



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 226**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02798889 .8**
96 Fecha de presentación : **17.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1436621**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.07.2004**

54 Título: **Dispositivo de ensayo multi-analito con zona de detección multipuntos.**

30 Prioridad: **17.09.2001 SE 0103072**
17.09.2001 US 322616 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **PHADIA AB.**
Box 6460
751 37 Uppsala, SE

72 Inventor/es: **Mendel-Hartvig, Ib;**
Björkman, Rune y
Rundström, Gerd

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo de ensayo en fase sólida que comprende una zona de detección multipuntos, y su uso para ensayos inmunocromatográficos.

5 Antecedentes de la invención

Un tipo de dispositivos de ensayo en fase sólida comprende una matriz de flujo con forma de plato de material altamente absorbente, generalmente una tira de membrana, tal como nitrato de celulosa o fibra de vidrio, en la que el líquido puede ser transportado lateralmente (es decir, en el plano de la tira) por fuerzas capilares de la membrana. La membrana suele tener una zona de aplicación de muestra y una zona de detección más allá de la zona de aplicación de la muestra. En la zona de detección, suele haber un reactivo de captura del analito inmovilizado. Para llevar a cabo el ensayo, la zona de aplicación se pone en contacto con la muestra líquida que se va a someter al ensayo para el analito de interés. El dispositivo se mantiene bajo condiciones suficientes para permitir la capilaridad del líquido para transportar el analito de interés, si está presente en la muestra, a través de la tira de membrana hacia la zona de detección donde el analito es retenido. Una almohadilla absorbente o similar en el extremo posterior de la tira suele asegurar el flujo capilar del líquido. Un reactivo de detección, generalmente marcado, se añade entonces antes de la zona de detección e interacciona con el analito retenido en la zona de detección, y la cantidad de analito retenido se mide. Frecuentemente, el reactivo de detección está predispuesto en la tira de membrana o sobre ella, por ejemplo, en forma de partículas móviles por difusión que contienen grupos fluoróforos o cromógenos en un punto anterior a la zona de aplicación de la muestra o bien entre la zona de aplicación de la muestra y la zona de detección.

Un gran inconveniente de estos dispositivos conocidos es que solo se pueden medir unos pocos analitos por ensayo. En el documento de patente europea EP 191 694 (Syntex Inc.) se publica un dispositivo en el que más de un analito puede ser detectado. Sin embargo, el número de analitos que puede ser detectado es limitado y el problema de detectar analitos que reaccionan en reacción cruzada no se trata.

Sumario de la invención

El problema esencial de la presente invención era posibilitar la detección de varios analitos e incluso analitos que reaccionan en reacciones cruzadas, tales como diferentes alérgenos reaccionando con las mismas IgEs.

Este problema se ha resuelto con un dispositivo multipuntos de acuerdo con la presente invención.

Así, en un primer aspecto la invención proporciona un dispositivo para determinar analitos en una muestra acuosa que comprende:

una matriz de flujo alargada siendo una membrana porosa que permite transporte lateral de un fluido a su través, en el que dicha matriz comprende una zona de aplicación de muestra y, aguas abajo de la misma, una zona de detección que tiene agentes de captura inmovilizados capaces de unirse directa o indirectamente a dicho analitos, en el que dichos analitos son detectados permitiendo que un segundo agente ligante marcado se una directa o indirectamente a los analitos, en el que A) los agentes de captura inmovilizados están distribuidos en la zona de detección como numerosos puntos pequeños, permitiendo así detección multianalito o multiespecificidad, y B) los agentes de captura están anclados a la matriz a través de partículas inmovilizadas, y C) el número de puntos por matriz de flujo es mayor de 100, y D) en el que algún(os) (de los) punto(s) funciona(n) como control(es) positivo(s) y/o calibrador(es) interno(s) donde los puntos que comprenden agentes de captura que tienen la capacidad de reaccionar en reacciones cruzadas con analitos están dispuestos en distintas líneas de flujo de líquido, y los agentes de captura son alérgenos o autoantígenos o fragmentos inmunoreactivos suyos.

El número de puntos por matriz de flujo es preferiblemente 100-1000. Los puntos son preferiblemente de un diámetro menor de 1 mm, preferiblemente de un diámetro menor de 0,5 mm.

Los puntos están preferiblemente dispuestos en un patrón que permite la detección de analitos que reaccionan en reacción cruzada o especificidades cruzadas. Esto viene ejemplificado por alérgenos que reaccionan en reacción cruzada con IgE, es decir, tales alérgenos no deberían ser dispuestos en la misma línea de flujo.

La matriz de flujo es una membrana porosa, tal como nitrocelulosa o una tira de material sólido.

Los agentes de captura son alérgenos o autoantígenos o un fragmento inmunorreactivo suyo. En el dispositivo algún(os) (de los) punto(s) actúa(n) como control (es) positivo(s) y/o calibrador(es) internos.

La muestra es sangre completa, suero, plasma, saliva u orina.

El marcador del segundo reactivo ligante marcado es, por ejemplo, un fluoróforo o un cromóforo.

El dispositivo puede ser utilizado para el rastreo de analitos desconocidos así como para la detección de

inmunoglobulinas específicas. Depositando muchos puntos con material conocido, por ejemplo proteína, es posible rastrear rápidamente qué ligante(s) hay en una muestra que se une(n) específicamente al material de puntos concretos. Un ejemplo es la determinación de muestrsas de IgE específicas, en la que los puntos contienen alérgenos diferentes.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 es una vista en perspectiva de una realización de un dispositivo de acuerdo a la presente invención.

La Figura 2 es una vista de sección lateral del dispositivo de la Figura 1,

La Figura 3 es una vista en despiece correspondiente a la vista lateral de la Figura 2.

Descripción detallada de la invención

10 Como se muestra en la Figura 1 el dispositivo comprende una cubierta 1 superior y una cubierta 2 inferior de un material que es inerte con respecto a la muestra y cualquier reactivo empleado en los ensayos que sean realizados con el dispositivo, por ejemplo, poliestireno o polipropileno. La cubierta 1 superior tiene una abertura 3 al pocillo de la muestra (cónico aquí) y una ventana 4 de detección.

15 La cubierta 2 inferior tiene montada sobre ella una tira 6 de membrana de material altamente absorbente (es decir, un material poroso susceptible de ser atravesado por un medio acuoso por capilaridad), por ejemplo nitrocelulosa en un soporte de poliéster. Cerca del extremo anterior de la tira 6 (a la izquierda en las figuras), se dispone sobre la tira una pieza 7 filtrante que contiene agente de detección móvil por difusión (segundo reactivo ligante marcado). Dicho reactivo de detección puede, por ejemplo, ser un conjugado entre una partícula marcada y un reactivo capaz de unirse al analito. En un punto posterior y situado debajo y dentro de la ventana 4 de detección, hay una zona 8 de reacción multipuntos en la tira que contiene varios agentes o reactivos de captura inmovilizados en un patrón concreto sobre la tira. Los agentes de captura son capaces de unirse a los analitos para su ensayo. La zona 8 de reacción (Figuras 2-3) puede ser menor o mayor que en las figuras que se muestran y puede contener 100-1000 agentes de captura. Algo muy importante es que los agentes de captura que tengan analitos que reaccionan en reacción cruzada no serán dispuestos en la misma línea, es decir, no en la misma línea de flujo de líquido.

25 La cubierta 1 superior contiene en el extremo anterior de la tira 6 de membrana, una almohadilla 11 de material absorbente de líquidos que sirve para contener el flujo de líquido, o amortiguadora. La abertura 3 de la cubierta 1 está prevista para la introducción de la muestra en la membrana 6. En el caso que se ilustra, un elemento 12 de filtrado (que opcionalmente puede consistir en dos o más filtros), se dispone bajo la abertura 3 para ensayos donde el líquido de la muestra requiera ser filtrado, por ejemplo cuando la muestra es sangre completa y las células sanguíneas han de ser separadas. La almohadilla 11 amortiguadora constituye así un contenedor amortiguador de líquidos, referido más adelante como almohadilla amortiguadora, y el espacio definido por la abertura 3 para la muestra y el elemento 12 de filtrado constituyen un pocillo para la muestra o contenedor de la muestra.

30 Opcionalmente, una película 5 extraíble está presente y su finalidad será descrita más adelante. En el extremo posterior de la tira 6 de membrana, se dispone un elemento 13 que absorbe por capilaridad, aquí en forma de una almohadilla de material absorbente, tal como celulosa, cuyo fin es ayudar a mantener un flujo capilar de los líquidos del ensayo a través de la tira 6 de membrana.

Un ensayo para los analitos de una muestra puede ser realizado con el dispositivo descrito anteriormente como sigue.

40 El dispositivo suele proporcionarse listo para su uso con la almohadilla 11 amortiguadora empapada en solución tamponadora (líquido de flujo), con el reactivo de detección predepositado en el filtro 7, y con los respectivos agentes de captura adecuados y agentes de calibrado inmovilizados en un patrón específico de puntos en la zona 8 de reacción (o detección).

45 La función de los puntos de calibrado es de control positivo y/o calibrador interno. Una cantidad predeterminada de muestra se añade a través de la abertura 3 de la cubierta 1. Todos los líquidos de ensayo necesarios, es decir en este caso el líquido de muestra y el líquido tamponador, están entonces presentes en el dispositivo y la película 5 extraíble, evitando de forma efectiva el contacto entre los líquidos respectivos y la tira 6 de membrana. El ensayo es entonces iniciado por el operador retirando la película 5 extraíble para poner así la tira 6 de membrana en contacto simultáneo con recepción de líquido con la almohadilla 11 amortiguadora y el líquido de la muestra en el pocillo 3 para la muestra. Si la película extraíble no está presente, el ensayo empezará directamente tras la adición de la muestra.

50 El líquido tamponador de la almohadilla 11 penetrará ahora en la tira 6 de membrana a través de su extremo anterior que está en contacto directo con la almohadilla 11 (véase Figura 3) y será transportado hacia la parte posterior de la tira 6 de membrana por capilaridad. Simultáneamente, el líquido de la muestra directamente seguido de un (primer) pulso de flujo de líquido tamponador. Sin embargo, el filtro 7 de reactivo detector y una parte mayoritaria de la almohadilla 11 amortiguadora son separados de la tira 6 de membrana por la barrera 10 de flujo. el líquido tamponador

5 que ha sido transportado hacia la tira 6 de membrana penetrará en ella y será transportado a través del filreo 7 y traerá consigo el reactivo de detección depositado en ella, formando así un pulso de flujo de reactivo de detección. Este pulso de flujo de reactivo de detección seguirá en secuencia tras los pulsos de flujo de muestra y de flujo de tampón. El tampón que se transporta en la tira 6 de membrana después de que el agente de detección haya sido eliminado del filtro 7, formará un segundo pulso de flujo de tampón tras el pulso de flujo de agente de detección.

10 Los diferentes flujos de líquidos anteriormente mencionados serán transportados a lo largo de la tira 6 de membrana en la secuencia indicada, es decir, flujo de muestra, flujo de reactivo de detección, y segundo flujo de tampón, y alcanzarán finalmente la zona 8 de reacción multipuntos. En la zona 8 de reacción, los analitos presentes en la muestra serán retenidos por los agentes inmovilizados en el patrón de puntos específico en la membrana. Los complejos analito/reactivo de captura formados serán lavados por el siguiente primer flujo de tampón, y el flujo de reactivo de detección formará complejos detectables reactivo/analito en la zona de reacción. Estos últimos serán finalmente lavados por el segundo flujo de tampón. En los puntos de calibrado, la cantidad predeterminada de analito presente reaccionará con el reactivo de detección en el flujo de reactivo de detección para formar un complejo reactivo de detección/analito detectable. Midiendo la intensidad de la señal del agente de detección retenido en la zona de reacción y haciendo una correlación con la obtenida en el(los) punto(s) de calibrado, puede determinarse la cantidad de analito en la muestra.

20 En la zona 8 de reacción (o detección) descrita anteriormente, varios reactivos capaces de unirse específicamente a los analitos están inmovilizados en un patrón específico de puntos (mediante enlace covalente, a través de adsorción física, a través de afinidad bioespecífica, a través de partículas inmovilizadas a las que el reactivo se une covalentemente, etc.). Sin embargo, en su lugar un agente capaz de reaccionar con el reactivo puede ser inmovilizado en la membrana, y el reactivo puede entonces ser añadido junto con la muestra, o ser predepositado en la membrana en un área o zona anterior a la zona de reacción. Dicho agente inmovilizado puede ser un miembro de un par de unión específica (sbp) y el reactivo es entonces acoplado o conjugado con otro miembro del sbp.

25 De forma similar, el(los) punto(s) de calibración pueden contener un ligante para la sustancia calibradora en lugar de la sustancia calibradora en sí. El ligante suele ser un miembro de un par de unión específica, tal como uno de los mencionados anteriormente, mientras que otro miembro del par de unión específica está acoplado o conjugado con la sustancia calibradora, que puede a su vez ser añadida con la muestra o ser predepositada en un punto anterior a la zona de calibrado. La estreptavidina, por ejemplo, puede ser inmovilizada en la zona de calibrado mientras que la sustancia calibradora está biotinilada.

30 Para detalles adicionales sobre dispositivos de ensayo del tipo que se contempla en la presente, y particularmente en lo referente a matrices de flujo, ensayos secuenciales y reactivos de detección, puede recurrirse a nuestras solicitudes de patente publicadas PCT WO 99/36776, WO 99/36777 y WO 99/36780, por ejemplo.

Los analitos que se van a determinar utilizando el presente dispositivo son fácilmente evidentes para el experto. El analito es un anticuerpo.

35 El presente dispositivo permite el pretratamiento conveniente de la muestra antes de comenzar el ensayo.

El presente dispositivo puede también ser adaptado para realizar ensayos del tipo descrito en nuestra solicitud de patente publicada PCT WO 99/60402 donde la matriz de flujo contiene una zona de separación cromatográfica anterior a la zona de reacción (detección) para separar los componentes de la muestra que de otro modo interferirían o influirían en la determinación del analito.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo para determinar analitos en una mezcla acuosa que comprende: una matriz (6) de flujo alargada, que es una membrana porosa, que permite el transpote lateral de fluídos a su través, en el que dicha matriz comprende una zona (3) de aplicación de la muestra y, aguas abajo de la misma, una zona (8) de detección que tiene inmovilizados agentes de captura capaces de unirse directa o indirectamente a dicho analitos, son detectados dichos analitos al permitir que un segundo agente ligante marcado se una directa o indirectamente a los analitos, y
10 los agentes de captura inmovilizados están distribuidos en la zona (8) de detección como un conjunto de pequeños puntos, permitiendo así la detección multianalito o/y multiespecificidad, los agentes de captura están anclados a la matriz a través de partículas inmovilizadas, y
algunos de los puntos funcionan como control(es) positivo(s)
y/o calibrador(es) interno(s),
caracterizado porque
15 A) el número de puntos por matriz de flujo es mayor de 100
B) los puntos que comprenden agentes de captura que tienen la capacidad de interreaccionar con analitos están dispuestos en distintas líneas de flujo de líquido, y
C) los agentes de captura son alérgenos o autoantígenos o fragmentos inmunorreactivos de los mismos.
- 20 2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en el que los puntos tienen un diámetro menor de 1 mm, preferiblemente un diámetro menor de 0,5 mm.
3. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es sangre completa, suero, plasma, saliva u orina.
4. Un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el marcador es un fluoróforo o un cromóforo.
- 25 5. El uso del dispositivo según una o más de las reivindicaciones anteriores 1 a 4 para rastrear analitos desconocidos.
6. El uso del dispositivo según una o más de las reivindicaciones anteriores 1 a 4 para rastrear inmunoglobulinas específicas.

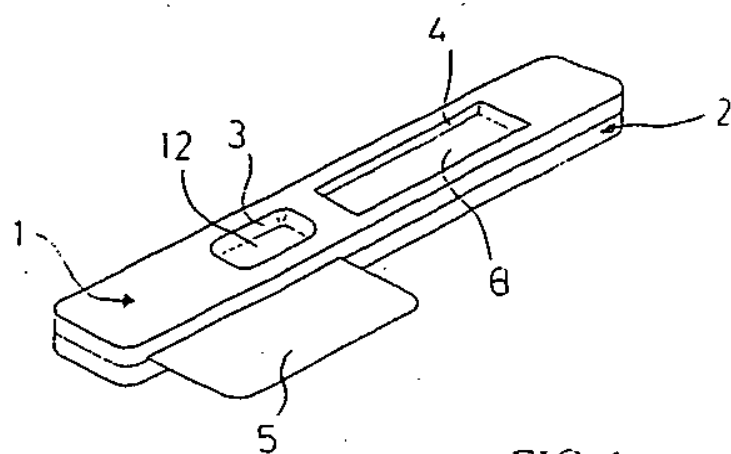


FIG. 1

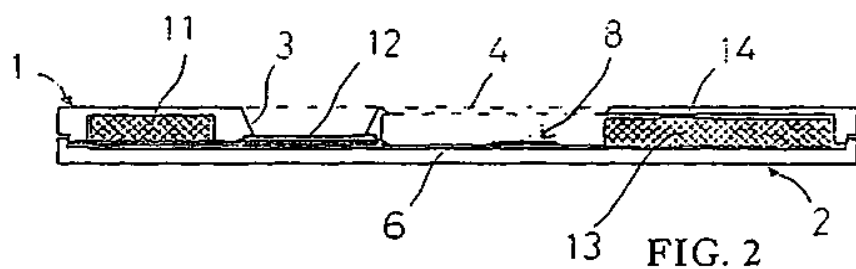


FIG. 2

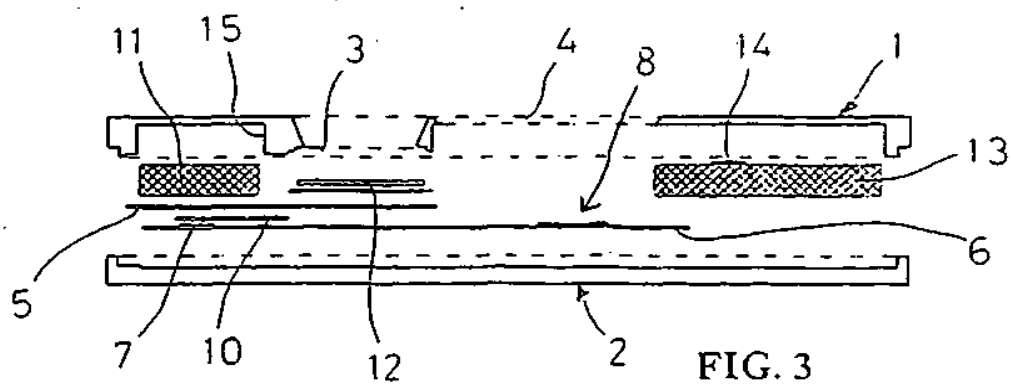


FIG. 3