

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 792

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

G01N 27/00 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01)
G01N 27/403 (2006.01)
G01N 33/549 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-483**
(22) Přihlášeno: **23.08.2017**
(40) Zveřejněno: **06.03.2019**
(Věstník č. 10/2019)
(47) Uděleno: **27.03.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **09.05.2019**
(Věstník č. 19/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2017/063074 A1; US 2016/0061834 A1; EP 0 668 502 A2; EP 0 142 301 A2; US 2001/0006825 A1; WO 2009/148406 A1; RO 129261 A1.

(73) Majitel patentu:

Masarykova univerzita, Brno, CZ

(72) Původce:

Mgr. Karel Lacina, Ph.D., Brno, Mokrý Hora, CZ
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Brno, Jundrov, CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Způsob stanovení přítomnosti analytu v
kapalném vzorku a jeho použití**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká způsobu stanovení přítomnosti analytu, který je vybrán ze skupiny sestávající z protilátky antigenu, v kapalném vzorku, který obsahuje kroky: (i) stanoví se hodnota elektrochemického parametru, vybraného z odporu, impedance, napětí a proudu, roztoku redoxní látky, která má opačný náboj než stanovený analyt; (ii) povrch pracovní elektrody obsahující imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem se inkubuje se vzorkem, přičemž v případě, že vzorek obsahuje stanovovaný analyt, se tento analyt naváže na imobilizované částice na povrchu elektrody za vzniku imobilizovaného komplexu analyt-imobilizovaná částice na povrchu elektrody; (iii) pracovní elektroda s imobilizovaným komplexem analyt-imobilizovaná částice se uvede do kontaktu s roztokem redoxní látky, která má opačný náboj než stanovovaný analyt; (iv) změří se elektrochemický parametr na rozhraní povrchu pracovní elektrody a roztoku redoxní látky ve vztahu k doplňkové elektrodě přítomné v kapalném vzorku; (v) z naměřené hodnoty elektrochemického parametru se vyhodnotí jeho změna oproti hodnotě stanovené v kroku (i), přičemž platí, že přítomnost analytu ve vzorku vede k poklesu hodnoty odporu, impedance, napětí, a k nárůstu proudu na rozhraní povrchu elektrody a roztoku redoxní látky; ze změny elektrochemického parametru se kvalitativně a/nebo semikvantitativně a/nebo kvantitativně stanoví přítomnost analytu v kapalném vzorku.

CZ 307792 B6

Způsob stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku a jeho použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu stanovení, přítomnosti analytu v kapalném vzorku a jeho použití zejména pro stanovení bakteriálních antigenů či odpovídajících protilátek v tělních tekutinách testovaných jedinců s podezřením na onemocnění, např. stanovení protilátek proti bakteriím kmene *Borelia sp.* v krevním séru.

Dosavadní stav techniky

Většina současných komerčních imunosenzorů vychází z imunochemických testů na bázi laterálního toku (lateral flow immunoassay, LFIA) s vizuální či optickou detekcí. Elektrochemické metody detekce pro imunosenzory nejsou rozšířené.

Dříve byly afinitní elektrochemické imunosenzory založeny na značení jednoho z interagujících partnerů dvojice antigen–protilátka. Jakožto značky mohly být použity enzymy či jiné redoxní látky, např. ferrocen (Okochi, Ohta, Tanaka, Matsunaga, Biotechnol Bioeng 90 (2005) 14). Dnešní přístupy nejčastěji využívají sledování změny elektrochemické impedance senzoru v závislosti na proběhlé afinitní interakci rekogniční složky s analytem.

Afinitní interakce sledované pomocí elektrochemické impedance využívají vznik komplexu mezi různými molekulami. Mohou to být interakce např. mezi aptamery a adenosinem (Zayats, Huang, Gill, Ma, Willner, J Am Chem Soc 128 (2006) 13666) nebo protilátkami a antigeny (Susmel, Guilbault, O'Sullivan, Biosens Bioelectron 18 (2003) 881). Susmel a spol. měřili pokles difúzního koeficientu redoxní próby při zachycení bakterií (potravinových patogenů) na povrch elektrody.

Na povrchu biosenzorů založených na imunoafinitních interakcích dochází k nárůstu hmoty, proto je nejčastější variantou detekce měření nárůstu impedance (míra odporu prostupu nabitých látek skrz tuto vrstvu biomolekul). Měření nárůstu impedance bylo použito také při detekci bakterií kmene *Salmonella sp.* (Kim, Moon, Hahm, Morgan, Bhunia, Om, Food Sci Biotechnol 18 (2009) 89) či *Escherichia coli* (Yang, Li, Erf, Anal Chem 76 (2004) 1107, Maalouf, Fournier–Wirth, Coste, Chebib, Saikali, Vittori, Errachid, Cloarec, Claude Martelet, Jaffrezic–Renault, Anal Chem 79 (2007) 4879). Stanovení *Escherichia coli* bylo založeno na vysrážení nevodivé vrstvy, přičemž množství precipitátu stínícího elektroaktivní povrch bylo přímo úměrné množství navázané bakterie (Ruan, Zang, Li, Anal Chem 74 (2002) 4814). Signál – nárůst impedance – byl tak zesílen.

Nanomateriály pro afinitní diagnostiku jsou velmi rozšířené (Wang, Analyst 130 (2005) 421), ale používají se především jako značky pro zesílení signálu (Wan, Su, Zhu, Liu, Fan, Biosens Bioelectron 47 (2013) 1; Mwilu, Aluoch, Miller, Wong, Sadik, Fatah, Arcilesi, Anal Chem 81 (2009) 7561).

Principem impedančního stanovení imunoreakcí ze stavu techniky je blokáce či "zaizolování" povrchu elektrody při detekční reakci mezi specificky modifikovanou elektrodou a analytem. Prostup redoxní značky skrz modifikační vrstvu na povrchu detekční elektrody je snížen vytvořeným afinitním párem (např. protilátka–antigen, receptor–ligand či jinou kombinací komplementárních biomolekul), čímž dojde k tzv. difúzní limitaci velikosti faradaického proudu generovaného elektrochemickou reakcí redoxní značky na elektrodě (sníží se vstup redoxní značky proteinovou/modifikační vrstvou na elektrodě). V některých případech se tento princip zesiluje pomocí různých prostředků. Mohou to být membrány, např. vytvořené pomocí aluminiové matrice (Koh, Agarwal, Cheow, Toh, Electrochim Acta 53 (2007) 803), kdy detekční princip využíval blokaci póru, jehož stěny byly modifikovány jedním z partnerů imunoreakce.

Pro elektrochemická měření byly použity litograficky připravené elektrody s následnou galvanizací především pro běžný způsob měření v nastavení: Au pracovní, resp. pomocná elektroda a Ag referenční elektroda (La Belle, Shah, Reed, Nandakumar, Alford, Wilson, Nickerson, Joshi, *Electroanalysis* 21 (2009) 2267; La Belle, Gerlach, Svárovsky, Joshi, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6959; Bhavsar, Fairchild, Alonas, Bishop, La Belle, Sweeney, Alford, Joshi, *Biosensor. Bioelectron.* 25 (2009) 506). Elektrochemické měření pak bylo prováděno obvyklým způsobem, kdy se na pracovní elektrodě nastavuje potenciál proti hodnotě potenciálu referenční elektrody. Nejčastěji použité měřicí elektrochemické metody jsou impedanční a voltametrická měření.

Nemoc lymská borelióza je způsobena infekcí bakterií kmene *Borrelia sp.* V Evropě je převažující infekce druhu *B. afzelii* a *B. garinii* a v Severní Americe je to *B. burgdorferi*. Tato bakteriální infekce je v současné době nejčastěji diagnostikována pomocí metody ELISA, kdy čas pro diagnózu je několik hodin. Přesnějšími metodami jsou Western blot či PCR, kde minimální čas pro diagnózu je 14–ti hodinová analýza. V tomto časovém úseku však není zohledněno odebrání vzorku, transport, zpracování vzorku, dále komunikace a interpretace výsledků. Jelikož se stanovení provádí pouze ve specializovaných laboratořích, udává se doba jedné analýzy minimálně 3 dny. I přes existující diagnostický systém pro odhalení infekce bakteriemi kmene *Borelia sp.* chybí možnost rychlého a levného stanovení v domácích podmínkách nebo u praktického lékaře, ke kterému by nebylo zapotřebí analyzovat vzorek ve speciálně vybavené laboratoři.

Zdlouhavost, komplikovanost a finanční náročnost stanovení analytu, zejména protilátek proti lymské borelióze, dle stavu techniky řeší předkládaný vynález, který umožňuje udělat si předběžný screening u lékaře nebo doma (při podezření na infekci, např. v prvotní fázi imunitní odpovědi organismu po přisátí infikovaného klíštěte či poštípání hmyzem), který doposud na trhu chybí.

30 Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku, který obsahuje následující kroky:

- 35 (i) stanoví se hodnota elektrochemického parametru, vybraného ze skupiny sestávající z odporu, impedance, napětí a proudu, systému, tvořeného povrchem pracovní elektrody, obsahující imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem, ponořené v roztoku redoxní látky, která má opačný náboj než stanovovaný analyt, přičemž rozpouštědlem redoxní látky je s výhodou voda, vodný roztok pufru, s výhodou o pH 4 až 9, nebo fyziologický roztok, a přičemž s výhodou je koncentrace redoxní látky v roztoku v rozmezí od 10^{-4} M do 1 M, s výhodou od 1 do 20 mM; případně se povrch pracovní elektrody omyje, s výhodou destilovanou vodou nebo fyziologickým roztokem, a následně se zbaví přebytečné kapaliny;
- 40 (ii) povrch pracovní elektrody obsahující imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem, vybrané ze skupiny sestávající z protilátky a antigenu, přičemž pokud je imobilizovanou částicí protilátka, je analytem antigen a *vice versa*, se inkubuje s kapalným vzorkem, přičemž v případě, že vzorek obsahuje stanovovaný analyt, se tento analyt naváže na imobilizované částice, s výhodou antigen nebo protilátku, na povrchu elektrody za vzniku afinitního komplexu analyt–imobilizovaná částice na povrchu elektrody; doba inkubace je s výhodou v rozmezí od 5 do 120 minut při teplotě od 10 do 40 °C a pH 4 až 9, případně se povrch pracovní elektrody s imobilizovaným afinitním komplexem analyt–imobilizovaná částice omyje, s výhodou destilovanou vodou nebo fyziologickým roztokem a následně se zbaví přebytečné kapaliny;
- 50 (iii) pracovní elektroda s imobilizovaným afinitním komplexem analyt–imobilizovaná částice se uvede do kontaktu se stejným koncentrovaným roztokem téže redoxní látky jako v kroku (i), která má opačný náboj než stanovovaný analyt, přičemž rozpouštědlem redoxní látky je s výhodou
- 55

voda, vodný roztok pufru, s výhodou o pH 4 až 9, nebo fyziologický roztok, přičemž koncentrace redoxní látky v roztoku je v rozmezí od 10^{-6} M do 1 M, s výhodou od 1 do 20 mM;

(iv) stanoví se hodnota elektrochemického parametru, vybraného ze stejnosměrného proudu, stejnosměrného napětí, odporu, střídavého proudu, střídavého napětí, impedance, na rozhraní povrchu pracovní elektrody a roztoku redoxní látky ve vztahu k doplňkové elektrodě přítomné v kapalném vzorku, přičemž redoxní látka má opačný náboj než stanovovaný analyt, s výhodou je měřeným elektrochemickým parametrem elektrický proud nebo napětí, ze kterých se následně stanoví impedance systému;

(v) z hodnoty stanoveného elektrochemického parametru v kroku iv) se určí změna elektrochemického parametru vůči elektrochemickému parametru roztoku redoxní látky stanovenému v kroku i), přičemž platí, že přítomnost analytu ve vzorku vede k poklesu odporu, impedance a napětí, a k nárůstu proudu. Ze změny elektrochemického parametru, s výhodou impedance, se kvalitativně a/nebo semikvantitativně a/nebo kvantitativně stanoví přítomnost analytu v kapalném vzorku.

Uvedeným způsobem lze stanovit analyt v rozmezí koncentrací v kapalném vzorku od jednotek ng/ml do jednotek mg/ml.

Pro stanovení elektrochemického parametru lze použít metody potenciometrie, voltametrie, amperometrie nebo biamperometrie, s výhodou biamperometrie, a jím příslušné elektrodové uspořádání. Odborník znalý oboru by byl bez vynaložení vynálezecké činnosti schopen určit vhodné elektrodové uspořádání, typy a počet elektrod.

S výhodou se kapalný vzorek nakápne přímo na pracovní elektrodu, v případě biamperometrie na elektrodový systém, a měření probíhá v nakápnutém vzorku. Tentýž vzorek se nakápne rovněž na doplňkovou/referenční elektrodu, aby byly elektrody vodivě spojeny měřeným vzorkem. Snižuje se tím instrumentální náročnost tohoto způsobu stanovení i chyba měření, která by mohla vzniknout např. při převádění vzorku do měřicí nádoby, oplachu elektrody apod. Kapalným vzorkem se rozumí např. vzorek krevního séra nebo krve subjektu.

Optimální (nejcitlivější) detekční technikou je stanovení změny impedance pracovní elektrody či v případě biamperometrie elektrodového systému v roztoku redoxní značky před a po inkubaci s kapalným vzorkem. Nejvýhodnější je měření impedance při nižších hodnotách frekvence (nejčastěji v rozmezí do 1000 Hz), kdy se uplatňuje jak vliv analytu na střídavou, tak i na stejnosměrnou složku budícího signálu, resp. stanovované impedance. Měření probíhá tak, že se mezi dvě elektrody v roztoku vloží střídavé napětí a měří se prošlý proud – velikost a jeho fázové posunutí proti vloženému napětí, z čehož se následně dopočítá hodnota impedance. Měří se výstupní signál, resp. impedance, čímž se rozumí vliv reakce imobilizované částice s analytem na budící signál. Střídavá složka budícího signálu je ovlivněna obousměrným pohybem iontů směrem k elektrodě a od elektrody; stejnosměrná složka je ovlivněna jednosměrným tokem iontů k elektrodě nebo od elektrody. Jako detekční elektrochemickou metodu lze použít rovněž jiné než impedanceční techniky, jako např. různé voltametrické či amperometrické metody sledující průchodnost iontů modifikační vrstvou nebo změny napětí generované ne/přítomností nabitých protilátek.

Další možností měření je také způsob, kdy se vzorek nanese na elektrodový systém, kde je přítomna imobilizovaná částice (komplementární partner imunoreakce) a současně i redoxní látka v pevné formě. Tento elektrodový systém (při použití biamperometrie) nebo pracovní elektroda (při použití ostatních výše uvedených metod stanovení) se připraví tak, že se pracovní elektroda, případně elektrodový systém, obsahující imobilizované částice pro afinitní reakci s analytem, uvede do kontaktu s roztokem redoxní látky a stanoví se elektrochemický parametr (krok i)). Následně se pracovní elektroda / elektrodový systém ponechá na vzduchu zaschnout, čímž dojde k adsorpci redoxní látky na povrch pracovní elektrody / elektrodového systému. Přídavkem kapalného vzorku s analytem dojde současně k interakci analytu s modifikovaným povrchem (krok ii)) a k rozpuštění redoxní látky (krok iii)), v jejímž roztoku poté proběhne měření

- elektrochemické veličiny. Jelikož dojde ke změně elektrochemického parametru povrchu pracovní elektrody / elektrodového systému navázáním analytu, dojde současně i ke změně signálu redoxní látky, z čehož lze v následujících krocích iv) a v) stanovit přítomnost a případně rovněž koncentraci analytu ve vzorku. Celá procedura stanovení je tak uskutečněna bez potřeby oplachu elektrody a výsledek je znám v minimálním čase po odběru vzorku. Aby byla dodržena podmínka stejné koncentrace redoxní látky v kroku (i) a kroku (iii), musí být objem vzorku, který se nakápne na elektrodový systém v kroku (ii), stejný jako objem roztoku redoxní látky v kroku (i), který byl po změření elektrochemického parametru ponechán zaschnout na elektrodovém systému. Například pokud bylo v kroku (i) nakápnuto na elektrodu / elektrodový systém 5 uF roztoku redoxní látky známé koncentrace, byla změřena elektrochemická veličina a kapka se následně vysušila (čímž došlo k adsorpci redoxní látky na povrch elektrody), musí se pro vlastní měření nakápnout na elektrodu rovněž 5 $\square$ l kapalného vzorku. Tím vznikne stejná koncentrace redoxní látky v kapalném vzorku, potenciálně obsahujícím stanovovaný analyt.
- Ve výhodném provedení je imobilizovanou částicí pro afinitní interakci s analytem na povrchu pracovní elektrody celobuněčný antigen bakterie kmene *Borrelia sp.* a analytem je protilátka proti bakteriím kmene *Borrelia sp.*
- V jednom provedení je redoxní látkou záporně nabitý hexakynoželezitan draselný a hexakynoželezitan draselný. Je možné použít i jiné typy redoxaktivních látek přednostně nesoucí kladný či záporný náboj. Mezi látky s kladným nábojem patří např. hexaaminruthenium(II/III) chlorid, kobaltocen, ferrocen či aminoferocen, látky se záporným nábojem např. I^-/I_3^- či ferocenkarboxylová kyselina.
- V jednom provedení měření elektrochemického parametru pro stanovení impedance na rozhraní povrchu pracovní elektrody a roztoku redoxní látky ve vztahu k doplňkové elektrodě přítomné v kapalném vzorku v kroku (iv) je měření elektrického proudu a/nebo elektrického napětí pomocí amperometrie, biamperometrie, potenciometrie a/nebo voltametrie, nejvýhodnější je použití biamperometrie.
- S výhodou měření elektrického proudu a/nebo elektrického napětí proběhne při hodnotách frekvence střídavého proudu/napětí v rozmezí od jednotek Hz do stovek kHz. Výhodné je omezit měření na jednu či dvě frekvence, čímž se výrazně zjednoduší, zrychlí a zlevní celé stanovení, což je vhodné zejména pro nízkonákladové detekce.
- Ve výhodném provedení proběhne měření elektrochemického parametru v kroku (iv) biamperometrickou metodou za použití dvou stejných pracovních elektrod s imobilizovanými částicemi pro afinitní interakci s analytem. V případě použití biamperometrie jsou pracovní elektrody modifikovány stejně (stejný povrch o stejné velikosti je i stejně modifikovaný – potenciál mezi těmito elektrodami je tudíž nulový), tudíž mají stejné elektrochemické vlastnosti a měření může probíhat při vloženém nulovém potenciálu, což zjednodušuje analýzu. Dalším faktorem zvyhodňujícím použité měřicí uspořádání je fakt, že bez použití biamperometrie, kdy je impedance měření (vložení střídavého budicího signálu o amplitudě 5 až 10 mV) prováděno při nulovém offsetu stejnosměrné složky napětí, by nebylo možné měřit malé rozdíly ve změně rozložení náboje na rozhraní elektroda/roztok. Při měření v klasickém uspořádání s pracovní a referenční elektrodou je vložen buď potenciál vhodný pro měření redoxního mediátoru, čímž se systém vychýlí z rovnováhy vzhledem k potenciálovému rozdílu systému dvou elektrod vložených do roztoku (elektroda/roztok-roztok/elektroda), nebo v druhém případě, kdy systém není vychýlen vzhledem k rozdílu potenciálu elektroda/roztok-roztok/elektroda, je systém vychýlen vzhledem k redoxnímu potenciálu redoxního páru mediátoru. Tyto rozdíly v aplikovaném potenciálu offsetu při měření biamperometrií nenastávají.
- Pracovní elektrodou pro detekci analytu v kapalném vzorku je s výhodou elektroda vybraná ze skupiny zahrnující kovovou a uhlíkovou elektrodu, s výhodou je elektroda vybraná ze skupiny obsahující měďnou, stříbrnou, platinovou, zlatou, nerezovou a kompozitní uhlíkovou elektrodu,

- a na povrchu obsahuje imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem, s výhodou jsou imobilizovanými částicemi antigen nebo protilátka. S výhodou lze pracovní elektrodu připravit sítotiskem nebo fotolitograficky dle obecně známých postupů (patent 291411 a La Belle, Gerlach, Svarovsky, Joshi, Analytical Chemistry 79 (2007) 6959). Imobilizované částice pro interakci s analytem jsou navázané, s výhodou kovalentně, na polymerní vrstvě nesoucí aktivovatelné funkční skupiny. Tato polymerní vrstva je adherovaná na povrchu pracovní elektrody. Polymerní vrstvou může být například poly-L-lysin, polyallylamin, polyethylenimin, chitosan, polyakrylová kyselina a jiné.
- 10 Ve výhodném provedení je pracovní elektrodou pro detekci analytu v kapalném vzorku kovová nebo uhlíková elektroda, která na svém povrchu obsahuje adsorbovaný poly-L-lysin a/nebo polyallylamin a/nebo polyethylenimin, ke kterému jsou kovalentně navázány částice pro afinitní interakci s analytem, s výhodou antigen nebo protilátka. Nejvýhodněji je pracovní elektroda zlatá nebo platinová, potažená vrstvou poly-L-lysinu o tloušťce 20 až 50 nm (Colville, Tompkins, Rutenberg, Jericho, Langmuir 2010 26 (4), 2639) s kovalentně navázaným celobuněčným antigenem bakterie kmene *Borrelia sp.*

Způsob přípravy pracovní elektrody pro detekci analytu v kapalném vzorku způsobem podle předkládaného vynálezu obsahuje následující kroky:

- 20 (i) kovová nebo uhlíková elektroda se inkubuje s kladně nabitým polymerním nosičem nesoucím volné/konjugovatelné aminoskupiny (tj. polymerní nosič se vyznačuje takovým zastoupením aminoskupin ve své struktuře, že má celkový náboj kladný při fyziologickém pH, což znamená, že hodnota p_i takového nosiče je nad hodnotou pH 7,4), zejména s poly-L-lysinem a/nebo polyallylaminem a/nebo polyethyleniminem, s výhodou o molekulové hmotnosti od 30 do 70 kDa, po dobu alespoň 30 minut; následně se opláchne vodou či pufrem, případně se přebytek oplachovacího roztoku odfoukne v proudě stlačeného vzduchu.
- 25 (ii) výsledná elektroda potažená vrstvou kladně nabitého polymerního nosiče obsahujícího volné aminoskupiny, s výhodou potažená vrstvou poly-L-lysinu a/nebo polyallylaminu a/nebo polyethyleniminu, se inkubuje s roztokem nízkomolekulární látky o molekulové hmotnosti do 1000 kDa, nesoucí alespoň dvě karboxylové skupiny, z nichž alespoň jedna je aktivovaná pro konjugaci s aminoskupinami polymerního nosiče, s výhodou je touto nízkomolekulární látkou kyselina citrónová s EDC/NHS aktivovanou alespoň jednou COOH skupinou, po dobu alespoň 15 minut za vzniku karboxylem modifikovaného povrchu ve formě monovrstvy, karboxylové skupiny pro vazbu k poly-L-lysinu a/nebo polyallylaminu a/nebo polyethyleniminu se aktivují pomocí karbodiimidu, s výhodou EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid), za vzniku kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou nízkomolekulární látky nesoucí alespoň dvě karboxylové skupiny a aminovou skupinou poly-L-lysinu a/nebo polyallylaminu a/nebo polyethyleniminu.
- 30 (iii) pro vazbu k částicím pro afinitní interakci se zbývající volné karboxylové skupiny na povrchu elektrody aktivují pomocí karbodiimidu, s výhodou EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid), a N-hydroxysukcinimidu po dobu alespoň 20 minut za vzniku aktivních esterů na povrchu polymerní (s výhodou poly-L-lysinové) vrstvy;
- 35 (iv) částice pro afinitní interakci s analytem reagují s N-hydroxysukcinimidem aktivovanými karboxylovými skupinami na povrchu polymerního nosiče během alespoň 30 minut inkubace za vzniku kovalentní vazby mezi polymerním nosičem, kterým je potažen povrch elektrody, a částicí pro afinitní reakci s analytem.

S výhodou je kladně nabitým polymerním nosičem poly-L-lysin, nízkomolekulární látkou nesoucí alespoň dvě karboxylové skupiny je kyselina citrónová a částicí pro afinitní reakci s analytem je celobuněčný antigen bakterie kmene *Borrelia sp.*

Elektrodu lze vyrobit s vynaložením jen nízkých nákladů použitím metody sítotisku (výroba sítotiskových elektrod) nebo fotolitografických metod (metoda tvorby desek plošných spojů). Litograficky generované tvary (nejčastěji měděné) pak mohou být modifikovány, např.

galvanickým pokovením, kdy jako materiály vylučované na litograficky generované měděné struktury jsou použity nejčastěji ušlechtilé kovy jako zlato, platina, stříbro, paladium či jejich kombinace (směs či různé pokrytí různých elektrod). Použity mohou být i elektrody vyrobené jiným způsobem (např. pastové uhlíkové). Díky nízkým nákladům je možné celou elektrodu
5 použít pouze pro jediné měření, odpadá tak problém s infekčností vzorku.

Výstupní signál může být zobrazený na obrazovce připojeného počítače, integrovaného displeje nebo formou signalizace svitu světlo emitující diody při nastavené určité hraniční hodnotě signálu. Při nastavení hraniční hodnoty signálu mezi pozitivní a negativní hodnotou analytu ve
10 vzorku lze signalizaci zjednodušit na pouhý svit LED – např. negativní signál – svítí zelená barva, pozitivní signál – svítí červená barva.

Řídicí jednotkou může být například mobilní telefon, který slouží jako napájecí zdroj a/nebo jako měřicí přístroj pro měření a zobrazování signálu impedance, popřípadě prostřednictvím vestavěného modulu fotoaparátu kvantitativně odečíst intenzitu svitu indikační světelné diody.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití způsobu stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku podle předkládaného vynálezu pro kvalitativní a/nebo kvantitativní a/nebo semikvantitativní detekci přítomnosti protilátky a/nebo antigenu a/nebo bakterií v kapalném
15 vzorku.

Ve výhodném provedení je použití pro detekci přítomnosti protilátek proti bakteriím kmene *Borrelia sp.* v kapalném vzorku.

Předkládaný vynález umožňuje rychlé stanovení analytu v kapalném vzorku prostřednictvím afinitní interakce mezi specificky modifikovaným povrchem elektrody a detekovanou látkou, analytem. Principem je detekce imunoafinitní interakce, kdy vazba například protilátky na antigenem modifikovaný povrch způsobí pokles impedance v prostředí negativně nabitě redoxní látky, přičemž míra poklesu impedance odpovídá množství navázaného analytu (např. protilátky) na povrch elektrody, resp. koncentraci protilátky ve vzorku. Podmínkou pro správnou funkci je
25 kombinace opačně nabitě redoxní značky a analytu vázajícího se na detekční povrch, např. záporně nabitá redoxní značky a pozitivně nabitý analyt (protein) za daného pH (např. za fyziologického pH 7,4 nebo nižšího pH).

Tento princip stanovení je odlišný od stavu techniky, kde při detekci imunoafinitních interakcí dochází k nárůstu impedance při navázání proteinu na povrch - vrstva proteinu způsobí snížení propustnosti modifikační vrstvy elektrody prostupujícím látkám, což má za následek zvýšení odporu přenosu hmoty a tím i nárůst odporu/impedance.

Způsob stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku podle předkládaného vynálezu je proveden metodou přímého stanovení (není použit měřicí přístup kompetice apod.) a měření je provedeno bez použití značky (ve smyslu značky jakožto signální molekuly konjugované s jedním partnerem z detekční afinitní interakce).

45 Objasnění výkresů

Obr. 1: Blokové schéma impedančního analyzátoru sestávající z počítače 1, USB převodníku 2, mikrokontroléru 3, zesilovače 4, senzoru 5, I/U převodníku 6 a uživatelského rozhraní 7. Vztahová značka 8 označuje vlastní impedanční analyzátor.

Obr. 2: Stanovení analytu, anti-HSA protilátek (HSA, lidský sérová albumin), v prostředí 1 mg/ml balastního proteinu BSA (hovězí sérový albumin) ověřenou metodou. Znázornění hodnot reálné složky impedance měřené při frekvenci 2 Hz, amplituda 10 mV v prostředí 5 mM ferri/ferrokyanidu.

Obr. 3: Příklad změny reálné složky elektrochemické impedance pro negativní a pozitivní vzorek přítomnosti anti-Borrelie protilátek v krevním séru. Zobrazena je reálná složka impedance pro celé proměřované frekvenční spektrum 6 stejných litograficky připravených elektrod – elektrody se stejnými výchozími vlastnostmi. Tři byly inkubovány s pozitivním a tři byly inkubovány s negativním vzorkem krevního séra.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: *Konstrukce elektrody, zapojení měřicího přístroje a stanovení koncentrace modelového analytu protilátky anti-HSA ve vzorku*

Měření impedance je možné uskutečnit jakýmkoli měřicím přístrojem vhodným pro měření impedance. S výhodou lze použít miniaturizovaný impedanční analyzátor (blokové schéma na obr. 1).

Modifikace elektrod byla provedena kombinací poly-L-lysinu s následnou vazbou antigenu (lidský sérový albumin, HSA) skrze citrát aktivovaný EDC (karbodiimid). Takto modifikovaný povrch byl následně inkubován se vzorkem analytu (anti-HSA protilátky). Nakonec byla elektroda ponořena do roztoku redoxní látky (ferri/ferrokyanid) a byla změřena její elektrochemická impedance v tomto roztoku. Ze změn impedance byla stanovena koncentrace analytu (anti-HSA) ve vzorku. S klesající impedancí roste koncentrace protilátky ve vzorku (obr. 2).

Detailní popis metodiky:

- Elektrody byly pokryty vrstvou poly-L-lysinu po 30 min inkubaci v roztoku 50 g/ml poly-L-lysin, 50 mM PBS pH 7,4 (30 až 70 kDa).
- Aktivace povrchu pomocí 50 mM kyseliny citrónové s 150 mM EDC/NHS v prostředí 500 mM MES pufru pH 5,6 po dobu 30 min. Aktivované molekuly s karboxylovými skupinami umožní následnou vazbu molekul proteinu.
- Bezprostředně po předchozím kroku inkubace 60 min s 1 mg/ml HSA/100 mM MES pH 5,6, třepáno 150 rpm. Tímto dojde k navázání proteinu na povrch elektrod.
- 30 až 45 min inkubace s protilátkou anti-HSA v prostředí 1 mg/ml BSA, 50 mM PBS pH 7,4, třepáno 150 rpm, 4 l l
- Každý krok je následován oplachem destilovanou vodou a osušení v proudu stlačeného vzduchu.
- Měření impedance elektrod v prostředí 2,5 mM ferrikyanidu a 2,5 mM ferrokyanidu v 50 mM PBS pufru, pH 7,4.

Na obr. 2 je znázorněno stanovení třech koncentrací anti-HSA (0, 50, 200 µg/ml) v roztoku proteinu BSA (hovězí sérový albumin) o koncentraci 1 mg/ml, který představuje velké množství balastních specificky neinteragujících proteinů přítomných v reálných vzorcích, tzn. signál pozadí vzorku. Každá hodnota koncentrace byla stanovena ve čtyřech opakováních – každá hodnota představuje jeden separátní elektrodový systém modifikovaný a měřený dle popisu metodiky.

Příklad 2: *Stanovení koncentrace protilátky anti-Borrelie ve vzorku*

Stejným způsobem jako v Příkladu 1 bylo stanoveno množství (přítomnost) anti-Borrelie protilátek ve vzorku krevního séra. V tomto případě se postupovalo stejně jako v Příkladu 1, jen místo proteinu HSA se navázal celobuněčný antigen Borrelie (koncentrace 0,1 mg/ml v 100 mM MES pufru o pH 5,6). Po modifikaci antigenem je elektroda inkubována se zředěným vzorkem séra, které potencionálně obsahuje anti-Borrelia protilátky. Ze změn impedance měřených v

roztoku ferri/ferrokyanidu lze stanovit přítomnost těchto protilátek v séru (obr. 3). Dva vzorky lidských sér (jeden pozitivní, druhý negativní z pohledu přítomnosti anti-Borelie protilátek) byly měřeny šesti různými elektrodoovými systémy připravenými dle popisu. Křivky v obr. 3 jsou záznamy měření impedance jednotlivých elektrod při různých frekvencích (rozpětí od 2 Hz do 100 000 Hz). Data jsou ve formě Nyquistova grafu. Pozitivní vzorek obsahuje 3,04 IP protilátek, což je množství protilátek vyjádřených v indexu positivity stanovené metodou ELISA (index positivity je poměr optické denzity vzorku k optické denzitě hraniční kontroly). Negativní sérum neobsahuje žádné protilátky anti-Borelie.

Průmyslová využitelnost

Vynález je zejména vhodný k rychlému a levnému stanovení bakteriálních antigenů či odpovídajících protilátek v tělních tekutinách testovaných jedinců s podezřením na onemocnění, např. stanovení protilátek proti bakteriím kmene *Borelia sp.* v krevním séru. Vynález lze použít pro jakákoli serologická stanovení – stanovují se protilátky vytvářené proti patogenu, toxinu či jiné cizorodé látce.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku, **vyznačený tím**, že obsahuje následující kroky:

(i) stanoví se hodnota elektrochemického parametru, vybraného ze skupiny sestávající z odporu, impedance, napětí a proudu, roztoku redoxní látky, která má opačný náboj než stanovovaný analyt, přičemž analytem je protilátka nebo antigen;

(ii) povrch pracovní elektrody obsahující imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem, vybrané ze skupiny sestávající z protilátky a antigenu, přičemž pokud je imobilizovanou částicí protilátka, je analytem antigen a *vice versa*, se inkubuje s kapalným vzorkem, přičemž v případě, že vzorek obsahuje stanovovaný analyt, se tento analyt naváže na imobilizované částice na povrchu elektrody za vzniku imobilizovaného komplexu analyt-imobilizovaná částice na povrchu elektrody;

(iii) pracovní elektroda s imobilizovaným komplexem analyt-imobilizovaná částice se uvede do kontaktu s roztokem redoxní látky, která má opačný náboj než stanovovaný analyt;

(iv) stanoví se hodnota elektrochemického parametru na rozhraní povrchu pracovní elektrody a roztoku redoxní látky ve vztahu k doplňkové elektrodě přítomné v kapalném vzorku;

(v) z hodnoty stanoveného elektrochemického parametru se určí změna elektrochemického parametru vůči elektrochemickému parametru roztoku redoxní látky stanovenému v kroku i), přičemž platí, že přítomnost analytu ve vzorku vede k poklesu odporu, impedance a napětí, a k nárůstu proudu; ze změny elektrochemického parametru se kvalitativně a/nebo semikvantitativně a/nebo kvantitativně stanoví přítomnost analytu v kapalném vzorku.

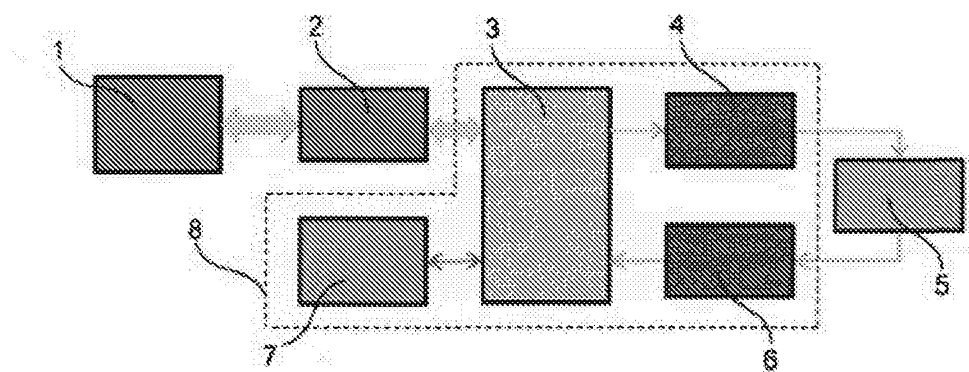
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že se kroky ii) a iii) provedou současně ve vzorku nakápnutém na pracovní elektrodu, která obsahuje imobilizované částice pro interakci s analytem a současně rovněž adsorbovanou redoxní látku.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačený tím**, že imobilizovanou částicí pro afinitní interakci s analytem na povrchu pracovní elektrody je celobuněčný antigen bakterie kmene *Borrelia sp.* a analytem je protilátka proti bakteriím kmene *Borrelia sp.*

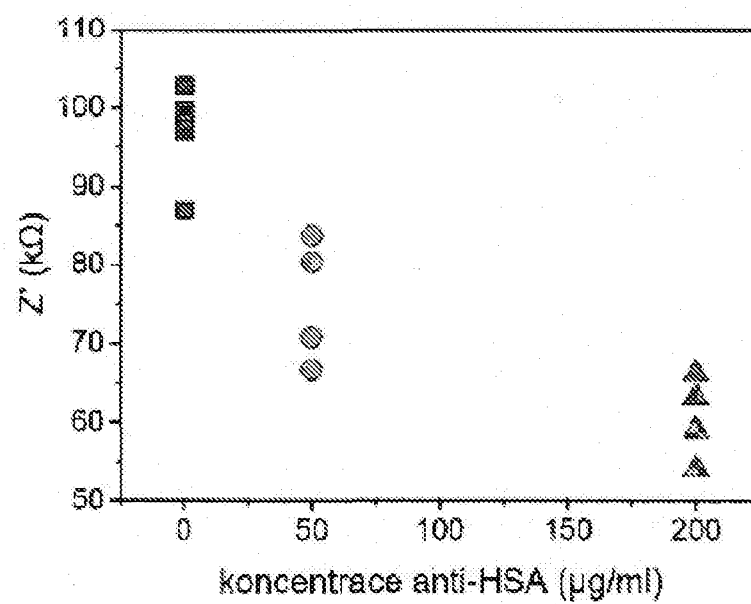
4. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačený tím**, že redoxní látka je vybraná ze skupiny obsahující hexakynoželezitan draselný, hexakynoželezitan draselný, hexaaminruthenium(II/III) chlorid, kobaltocen, ferrocen, aminoferocen, I/I_3^- , ferocenkarboxylová kyselina.

5. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačený tím**, že měření elektrochemického parametru pro stanovení impedance na rozhraní povrchu pracovní elektrody a roztoku redoxní látky ve vztahu k referenční elektrodě přítomné v kapalném vzorku v kroku (iv)
- 5 je měření elektrického proudu a/nebo elektrického napětí pomocí amperometrie, biamperometrie, potenciometrie, a/nebo voltametrie, nejvýhodněji pomocí biamperometrie za použití dvou stejných pracovních elektrod s imobilizovanými částicemi pro afinitní interakci s analytem.
6. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačený tím**, že pracovní elektroda pro
- 10 detekci analytu v kapalném vzorku je vybraná ze skupiny zahrnující kovovou a uhlíkovou elektrodu, s výhodou je elektroda vybraná ze skupiny obsahující měděnou, stříbrnou, platinovou, zlatou, nerezovou a kompozitní uhlíkovou elektrodu, obsahující na povrchu imobilizované částice pro afinitní interakci s analytem.
- 15 7. Použití způsobu stanovení přítomnosti analytu v kapalném vzorku podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro kvalitativní a/nebo kvantitativní a/nebo semikvantitativní detekci přítomnosti protilátky a/nebo antigenu a/nebo bakterií v kapalném vzorku.
- 20 8. Použití podle nároku 7 pro detekci přítomnosti protilátek bakterií kmene *Borrelia sp.* v kapalném vzorku.

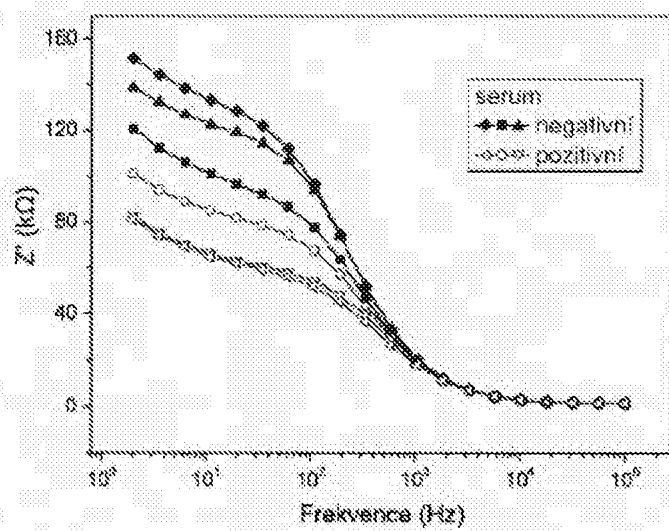
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3