

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 008**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2018** **PCT/JP2018/036777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2019** **WO19069885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2018** **E 18864747 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023** **EP 3657169**

54 Título: **Método para detectar analito**

30 Prioridad:

02.10.2017 JP 2017192684

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

25.08.2023

73 Titular/es:

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
2-9, Kanda Tsukasa-machi, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8535, JP

72 Inventor/es:

OTANI MAKIKO y
MIYAZAKI KOJI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 948 008 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

Método para detectar analito

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar un analito y, más particularmente, a un método para detectar un analito usando principalmente una muestra biológica como espécimen y detectando una cantidad traza de un analito con alta sensibilidad.

10 Antecedentes de la técnica

En inmunoensayos generales, un analito (antígeno) se une a un primer ligando inmovilizado (anticuerpo sólido), ese analito se une a un segundo ligando marcado (anticuerpo marcado), se forma un sistema de tipo sándwich de primer ligando-analito-segundo ligando, y en un punto de tiempo cuando se ha logrado hasta cierto punto la unión del primer ligando, el analito y el segundo ligando, el analito se detecta midiendo el segundo ligando marcado.

Como uno de tales dispositivos de inmunoensayo, puede mencionarse un dispositivo SPFS que permite realizar la detección de un analito con alta precisión basado en el principio de espectroscopía de fluorescencia mejorada de campo de plasmones superficiales (SPFS), al que se aplica un fenómeno de resonancia de plasmones superficiales.

La espectroscopia de fluorescencia mejorada por campo de plasmón superficial es un método para detectar un analito en una cantidad infinitesimal a una concentración ultrabaja, mediante la generación de luz de plasmón superficial (ondas de compresión) en una superficie de película delgada de metal en las condiciones en las que una luz de excitación, tal como luz láser irradiada desde una fuente de luz sufre una reflectancia total atenuada (ATR) en la superficie de la película delgada de metal, aumentando así la cantidad de fotones transportados por la luz de excitación irradiada desde una fuente de luz hasta el intervalo de desde varias docenas hasta varios cientos de veces, obteniendo así una efecto de mejora del campo eléctrico de la luz de plasmón superficial, excitando así de manera eficiente una sustancia fluorescente unida a un analito capturado en la vecindad de la superficie de la película delgada de metal a través de este efecto de mejora del campo eléctrico, y observando esta fluorescencia.

Un inmunoensayo tal como SPFS es un método altamente sensible para detectar un analito; sin embargo, en un caso en el que la fuerza de unión (afinidad) entre el analito (antígeno) y el segundo ligando (anticuerpo marcado) es débil, ya que el segundo ligando no puede unirse con precisión al analito, la precisión de detección del analito no es alta.

El documento de patente 1 describe, como un método para mejorar la precisión de detección de un analito, un método para mejorar la precisión de detección de un analito mediante la incorporación de carboximetil dextrano en una disolución diluida de una muestra, capturando así los contaminantes incluidos en la muestra con carboximetil dextrano y, por tanto, suprimiendo un aumento en el blanco provocado por los contaminantes.

Sin embargo, en este método, puede esperarse una mejora en la precisión de detección lograda al bajar el blanco; sin embargo, en un caso en el que la fuerza de unión entre el analito y el segundo ligando es débil, dado que la sensibilidad de detección del analito no es alta *per se*, existen limitaciones para mejorar la precisión de detección del analito.

Un folleto de Reichert Technologies (<https://www.reichertspr.com/blog/2014/02/04/reducing-non-specific-binding>), titulado "Reducing Non-Specific Binding" y publicado el 4 de febrero de 2014, divulga (entre otros) la adición de 1 mg/ml de carboximetil dextrano (CMD) al tampón de ejecución cuando se usa un chip CMD.

El documento WO 94/10573 divulga un método para evitar la unión no deseada en ensayos del tipo que comprende poner en contacto la muestra que contiene el analito que va a detectarse con una superficie de fase sólida que soporta un ligando capaz de unir el analito. El método en dicho documento se caracteriza por añadir a la muestra uno o más componentes del material que forma la superficie de fase sólida que soporta el ligando, cuyos componentes están en forma al menos parcialmente solubles y son capaces de interactuar con los constituyentes del medio de la muestra.

El documento WO 92/21769 divulga un método de ensayo para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:

a) proporcionar

(i) un reactivo de captura, que comprende un primer elemento de unión conjugado con un anión polimérico,

(ii) un reactivo indicador, que comprende un segundo elemento de unión y un marcador

detectable,

(iii) un bloqueante de unión no específica que comprende un material de anión polimérico no unido, y

(iv) un material en fase sólida que contiene un sitio de reacción que comprende un catión polimérico,

en el que dicho bloqueante de unión no específica inhibe la unión no específica de los reactivos a dicha fase sólida.

El documento WO 2013/042603 divulga disoluciones líquidas que contienen CMD para su uso como diluyente de muestra en inmunoensayos de tipo sándwich heterogéneos para troponina cardíaca basados en espectroscopía de fluorescencia mejorada de campo de plasmón superficial (SPFS). En particular, la figura 3 muestra un ejemplo en el que el analito diana se captura en un soporte sólido recubierto con CMD que tiene restos de ligando adecuados unidos al mismo y luego el analito capturado se detecta mediante el uso de un ligando secundario marcado según un ensayo de tipo sándwich (véase el ejemplo 1). Luego, la superficie del chip se lava para retirar los compuestos no unidos y se pone en contacto con una disolución que contiene un anticuerpo secundario marcado. El documento también menciona la presencia de una SAM recubriendo la superficie de oro y subyacente a la capa de polímero hidrófilo y el uso de tampones Tris, Hepes o fosfato salinos como diluyentes.

El documento EP 2 940 473 divulga un método para medir la cantidad de un compuesto diana que comprende una cadena de azúcar en una muestra biológica mediante un método de inmunoensayo de tipo sándwich que usa una lectina marcada, comprendiendo dicho método añadir un compuesto de cadena de azúcar que compite con las impurezas contenidas en dicha muestra biológica para la unión a dicha lectina marcada.

Los documentos WO 2014/097877 y WO 2017/057136 divulgan, cada uno, un inmunoensayo basado en SPFS para detectar troponina cardíaca.

Lista de referencias

Bibliografía de patentes

Documento de patente 1: WO 2013/042603

Sumario de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar un analito, en el que en un inmunoensayo o similar, incluso en el caso en el que la fuerza de unión entre un analito como objeto de medición y un ligando marcado es débil, la sensibilidad de detección del analito es alta.

Solución al problema

El método para detectar un analito según la presente invención, mediante el cual se logra el objeto descrito anteriormente, incluye:

una primera etapa de suministrar una muestra a un dispositivo de detección que tiene un primer ligando, estando el primer ligando inmovilizado sobre un sustrato y capaz de unirse específicamente al analito, suministrándose la muestra sobre el sustrato del dispositivo de detección, y luego hacer que el analito incluido en la muestra se una al primer ligando;

en el que el sustrato tiene un soporte; un elemento de metal formado sobre el soporte; una monocapa autoensamblada (SAM) formada sobre el elemento de metal; y una capa de polímero hidrófilo formada sobre la SAM y el primer ligando se inmoviliza en la capa de polímero hidrófilo;

en el que el dispositivo de detección es un sensor de excitación de plasmones; y

en el que la capa de polímero hidrófilo se compone de carboximetil dextrano;

una segunda etapa de suministrar un segundo ligando sobre el sustrato, estando el segundo ligando marcado con un marcador y capaz de unirse específicamente al analito, y luego hacer que el segundo ligando se una al analito unido al primer ligando;

en el que en la segunda etapa se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato; teniendo el carboximetil dextrano un peso molecular de desde 40.000 hasta 750.000,

una tercera etapa de medir el segundo ligando unido al analito; y

5 en el que la muestra se ha diluido con un disolvente seleccionado del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris y solución salina tamponada con HEPES.

Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que en la segunda etapa se suministre carboximetil dextrano sobre el sustrato a una concentración de 1 a 30 mg/ml.

10 Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que en la segunda etapa se suministre carboximetil dextrano sobre el sustrato junto con el segundo ligando.

15 Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que en la segunda etapa se suministre sobre el sustrato un líquido que contiene el segundo ligando que contiene el segundo ligando y carboximetil dextrano.

Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que en la segunda etapa se suministre el segundo ligando sobre el sustrato para hacer que el segundo ligando se una al analito, y luego se suministre carboximetil dextrano sobre el mismo.

20 Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que en la segunda etapa después de hacer que el segundo ligando se una al analito, se suministre carboximetil dextrano incorporándolo a un líquido de limpieza para limpiar el sustrato.

25 Con respecto al método para detectar un analito, es preferible que el analito sea troponina I cardíaca (cTnI) o péptido natriurético cerebral (BNP).

Efectos ventajosos de la invención

30 Con el método para detectar un analito de la presente invención, incluso en el caso en el que el analito esté en una cantidad mínima y la fuerza de unión entre el analito y un ligando marcado sea débil, el analito puede detectarse con alta sensibilidad.

Descripción de realizaciones

35 [Método para detectar el analito]

El método para detectar un analito según la presente invención incluye:

40 una primera etapa de suministrar una muestra a un dispositivo de detección que tiene un primer ligando, estando el primer ligando inmovilizado sobre un sustrato y capaz de unirse específicamente al analito, suministrándose la muestra sobre el sustrato del dispositivo de detección, y luego hacer que el analito incluido en la muestra se una al primer ligando;

45 en el que el sustrato tiene un soporte; un elemento de metal formado sobre el soporte; una monocapa autoensamblada (SAM) formada sobre el elemento de metal; y una capa de polímero hidrófilo formada sobre la SAM y el primer ligando se inmoviliza en la capa de polímero hidrófilo;

en el que el dispositivo de detección es un sensor de excitación de plasmones; y

50 en el que la capa de polímero hidrófilo se compone de carboximetil dextrano;

una segunda etapa de suministrar un segundo ligando sobre el sustrato, estando el segundo ligando marcado con un marcador y capaz de unirse específicamente al analito, y luego hacer que el segundo ligando se una al analito unido al primer ligando;

55 en el que en la segunda etapa se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato; teniendo el carboximetil dextrano un peso molecular de desde 40.000 hasta 750.000,

una tercera etapa de medir el segundo ligando unido al analito; y

60 en el que la muestra se ha diluido con un disolvente seleccionado del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris y solución salina tamponada con HEPES.

65 En inmunoensayos generales, un analito se detecta indirectamente haciendo que el analito (antígeno) se una a un primer ligando (anticuerpo sólido) inmovilizado sobre un sustrato de un dispositivo de detección en una primera etapa; haciendo que el analito unido al primer ligando se una específicamente a un segundo ligando marcado

(anticuerpo marcado) en una segunda etapa; y midiendo el segundo ligando marcado unido al analito mediante algún tipo de método en una tercera etapa. El método para detectar un analito de la presente invención tiene la característica de suministrar carboximetil dextrano sobre el sustrato en la segunda etapa descrita anteriormente.

En los inmunoensayos convencionales, en un caso en el que la fuerza de unión entre un analito y un segundo ligando marcado es débil, dado que el segundo ligando que sirve como diana de medición no puede unirse con precisión al analito, el analito no puede detectarse con gran precisión. Según el método para detectar un analito según la presente invención, dado que el carboximetil dextrano se suministra sobre el sustrato en la segunda etapa, incluso en el caso en el que la fuerza de unión entre el analito y el segundo ligando marcado es débil, el analito puede detectarse con alta sensibilidad. La razón por la cual se obtiene un efecto de este tipo en el método para detectar un analito según la presente invención no se comprende claramente; sin embargo, se especula que dado que el grupo carboxilo del carboximetil dextrano es hidrófilo, el carboximetil dextrano priva al segundo ligando del agua de hidratación, por lo que la estructura estérica del segundo ligando sufre un cambio, el segundo ligando adopta una conformación que puede reaccionar más fácilmente con el analito y, por lo tanto, adquiere una mayor reactividad con el analito, el segundo ligando puede unirse con precisión al analito y, por tanto, puede mejorarse la sensibilidad de detección para el analito.

[Primera etapa]

En la primera etapa, se suministra una muestra a un dispositivo de detección que tiene un primer ligando que está inmovilizado sobre un sustrato y puede unirse específicamente a un analito, suministrándose la muestra sobre el sustrato del dispositivo de detección, y luego se hace que el analito incluido en la muestra se una al primer ligando.

El dispositivo de detección es un sensor de excitación de plasmones. El dispositivo de detección tiene un sustrato. El sustrato tiene un soporte; un elemento de metal formado sobre el soporte; una monocapa autoensamblada (SAM) formada sobre el elemento de metal; y una capa de polímero hidrófilo formada sobre la SAM.

Como soporte, se prefiere un soporte transparente porque la irradiación de luz del elemento de metal que se describirá a continuación se lleva a cabo a través de este soporte. Con respecto al soporte transparente, el material no está particularmente limitado y puede ser un soporte elaborado de vidrio o elaborado de un plástico tal como policarbonato o un polímero de cicloolefina. En el soporte transparente, el índice de refracción [nd] para la línea d (588 nm) es preferiblemente de 1,40 a 2,20, y el grosor es preferiblemente de 0,01 a 10 mm, y más preferiblemente de 0,5 a 5 mm.

Con respecto a un soporte transparente elaborado de vidrio, los productos comercialmente disponibles tales como "BK7" (índice de refracción [nd] 1,52) y "LaSFN9" (índice de refracción [nd] 1,85) fabricados por Schott Japan Corp.; "K-PSFn3" (índice de refracción [nd] 1,84), "K-LaSFn17" (índice de refracción [nd] 1,88) y "K-LaSFn22" (índice de refracción [nd] 1,90) fabricados por Sumita Optical Glass, Inc.; y "S-LAL10" (índice de refracción [nd] 1,72) fabricado por Ohara Corp., son los preferidos desde el punto de vista de las características ópticas y la capacidad de limpieza.

El elemento de metal desempeña el papel de generar plasmón superficial o plasmón localizado por medio de luz irradiada desde una fuente de luz. En cuanto al elemento de metal, por ejemplo, puede usarse una película de metal o partículas metálicas, y es preferible que el elemento de metal se forme como una película de metal sobre la superficie del soporte. Esta película de metal desempeña el papel de inducir el plasmón superficial por medio de la luz de excitación irradiada desde una fuente de luz y excitar de manera eficiente un colorante fluorescente.

Con respecto al metal para la película de metal, es preferible que la película de metal esté formada por al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, plata, cobre, aluminio, platino y zinc, y es más preferible que la película de metal esté formada por oro. La película de metal puede estar en forma de estar formada por una aleación de algunos de estos metales, o puede ser un producto obtenido por laminación de una pluralidad de películas de metal. Tal tipo de metal es adecuado desde el punto de vista de ser estable frente a la oxidación y tener una gran mejora del campo eléctrico provocado por la resonancia de plasmones.

En un caso en el que se use como soporte un soporte elaborado de vidrio, es preferible que se forme previamente sobre el soporte una fina película de cromo, aleación de níquel-cromo o titanio para adherir el vidrio y la película de metal con más firmeza.

El grosor de la película de metal es preferiblemente de 5 a 500 nm en el caso de oro, de 5 a 500 nm en el caso de plata, de 5 a 500 nm en el caso de aluminio, de 5 a 500 nm en el caso de cobre, de 5 a 500 nm en el caso de platino, y de 5 a 500 nm en el caso de una aleación de estos, y el grosor de una película delgada de cromo es preferiblemente de 1 a 20 nm. Desde el punto de vista del efecto de mejora del campo eléctrico, el grosor de la película de metal es más preferiblemente de 20 a 70 nm en el caso de oro, de 20 a 70 nm en el caso de plata, de 10 a 50 nm en el caso de aluminio, de 20 a 70 nm en el caso de cobre, de 20 a 70 nm en el caso de platino y de 10 a 70 nm en el caso de una aleación de estos, y el grosor de una película delgada de cromo es más preferiblemente de 1 a 3 nm. Cuando el grosor de la película de metal está dentro del intervalo descrito anteriormente, es adecuado porque se genera fácilmente plasmón superficial.

En el caso de usar partículas metálicas como elemento de metal, es posible inducir plasmones localizados. El tipo de metal usado para las partículas metálicas no está particularmente limitado siempre que puedan producirse a partir de él partículas capaces de inducir plasmones; sin embargo, se prefiere al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, plata, cobre, aluminio, platino y zinc, o una aleación de dos o más tipos de estos. Además, el tamaño de partícula de las partículas metálicas no está particularmente limitado siempre que el tamaño de partícula esté en el intervalo capaz de generar plasmón localizado; sin embargo, el tamaño de partícula es preferiblemente de 10 a 100 nm, y es adecuado usar grupos de partículas metálicas que tengan un tamaño de partícula promedio dentro de un intervalo de este tipo.

Por ejemplo, las partículas metálicas pueden usarse en forma de dispersión sobre el soporte mencionado anteriormente.

Se forma una monocapa autoensamblada (SAM) en la otra superficie del elemento de metal, la superficie que no está en contacto con el soporte, como un andamiaje para solidificar la capa de polímero hidrófilo que se describirá a continuación con el fin de evitar la extinción del metal de moléculas fluorescentes en el momento de la medición de la fluorescencia.

Con respecto a las moléculas individuales que forman la SAM, generalmente, se usa un carboxialcanotiol que tiene de aproximadamente 4 a 20 átomos de carbono (puede adquirirse, por ejemplo, de Dojindo Molecular Technologies, Inc. o Sigma-Aldrich Japan K.K.), y de manera particularmente preferible 10-carboxi-1-decanotiol. Un carboxialcanotiol que tiene de 4 a 20 átomos de carbono es adecuado desde el punto de vista de que la influencia óptica de una SAM formada usando ese compuesto es baja, es decir, la SAM tiene propiedades tales como alta transparencia, bajo índice de refracción y un grosor de película pequeño.

La capa de polímero hidrófilo se forma en la otra superficie del SAM, la superficie que no está en contacto con el elemento de metal, y tiene una estructura bidimensional o una estructura tridimensional. Una estructura tridimensional se refiere a una estructura de la capa de polímero hidrófilo, en la que la inmovilización del ligando que se describirá a continuación no se limita a la bidimensionalidad de una superficie de soporte sino que se extiende a un espacio tridimensional separado de la superficie de soporte.

Usando el polímero hidrófilo que se describirá a continuación en forma de una capa, la capa de polímero hidrófilo puede usarse sin estar limitada en la cantidad (concentración o densidad) del polímero hidrófilo.

El polímero de la capa de polímero hidrófilo se refiere a un compuesto que tiene un peso molecular de 5.000 o más. La capa de polímero hidrófilo es una capa de polímero hidrófilo que se compone de carboximetil dextrano, desde el punto de vista de mejorar la biocompatibilidad, mejorar la supresión de una reacción de adsorción no específica o asegurar una alta hidrofilia.

El peso molecular de carboximetil dextrano es preferiblemente de 1 kDa o más y de 5.000 kDa o menos, y más preferiblemente de 4 kDa o más y de 1.000 kDa o menos.

La densidad del polímero de la capa de polímero hidrófilo (masa por unidad de área de la capa de polímero hidrófilo formada sobre la SAM) puede ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo de polímero usado o del método de formación de la capa; sin embargo, por ejemplo, la densidad es de 0,001 ng/mm² o más y de 30 ng/mm² o menos, y aunque la densidad puede variar dependiendo del grosor de la película de la capa de polímero hidrófilo, es preferible que la densidad esté en el intervalo de 0,2 ng/mm² o más y de 6 ng/mm² o menos.

Preferiblemente, la densidad del polímero satisface este intervalo. Cuando se usa para la SAM un chip sensor en el que se solidifica un polímero hidrófilo a una densidad en tal intervalo, es adecuado porque la señal de luminiscencia del ensayo se estabiliza y aumenta.

El grosor de película promedio de la capa de polímero hidrófilo puede ajustarse apropiadamente según el tipo de polímero usado o la densidad de la capa. Por ejemplo, el grosor de película promedio puede ser de 3 nm o más y de 300 nm o menos. Sobre todo, el grosor de película promedio es preferiblemente de 3 nm o más y de 130 nm o menos, y de manera particularmente preferible en el intervalo de 50 nm o más y de 100 nm o menos. Este grosor de película puede medirse usando un microscopio de fuerza atómica (AFM) o similar. Cuando el grosor de película promedio de la capa de polímero hidrófilo está en tal intervalo, es adecuado porque la señal de fluorescencia del ensayo se estabiliza y aumenta. Mientras tanto, el intervalo del grosor de película promedio es el grosor de película promedio en una disolución tal como una disolución de analito que se describirá a continuación.

Se usa un primer ligando con el fin de inmovilizar (capturar) un analito en una muestra, y el primer ligando se inmoviliza sobre el sustrato, mientras que según una realización adecuada del sustrato, el primer ligando se inmoviliza sobre una capa de polímero hidrófilo. En el caso en el que la capa de polímero hidrófilo tiene una estructura bidimensional, el ligando se inmoviliza en la superficie exterior de la capa de polímero hidrófilo, y en el caso en el que la capa de polímero hidrófilo tiene una estructura tridimensional, el ligando se inmoviliza dentro de la

capa y/o sobre la superficie exterior de la capa de polímero hidrófilo. En un caso en el que la capa de polímero hidrófilo tiene una estructura tridimensional, generalmente, una gran cantidad de ligandos se inmovilizan en forma de dispersión dentro de la estructura tridimensional de la capa de polímero hidrófilo.

5 El primer ligando es una molécula o un fragmento de molécula que puede reconocer específicamente un analito contenido en una muestra o es reconocido específicamente por un analito, y puede unirse al analito. Los ejemplos de una molécula o fragmento de molécula de este tipo incluyen ácidos nucleicos (ADN que puede ser monocatenario o bicatenario, ARN, un polinucleótido, un oligonucleótido, un PNA (ácido nucleico peptídico) y similares, o un nucleósido, un nucleótido, y moléculas modificadas de los mismos), proteínas (un polipéptido, un oligopéptido y
10 similares), aminoácidos (también incluyendo aminoácidos modificados), sacáridos (un oligosacárido, un polisacárido, una cadena de azúcar y similares), lípidos y moléculas modificadas, complejos y similares de estos; sin embargo, la molécula o el fragmento de molécula no se limitan a estos.

Los ejemplos de las proteínas incluyen anticuerpos, y los ejemplos específicos incluyen un anticuerpo monoclonal anti- α -fetoproteína [AFP] (puede adquirirse de Japan Clinical Laboratories, Inc., y similares), un anticuerpo monoclonal contra el antígeno carcinoembrionario [CEA], un anticuerpo monoclonal anti-CA19-9 y un anticuerpo monoclonal anti-PSA.

Según la presente invención, el término "anticuerpo" incluye un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo obtenible por recombinación génica y un fragmento de anticuerpo.

Como método para inmovilizar un primer ligando en una capa de polímero hidrófilo puede mencionarse, por ejemplo, un método para someter un grupo carboxilo portado por un polímero que tiene un grupo funcional reactivo, tal como carboximetil dextrano [CMD], a esterificación activa por medio de carbodiimida soluble en agua [WSC] (por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida [EDC]) e imida de ácido N-hidroxisuccínico [NHS], e inmovilizar el grupo carboxilo que ha sido sometido a esterificación activa como tal y un grupo amino portado por el primer ligando sometiendo estos grupos a una reacción de deshidratación usando una carbodiimida soluble en agua, y similares.

Después de inmovilizar el primer ligando, es preferible que la superficie del sustrato se trate con un agente bloqueante tal como albúmina de suero bovino [BSA], para evitar que la muestra o similar que se describirá a continuación se adsorba de manera no específica al sustrato.

La densidad del primer ligando inmovilizado sobre la capa de polímero hidrófilo es preferiblemente de 1 femtomol/cm² o más y de 1 nanomol/cm² o menos, y más preferiblemente de 10 femtomol/cm² o más y de 100 picomol/cm² o menos. Cuando la densidad del ligando está en el intervalo descrito anteriormente, es adecuado porque la intensidad de señal de la señal de fluorescencia del ensayo aumenta.

El analito es una sustancia que sirve como objeto de medición y generalmente se incluye en una muestra. Los ejemplos de la muestra incluyen sangre (sangre completa, suero sanguíneo y plasma sanguíneo), orina, líquido de las fosas nasales, saliva, heces y líquido celómico (líquido cefalorraquídeo, ascitis, líquido pleural y similares). La muestra puede diluirse según corresponda con un disolvente deseado, una disolución tampón deseada o similar.

El analito es una molécula o un fragmento de molécula que puede reconocerse específicamente por el primer ligando inmovilizado en la capa de polímero hidrófilo o reconocer específicamente el primer ligando y unirse al primer ligando. Los ejemplos del analito incluyen ácidos nucleicos (ADN que puede ser monocatenario o bicatenario, ARN, un polinucleótido, un oligonucleótido, un ácido peptídico nucleico PNA) y similares, y un nucleósido, un nucleótido y moléculas modificadas de los mismos), proteínas (incluyendo un polipéptido y un oligopéptido), aminoácidos (incluyendo también aminoácidos modificados), sacáridos (un oligosacárido, un polisacárido, una cadena de azúcar y similares), lípidos y moléculas modificadas, complejos y similares de estos. Específicamente, el analito puede ser troponina I cardíaca (cTnI), péptido natriurético cerebral (BNP), α -fetoproteína (AFP), un marcador tumoral tal como un antígeno carcinoembrionario, una molécula de transducción de señales, una hormona o similar, y no hay limitaciones particulares. Dado que se especula que el segundo ligando que se describirá a continuación tiene una estructura estérica que puede reaccionar fácilmente con el analito, es decir, una estructura en la que un sitio de reconocimiento de antígeno está expuesto en la superficie, el analito es preferiblemente troponina I cardíaca (cTnI) o péptido natriurético cerebral (BNP).

Como normalmente se suministra una muestra sobre el sustrato, el analito se une al primer ligando que se inmoviliza sobre el sustrato. Es preferible que se forme un canal de flujo sobre el sustrato, y es preferible que al menos una parte del canal de flujo esté configurada para incluir un elemento de metal en un soporte y para incluir una capa de polímero hidrófilo y un primer ligando en una SAM, de modo que se suministre una muestra en el canal de flujo para sumergir el primer ligando en una disolución de analito, y de ese modo se hace que el analito se una al primer ligando.

La forma del canal de flujo puede ser un tubo (tubería) cuadrado o un tubo (tubería) redondo, es preferible que la unidad de reacción y la unidad de medición, en las que se hace que el analito se una al primer ligando o similar y se

mide la fluorescencia, tienen forma de tubo cuadrado, y es preferible que la porción del canal de flujo que se utiliza sólo para el suministro de otros líquidos químicos o similares tenga forma de tubo redondo.

En cuanto al disolvente usado para diluir la muestra, se usan solución salina tamponada con fosfato [PBS], solución salina tamponada con Tris [TBS] y solución salina tamponada con HEPES [HBS].

Para capturar una gran cantidad del analito usando el primer ligando, es preferible que se hace circular la muestra suministrada en el canal de flujo. La temperatura de la muestra y el tiempo en ese momento pueden variar dependiendo del tipo de muestra o similar; sin embargo, la temperatura y el tiempo son normalmente de 1 a 60 minutos a 20°C a 40°C, y preferiblemente de 5 a 15 minutos a 37°C.

En un caso en el que la muestra se suministra al canal de flujo, la concentración inicial (concentración antes del suministro) del analito incorporado en la muestra es, por ejemplo, de 0,001 pg/ml a 100 µg/ml. La cantidad total de muestra que va a suministrarse al canal de flujo es normalmente de 0,001 a 20 ml, y preferiblemente de 0,01 a 1 ml. La velocidad de flujo de la muestra que va a suministrarse al canal de flujo es normalmente de 1 a 50.000 µl/min, y preferiblemente de 5000 a 10.000 µl/min.

Es preferible que la muestra se suministre al sustrato, se haga que el analito se una al primer ligando y luego se limpie el sustrato. En cuanto al líquido de limpieza que va a usarse para la limpieza, por ejemplo, se prefiere una disolución obtenida disolviendo un tensioactivo tal como Tween 20 o Triton X100 en el disolvente usado para la dilución de la muestra, u otra disolución tampón (por ejemplo, PBS, TBS o HBS) a una concentración del 0,00001% al 1% en masa, o una disolución obtenida disolviendo una sal tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio en el mismo disolvente o disolución tampón a una concentración de 10 a 500 mM. Alternativamente, una disolución tampón que tenga un pH bajo, por ejemplo, una disolución tampón de clorhidrato de glicina 10 mM a un pH de 1,5 a 4,0, también puede usarse como líquido de limpieza.

Es preferible que la temperatura y la velocidad de flujo del líquido de limpieza sean los mismos que la temperatura y la velocidad de flujo en el momento del suministro de la muestra. La limpieza se lleva a cabo normalmente durante de 0,5 a 180 minutos, y preferiblemente de 5 a 60 minutos.

[Segunda etapa]

En la segunda etapa, se suministra sobre el sustrato un segundo ligando que está marcado con un marcador y que puede unirse específicamente al analito, y se hace que el analito unido al primer ligando se una al segundo ligando. Además, en la segunda etapa, se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato.

El segundo ligando está marcado con un marcador y, por tanto, puede unirse específicamente al analito. El segundo ligando es un ligando usado con el fin de marcar el analito con un marcador, y el segundo ligando puede ser el mismo que el primer ligando descrito anteriormente, o puede ser diferente del mismo. Sin embargo, en el caso en el que el anticuerpo primario usado como primer ligando sea un anticuerpo policlonal, el anticuerpo secundario utilizado como segundo ligando puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal; sin embargo, en el caso en el que el anticuerpo primario sea un anticuerpo monoclonal, es deseable que el anticuerpo secundario sea un anticuerpo monoclonal que reconozca un epítipo que no es reconocido por el anticuerpo primario, o un anticuerpo policlonal.

Además, también es preferible una realización del uso de un complejo en el que un segundo analito (antígeno competitivo; siempre que sea diferente del antígeno diana) que compite con el analito (antígeno diana) incluido en la disolución de analito se ha unido previamente al anticuerpo secundario. Tal realización es adecuada porque la cantidad de fluorescencia (señal de fluorescencia del ensayo) y la cantidad del antígeno diana pueden hacerse proporcionales entre sí.

El marcador es una sustancia usada con el fin de detectar un analito haciendo que un segundo ligando marcado con un marcador se una al analito y luego midiendo el marcador mediante algún tipo de método, y siempre que se logre ese propósito, no hay limitaciones en cuanto al tipo de marcador. Como marcador, se prefiere un colorante fluorescente, por la razón de que se obtiene una alta sensibilidad de detección, o similar. Un colorante fluorescente es un nombre colectivo para las sustancias que emiten luz fluorescente cuando se irradian con una luz de excitación predeterminada o cuando se excitan usando un efecto de campo eléctrico. La fluorescencia es un concepto que también incluye diversos tipos de luminiscencia tales como fosforescencia.

Con respecto al colorante fluorescente, el tipo del mismo no está particularmente limitado siempre que el colorante fluorescente no se extinga completamente debido a la absorción de luz por parte del elemento de metal, y puede usarse cualquiera de los colorantes fluorescentes conocidos. En general, se prefiere un colorante fluorescente que permita usar un sistema de fluorescencia que incluya un filtro, en lugar de un monocromador, y que tenga un gran desplazamiento de Stokes, lo que aumenta la eficacia de detección.

Los ejemplos de tal colorante fluorescente incluyen colorantes fluorescentes de la familia de la fluoresceína

(fabricados por Integrated DNA Technologies, Inc.), colorantes fluorescentes de la familia de las polihalofluoresceínas (fabricados por Applied Biosystems Japan, Ltd.), colorantes fluorescentes de la familia de las hexaclorofluoresceínas (fabricados por Applied Biosystems Japan, Ltd.), colorantes fluorescentes de la familia de la cumarina (fabricados por Invitrogen Corp.), colorantes fluorescentes de la familia de la rodamina (fabricados por GE Healthcare Biosciences Corp.), colorantes fluorescentes de la familia de la cianina, colorantes fluorescentes de la familia de la indocarbocianina, colorantes fluorescentes de la familia de la oxazina, colorantes fluorescentes de la familia de las tiazinas, colorantes fluorescentes de la familia de las escuaraina, colorantes fluorescentes de la familia de los lantánidos quelados, colorantes fluorescentes de la familia BODIPY (marca registrada) (fabricados por Invitrogen Corp.), colorantes fluorescentes de la familia del ácido naftalenosulfónico, colorantes fluorescentes de la familia de los pirenos, colorantes fluorescentes de la familia del trifenilmetano, y la serie de colorantes Alexa Fluor (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), y además también pueden usarse los colorantes fluorescentes descritos en los documentos US 6.406.297, US 6.221.604, US 5.994.063, US 5.808.044, US 5.880.287, US 5.556.959, y US 5.135.717.

Además, el colorante fluorescente no se limita a los colorantes fluorescentes orgánicos descritos anteriormente. Por ejemplo, también pueden usarse colorantes fluorescentes de sistemas complejos de metales de tierras raras de Eu y Tb. Los complejos de metales de tierras raras generalmente tienen características de tener una gran diferencia de longitud de onda entre la longitud de onda de excitación (de aproximadamente 310 a 340 nm) y la longitud de onda de emisión (cerca de 615 nm para un complejo de Eu y cerca de 545 nm para un complejo de Tb), y tener una larga duración de la fluorescencia de varios cientos de microsegundos o más. Un ejemplo de colorantes fluorescentes disponibles comercialmente de sistemas complejos de metales de tierras raras puede ser ATBTA-Eu³⁺.

Cuando se lleva a cabo la medición de fluorescencia que se describirá a continuación, es deseable usar un colorante fluorescente que tenga la máxima longitud de onda de fluorescencia en una región de longitud de onda con menor absorción de luz por parte del metal incluido en el elemento de metal. Por ejemplo, en el caso de usar oro para el elemento de metal, para suprimir la influencia ejercida por la absorción de luz por un elemento de oro a un nivel mínimo, es deseable usar un colorante fluorescente que tenga una longitud de onda de fluorescencia máxima de 600 nm o más. Por tanto, en este caso, es particularmente deseable usar un colorante fluorescente que tenga una longitud de onda de fluorescencia máxima en la región del infrarrojo cercano, tal como Cy5 o Alexa Fluor (marca registrada) 647. Cuando se usa un colorante fluorescente de este tipo que tiene una longitud de onda de fluorescencia máxima en la región del infrarrojo cercano, es útil también para el caso de usar sangre como muestra, desde el punto de vista de que puede suprimirse la influencia de la absorción de luz por el hierro derivado de un componente de células sanguíneas en la sangre a un nivel mínimo. Por otro lado, en el caso de usar plata como elemento de metal, es deseable usar un colorante fluorescente que tenga una longitud de onda de fluorescencia máxima de 400 nm o más.

Estos colorantes fluorescentes pueden usarse solos o en combinación de dos o más tipos de los mismos.

En cuanto al método para producir un segundo ligando marcado con un marcador, en el caso de usar un anticuerpo secundario como segundo ligando, los ejemplos incluyen un método de proporcionar, en primer lugar, un colorante fluorescente con un grupo carboxilo, someter el grupo carboxilo a esterificación activa por medio de una carbodiimida soluble en agua [WSC] (por ejemplo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida [EDC]) e imida de ácido N-hidroxisuccínico [NHS], realizar posteriormente una reacción de deshidratación usando el grupo carboxilo que ha sido sometido a esterificación activa y un grupo amino portado por el anticuerpo secundario, y de ese modo inmovilizar el anticuerpo secundario; un método de hacer que un anticuerpo secundario y un colorante fluorescente que tienen, respectivamente, un grupo isotiocianato y un grupo amino, reaccionen entre sí, y de ese modo inmovilizar el anticuerpo secundario; un método de hacer que un anticuerpo secundario y un colorante fluorescente que tienen, respectivamente, un grupo haluro de sulfonilo y un grupo amino, reaccionen entre sí, y de ese modo inmovilizar el anticuerpo secundario; un método de hacer que un anticuerpo secundario y un colorante fluorescente que tienen, respectivamente, un grupo yodoacetamida y un grupo tiol, reaccionen entre sí, y de ese modo inmovilizar el anticuerpo secundario; y un método de hacer que un colorante fluorescente biotinilado y un anticuerpo secundario estreptavidinado (alternativamente, un metal fluorescente estreptavidinado y un anticuerpo secundario biotinilado) reaccionen entre sí, y de ese modo inmovilizar el anticuerpo secundario.

Cuando el segundo ligando marcado con un marcador se suministra sobre un sustrato de un dispositivo de detección, una disolución que incluye el segundo ligando marcado con un marcador puede suministrarse sobre el sustrato del dispositivo de detección, y la concentración del segundo ligando marcado con un marcador en la disolución que va a suministrarse es preferiblemente de 0,001 a 10.000 µg/ml, y más preferiblemente de 1 a 1.000 µg/ml.

Cuando se suministra esta disolución, la temperatura, la velocidad de flujo y el tiempo de suministro de la disolución son similares, respectivamente, a los del caso de suministro de la muestra en la primera etapa.

Es preferible que el segundo ligando marcado con un marcador se suministre sobre el sustrato, se haga que el segundo ligando marcado con un marcador se una al analito unido al primer ligando y luego se limpie el sustrato. Esta limpieza es similar a la limpieza de la primera etapa.

En la segunda etapa, tal como se describió anteriormente, se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato. Con respecto a la realización de suministrar carboximetil dextrano, específicamente, puede mencionarse una realización de suministrar carboximetil dextrano junto con el segundo ligando, y una realización de suministrar el segundo ligando sobre el sustrato, hacer que el segundo ligando se una al analito, y luego suministrar carboximetil dextrano. En el caso de la primera realización, se especula que el carboximetil dextrano priva al segundo ligando disuelto en la muestra del agua de hidratación, por lo que la estructura estérica del segundo ligando sufre un cambio, el segundo ligando adopta una conformación que puede reaccionar más fácilmente con el analito para adquirir así una mayor reactividad con el analito y, por tanto, se mejora la sensibilidad de detección para el analito. En el caso de la última realización, se especula que el carboximetil dextrano priva al segundo ligando unido al analito del agua de hidratación, el segundo ligando se cambia para tener una conformación que tiene alta afinidad con el analito, y la disociación del analito y el segundo ligando se suprime y, por tanto, se mejora la sensibilidad de detección del analito.

Con respecto a una realización de suministrar carboximetil dextrano junto con el segundo ligando, puede mencionarse un método de suministrar un líquido que contiene el segundo ligando que contiene el segundo ligando y carboximetil dextrano. Con respecto a una realización de suministrar el segundo ligando sobre el sustrato, hacer que el segundo ligando se una al analito y luego suministrar carboximetil dextrano, puede mencionarse un método para hacer que el segundo ligando se una al analito y luego suministrar carboximetil dextrano incorporándolo en un líquido de limpieza para limpiar el sustrato.

La concentración del carboximetil dextrano que va a suministrarse es preferiblemente de 1 a 30 mg/ml, y más preferiblemente de 1 a 10 mg/ml. Cuando la concentración del carboximetil dextrano está en el intervalo descrito anteriormente, puede obtenerse fácilmente una alta sensibilidad de detección para el analito. Además, cuando la concentración del carboximetil dextrano es de más de 30 mg/ml, es difícil disolver el carboximetil dextrano, la viscosidad se vuelve alta y la operación puede lograrse con dificultades.

El peso molecular del carboximetil dextrano es de 40.000 a 750.000 y más preferiblemente de 100.000 a 500.000. Cuando el peso molecular del carboximetil dextrano está en el intervalo descrito anteriormente, puede obtenerse fácilmente una alta sensibilidad de detección para el analito.

El grado de sustitución de los grupos carboxilo del carboximetil dextrano es preferiblemente de 0,2 a 0,8 y más preferiblemente de 0,4 a 0,7. Cuando el grado de sustitución de los grupos carboxilo del carboximetil dextrano está en el intervalo descrito anteriormente, puede obtenerse fácilmente una alta sensibilidad de detección para el analito. Mientras tanto, el grado de sustitución de los grupos carboxilo de carboximetil dextrano se define como la proporción en que los residuos han sido sustituidos por grupos carboxilo en una molécula de carboximetil dextrano.

[Tercera etapa]

En la tercera etapa, se mide el segundo ligando unido al analito. El método para medir el segundo ligando se determina según sea apropiado según los tipos de marcador para marcar el segundo ligando y el dispositivo de detección.

En caso de que el marcador sea un colorante fluorescente, la tercera etapa puede llevarse a cabo de la siguiente manera.

El chip sensor del sensor de excitación de plasmón se irradia con luz láser a través de un prisma a través de una superficie del soporte, la superficie que no tiene ningún elemento de metal formado sobre ella, se mide la cantidad de fluorescencia emitida por el colorante fluorescente excitado y la cantidad del analito incluido en la muestra se calcula a partir de los resultados de la medición.

La fuente de luz para la irradiación en el momento de medir la cantidad de fluorescencia no está particularmente limitada siempre que la fuente de luz sea capaz de inducir la excitación del plasmón; sin embargo, desde los puntos de vista de la unidad de la distribución de la longitud de onda y la potencia de la energía luminosa, es preferible usar luz láser como fuente de luz. En cuanto a la luz láser, es deseable regular la energía y la cantidad de fotones inmediatamente antes de que la luz entre en el prisma, a través de un filtro óptico.

El plasmón superficial se genera en la superficie del elemento de metal mediante la irradiación de luz láser en condiciones de reflectancia total atenuada [ATR]. Como resultado de un efecto de mejora del campo eléctrico del plasmón superficial, el colorante fluorescente es excitado por fotones, cuya cantidad ha aumentado de varias docenas a varios cientos de veces la cantidad de fotones irradiados. Mientras tanto, la cantidad de fotones aumentada por el efecto de mejora del campo eléctrico depende del índice de refracción del soporte, y del tipo de metal y el grosor de la película del elemento de metal; sin embargo, la cantidad de aumento es normalmente de 10 a 20 veces en el caso de oro.

En un colorante fluorescente, cuando el electrón en las moléculas es excitado por la absorción de luz y pasa a un

primer estado de excitación de electrones en un periodo de tiempo corto, y el electrón regresa de este estado (nivel) al estado fundamental, el colorante fluorescente emite fluorescencia en la longitud de onda correspondiente a la diferencia de energía.

El tipo de fuente de luz no está particularmente limitado, y la fuente de luz puede no ser un diodo láser. Los ejemplos de la fuente de luz incluyen un diodo emisor de luz, una lámpara de mercurio y otras fuentes de luz láser. En el caso de que la luz emitida por la fuente de luz no sea un haz, la luz emitida por la fuente de luz se convierte en un haz por medio de una lente, un espejo, una rendija o similar. Además, en el caso de que la luz emitida por la fuente de luz no sea luz monocromática, la luz emitida por la fuente de luz se convierte en luz monocromática por medio de una rejilla de difracción o similar. Además, en el caso de que la luz emitida por la fuente de luz no sea luz polarizada linealmente, la luz emitida por la fuente de luz se convierte en luz polarizada linealmente por medio de un polarizador o similar.

El prisma está destinado a permitir que la luz láser que ha pasado a través de diversos filtros, tal como un filtro óptico, un filtro polarizador y un filtro de corte, que se usan según sea necesario, ingrese de manera eficiente al elemento de metal y, por tanto, es preferible que el índice de refracción es el mismo que el del soporte transparente. En la presente invención, pueden seleccionarse diversos prismas con los cuales pueden establecerse las condiciones de reflexión total según corresponda, no hay limitaciones particulares en cuanto al ángulo y la forma y, por ejemplo, el prisma puede ser un prisma de dispersión de 60 grados. Los ejemplos de productos comercialmente disponibles de tal prisma incluyen aquellos similares a los productos comercialmente disponibles del soporte transparente elaborado de vidrio tal como se describió anteriormente.

Los ejemplos del filtro óptico incluyen un filtro de atenuación [ND] y un filtro de diafragma. Un filtro de atenuación [ND] (o filtro de densidad neutra) está destinado a regular la cantidad de luz láser incidente. Particularmente, en el caso de usar un detector que tenga un intervalo dinámico estrecho, es preferible usar un filtro de atenuación desde el punto de vista de realizar la medición con alta precisión.

Se usa un filtro polarizador para convertir la luz láser en luz polarizada P que genera de manera eficiente el plasmón superficial.

Un filtro de corte es un filtro que elimina los ruidos ópticos, tal como la luz del exterior (luz de iluminación fuera de un aparato), la luz de excitación (componente transmitida de la luz de excitación), la luz parásita (componente dispersada de la luz de excitación en varios sitios) y la luz dispersada de plasmón (luz dispersada que se origina a partir de la luz de excitación y generada bajo el efecto de estructuras, uniones o similares en la superficie del chip sensor) y autofluorescencia de colorantes fluorescentes, y los ejemplos incluyen un filtro de interferencia y un filtro de color.

Se usa una lente condensadora con el fin de condensar eficientemente las señales de fluorescencia en un detector para medir la cantidad de fluorescencia, y puede usarse cualquier lente condensadora arbitraria. Como lente condensadora simple, pueden desviarse lentes del objetivo comercialmente disponibles (por ejemplo, productos fabricados por Nikon Corp. o fabricados por Olympus Corp.) que se usan en microscopios y similares. La razón de aumento de la lente del objetivo es preferiblemente de 10 a 100 veces.

El detector es preferiblemente un tubo fotomultiplicador (fotomultiplicador fabricado por Hamamatsu Photonics K.K.), desde el punto de vista de la ultra alta sensibilidad. Además, también es adecuado un sensor de imagen CCD capaz de realizar mediciones de múltiples puntos, ya que aunque la sensibilidad es menor en comparación con estos dispositivos, pueden visualizarse las imágenes y es fácil eliminar la luz de ruido.

Con respecto al método para calcular la cantidad de un analito incluido en una muestra a partir de los resultados de la medición, específicamente, puede mencionarse un método para producir una curva de calibración realizando la medición de un antígeno diana o un anticuerpo diana a una concentración conocida y calculando la cantidad del analito (antígeno diana) en la muestra a partir de la señal de medición basándose en la curva de calibración.

Además, al usar la señal de luminiscencia en blanco medida antes de la segunda etapa, la señal de luminiscencia del ensayo obtenida en la tercera etapa y las señales de ruido iniciales obtenidas al inmovilizar un sustrato metálico que no se modifica con nada en el canal de flujo y realizar la medición mientras se hace que agua ultrapura fluya a su través, puede calcularse la razón S/N representada por la siguiente fórmula (1a):

$$S/N = |I_a/I_o|/I_n \quad (1a)$$

en la que, en la fórmula (1a), la representa la señal de luminiscencia del ensayo; I_o representa la señal de emisión en blanco; e I_n representa la señal de ruido inicial.

Sin embargo, con motivo del cálculo de la razón S/N, para uso práctico, la razón puede calcularse según la siguiente fórmula (1b), en lugar de la fórmula (1a), en función de la señal de ruido de ensayo que puede obtenerse en el caso en el que la concentración del analito incluido en la muestra es 0:

$$S/N = |I_a|/|I_n| \quad (1b)$$

en la que, en la fórmula (1b), I_n representa la señal de ruido del ensayo; e I_a representa la señal de luminiscencia del ensayo similar al caso de la fórmula (1a).

Ejemplos

(1) Producción de dispositivo de detección

Se limpió con plasma un soporte transparente de vidrio ("S-LAL 10" fabricado por Ohara Corp.) que tenía un índice de refracción $[n_d]$ de 1,72 y un grosor de 1 mm, se formó una película delgada de cromo por un método de pulverización catódica sobre una superficie del soporte, y luego sobre esa superficie, se formó una película delgada de oro como elemento de metal sobre el soporte transparente mediante un método de pulverización catódica. El grosor de la película delgada de cromo fue de 1 a 3 nm, y el grosor de la película delgada de oro fue de 42 a 47 nm.

El soporte que tenía una película fina de oro formada como tal se sumergió durante 24 horas en 10 ml de una disolución de etanol de 10-amino-1-decanotiol preparada a 1 mM, y así se formó una SAM sobre una superficie de la película fina de oro. Posteriormente, este soporte se extrajo de la disolución de etanol y se limpió respectivamente con etanol e isopropanol, y luego se secó el soporte usando una pistola de aire.

Posteriormente, el soporte que tenía una SAM formada sobre el mismo se sumergió durante una hora en solución salina tamponada con MES [MES] (fuerza iónica 10 mM) a pH 7,4 que incluía 1 mg/ml de un carboximetil dextrano [CMD] que tenía un peso molecular de 500.000, imida de ácido N-hidroxisuccínico [NHS] a 0,5 mM, y una carbodiimida soluble en agua [WSC] a 1 mM, por tanto, CMD se inmovilizó como una capa de polímero hidrófilo en la SAM, y el éster de ácido succínico sin reaccionar se hidrolizó sumergiendo el soporte durante 30 minutos en una disolución acuosa de 1 mol/litro de NaOH. El grosor de película promedio de la capa de CMD fue de 70 nm y la densidad fue de 5,0 ng/mm².

Posteriormente, el soporte se sumergió durante una hora en MES que incluía NHS a 50 mM y WSC a 100 mM y luego se sumergió durante 30 minutos en una disolución de "anticuerpo" de anticuerpo monoclonal IgG anti-troponina I humana (Hytest, Ltd.), y de ese modo se inmovilizó un anticuerpo primario como primer ligando para CMD.

Además, el soporte se sometió a un tratamiento de prevención de adsorción no específico haciendo circular y suministrando durante 30 minutos PBS que incluía albúmina de suero bovino [BSA] al 1% en masa y aminoetanol 1 M.

Se produjo un dispositivo de detección montando un elemento de canal de flujo sobre el soporte que tenía el anticuerpo primario inmovilizado sobre el mismo. El elemento de canal de flujo tiene un canal de flujo a y un canal de flujo b que se extienden desde la superficie superior hasta la superficie inferior del elemento de canal de flujo y tiene una concavidad en la parte de la superficie inferior, y el elemento de canal de flujo tiene una estructura en la que los extremos inferiores del canal de flujo a y el canal de flujo b conducen respectivamente a los dos extremos de la concavidad. Al montar este elemento de canal de flujo en el soporte, la concavidad queda cubierta por el soporte como una tapa y, por tanto, se forma una cámara de reacción (región de medición). El anticuerpo primario inmovilizado se aloja en esta cámara de reacción. Es decir, el dispositivo de detección tiene un canal de flujo a y un canal de flujo b que se extienden desde la superficie superior del elemento de canal de flujo hasta la superficie superior del soporte; y una cámara de reacción que conduce al canal de flujo a y al canal de flujo b en los dos extremos y aloja un anticuerpo primario. En el dispositivo de detección, se inyecta un líquido en el canal de flujo a y se envía a la cámara de reacción, y luego el líquido puede descargarse a través del canal de flujo b.

(2) Producción de ligando marcado con marcador

Se produjo un anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 usando una disolución de "anticuerpo" de anticuerpo monoclonal IgG anti-troponina I humana (Hytest, Ltd.) y un kit de marcaje Alexa Fluor 647 (Invitrogen Corp.), según el procedimiento predeterminado del kit. Posteriormente, los reactivos sin reaccionar se eliminaron usando un filtro de corte de peso molecular (Nihon Millipore K.K.), se purificó el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 y se almacenó el anticuerpo a 4°C hasta que se llevó a cabo el siguiente ensayo.

[Ejemplo 1]

(Primera etapa)

Se suministraron 0,1 ml de una disolución de PBS que incluía troponina I humana a 100 pg/ml (0,1 ng/ml) a la cámara de reacción a través del canal de flujo a del dispositivo de detección. Posteriormente, se suministró solución salina tamponada con Tris (TBS) que incluía el 0,05% en masa de Tween 20 a la cámara de reacción a través del

canal de flujo a, al canal de flujo de un dispositivo de detección para SPFS, y se hizo circular durante 10 minutos, y así se limpiaron el canal de flujo y la cámara de reacción.

(Segunda etapa)

Se suministró una disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 a una concentración de 2 µg/ml y carboximetil dextrano (nombre comercial CMD-500, fabricado por Meito Sangyo Co., Ltd., peso molecular: 500.000) a una concentración de 2,5 mg/ml a la cámara de reacción a través del canal de flujo a del dispositivo de detección. Posteriormente, se suministró solución salina tamponada con Tris (TBS) que incluía el 0,05% en masa de Tween 20 a la cámara de reacción a través del canal de flujo a y se hizo circular durante 10 minutos, y así se limpiaron el canal de flujo y la cámara de reacción.

(Tercera etapa)

Se llevaron los canales de flujo a un estado en el que se llenaron con tampón PBS (pH 7,4), posteriormente, se irradió la superficie posterior de la película delgada de metal de la región de medición con luz láser (640 nm, 40 µW) a través de un prisma (fabricado por Sigma Koki Co., Ltd.), y se midió la cantidad de fluorescencia usando un tubo fotomultiplicador (PMT) instalado sobre la región de medición. Este valor de medición se designó como la señal de luminiscencia del ensayo la a una concentración de troponina I de 100 pg/ml.

Por otro lado, se suministró una disolución de PBS que no incluía troponina I en absoluto (0 pg/ml), en lugar de la disolución de PBS que incluía 100 pg/ml de troponina I, y se midió la cantidad de fluorescencia mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente, excepto por eso. Este valor de medición se designó como señal de ruido de ensayo lan.

Se determinó la razón S/N según la fórmula (1b) anterior. Los valores de la, lan y la razón S/N así obtenidos se presentan en las tablas 1 y 2. Además, se presenta la razón de la razón S/N aumentada con respecto a la razón S/N obtenida en el siguiente ejemplo comparativo 1 en la tabla 2 como la tasa de aumento de la razón S/N.

Mientras tanto, el carboximetil dextrano usado en la segunda etapa de cada ejemplo se describe como "CMD" como "sustancia aditiva" en las tablas 1 y 2.

[Ejemplos 2 a 4]

En los ejemplos 2 a 4, la detección del analito se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que en la segunda etapa descrita anteriormente, la concentración de carboximetil dextrano en la disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 y el carboximetil el dextrano se cambió a 5 mg/ml, 10 mg/ml y 30 mg/ml, respectivamente. Los valores de la, lan y razón S/N así obtenidos se presentan en la tabla 1.

[Ejemplo comparativo 1]

Se llevó a cabo la detección del analito de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que en la segunda etapa, se usó una disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 a una concentración de 2 µg/ml pero no incluía carboximetil dextrano en lugar de la disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 a una concentración de 2 µg/ml y carboximetil el dextrano a una concentración de 2,5 mg/ml. Los valores de la, lan y razón S/N así obtenidos se presentan en las tablas 1 y 2.

[Ejemplo comparativo 2]

La detección del analito se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que en la segunda etapa, se usó una disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 a una concentración de 2 µg/ml y el 1% en masa de polietilenglicol (PEG n.º 4000, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en lugar de la disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 a una concentración de 2 µg/ml y carboximetil dextrano a una concentración de 2,5 mg/ml. Los valores de la, lan y razón S/N así obtenidos se presentan en la tabla 1.

Mientras tanto, el polietilenglicol usado en la segunda etapa en los ejemplos comparativos 2 a 4 se describe como "PEG" como "sustancia aditiva" en la tabla 1.

[Ejemplos comparativos 3 a 4]

En los ejemplos comparativos 3 y 4, se llevó a cabo la detección del analito de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2, excepto que en la segunda etapa se cambió la concentración de polietilenglicol en la disolución de PBS que incluía el anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 y el polietileno el glicol al 3% en masa y al 5% en masa, respectivamente. Los valores de la, lan y razón S/N así obtenidos se presentan en la tabla 1.

[Ejemplos 5 a 9]

En los ejemplos 5 a 9, se llevó a cabo la detección del analito de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que se cambió el carboximetil dextrano usado en la segunda etapa por carboximetil dextrano (fabricado por Meito Sangyo Co., Ltd., peso molecular: 10.000), carboximetil dextrano (fabricado por Meito Sangyo Co., Ltd., peso molecular: 40.000), carboximetil dextrano (fabricado por Meito Sangyo Co., Ltd., peso molecular: 200.000) y carboximetil dextrano (fabricado por Meito Sangyo Co., Ltd., peso molecular: 1.000.000), respectivamente. Los valores de la, lan, razón S/N y la tasa de aumento de la razón S/N se presentan en la tabla 2.

[Tabla 1]

	Sustancia aditiva (concentración)	lan	la	Razón S/N
Ejemplo 1	CMD, peso molecular 500.000 (2,5 mg/ml)	376	829	2,20
Ejemplo 2	CMD, peso molecular 500.000 (5 mg/ml)	390	869	2,23
Ejemplo 3	CMD, peso molecular 500.000 (10 mg/ml)	490	1015	2,07
Ejemplo 4	CMD, peso molecular 500.000 (30 mg/ml)	872	1569	1,80
Ejemplo comparativo 1	-	413	592	1,43
Ejemplo comparativo 2	PEG (1%)	557	999	1,79
Ejemplo comparativo 3	PEG (3%)	874	1308	1,50
Ejemplo comparativo 4	PEG (5%)	1214	1523	1,25

[Tabla 2]

	Sustancia aditiva (concentración)	lan	la	Razón S/N	Tasa de aumento de la razón S/N (%)
Ejemplo comparativo 1	-	413	592	1,43	-
Ejemplo 5*	CMD, peso molecular 10.000 (5 mg/ml)	370	569	1,54	7%
Ejemplo 6	CMD, peso molecular 40.000 (5 mg/ml)	338	722	2,13	49%
Ejemplo 7	CMD, peso molecular 200.000 (5 mg/ml)	345	708	2,05	43%
Ejemplo 8	CMD, peso molecular 500.000 (5 mg/ml)	403	795	1,97	38%
Ejemplo 9*	CMD, peso molecular 1.000.000 (5 mg/ml)	326	760	2,33	63%
* no según la presente invención					

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un analito, comprendiendo el método:
 - 5 una primera etapa de suministrar una muestra a un dispositivo de detección que tiene un primer ligando, estando el primer ligando inmovilizado sobre un sustrato y capaz de unirse específicamente al analito, suministrándose la muestra sobre el sustrato del dispositivo de detección, y luego hacer que el analito incluido en la muestra se una al primer ligando;
 - 10 en el que el sustrato tiene un soporte; un elemento de metal formado sobre el soporte; una monocapa autoensamblada (SAM) formada sobre el elemento de metal; y una capa de polímero hidrófilo formada sobre la SAM y el primer ligando se inmoviliza en la capa de polímero hidrófilo;
 - 15 en el que el dispositivo de detección es un sensor de excitación de plasmones; y
 - en el que la capa de polímero hidrófilo se compone de carboximetil dextrano;
 - una segunda etapa de suministrar un segundo ligando sobre el sustrato, estando el segundo ligando marcado con un marcador y capaz de unirse específicamente al analito, y luego hacer que el segundo
 - 20 ligando se una al analito unido al primer ligando;
 - en el que en la segunda etapa se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato; teniendo el carboximetil dextrano un peso molecular de desde 40.000 hasta 750.000,
 - 25 una tercera etapa de medir el segundo ligando unido al analito; y
 - en el que la muestra se ha diluido con un disolvente seleccionado del grupo que consiste en solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris y solución salina tamponada con HEPES.
- 30 2. Método para detectar un analito según la reivindicación 1, en el que en la segunda etapa se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato a una concentración de 1 a 30 mg/ml.
3. Método para detectar un analito según la reivindicación 1 ó 2, en el que en la segunda etapa se suministra carboximetil dextrano sobre el sustrato junto con el segundo ligando.
- 35 4. Método para detectar un analito según la reivindicación 3, en el que en la segunda etapa se suministra sobre el sustrato un líquido que contiene el segundo ligando que contiene el segundo ligando y el carboximetil dextrano.
- 40 5. Método para detectar un analito según la reivindicación 1 ó 2, en el que en la segunda etapa el segundo ligando se suministra sobre el sustrato para hacer que el segundo ligando se una al analito, y luego se suministra carboximetil dextrano sobre el mismo.
- 45 6. Método para detectar un analito según la reivindicación 5, en el que en la segunda etapa después de hacer que el segundo ligando se una al analito, se suministra carboximetil dextrano incorporándolo en un líquido de limpieza para limpiar el sustrato.
7. Método para detectar un analito según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el analito es troponina I cardíaca (cTnI) o péptido natriurético cerebral (BNP).
- 50