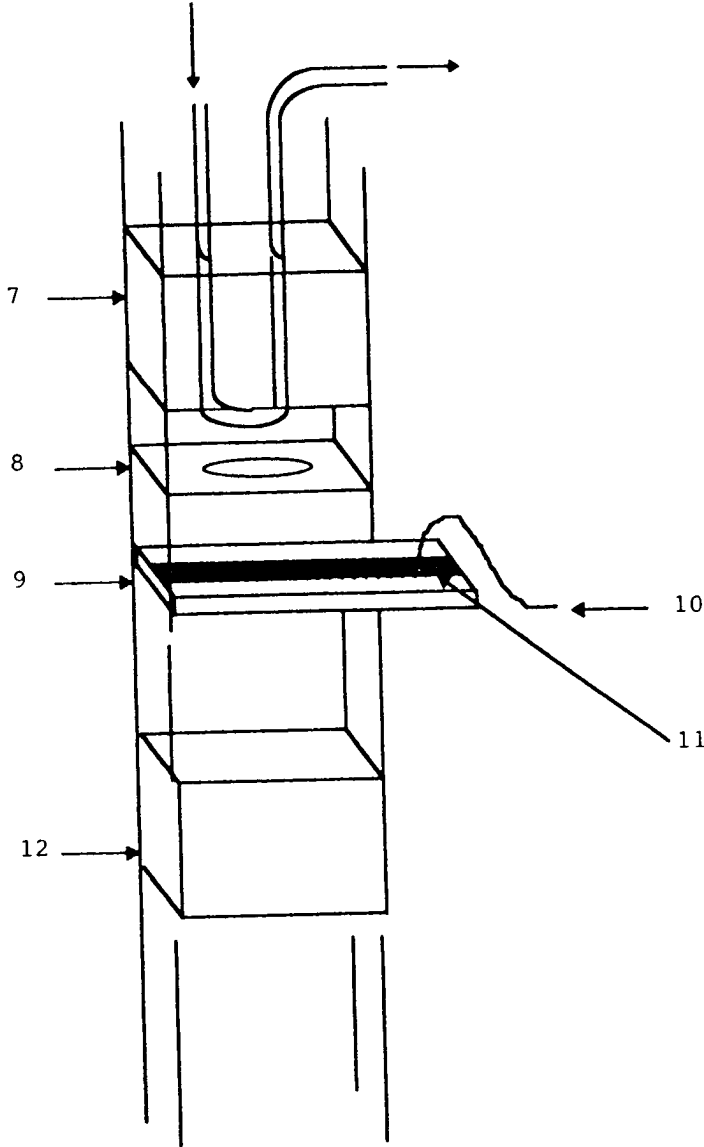


FIGURA 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/553

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LEE, I.H. et al.: "Rapid flow-injection sandwich-type immunoassays of proteins using an immobilized antibody reactor and adenosine deaminase-antibody conjugates", 1990, Analytica Chimica Acta, 229, páginas 47-55, todo el documento.	1,2,8
X	DE ALWIS W.U. et al.: "Rapid sub-picomole electrochemical enzyme immunoassay for immunoglobulin G", 1985, Anal. Chem., 57, páginas 2754-2756, todo el documento.	1,2,8
A	FAVARO, G. et al.: "Liquid chromatographic determination of non-volatile nitrosamines by post-column redox reactions and voltammetric detection at solid electrodes. Study of a flow reactor system based on Ce (IV) reagent", 1993, Analytica Chimica Acta, 273, páginas 457-467, todo el documento.	4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

23.12.1999

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1