

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 782**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07118773 .6**
96 Fecha de presentación: **15.05.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1881325**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2008**

54 Título: **Dispositivo para ensayos de unión asistidos magnéticamente**

30 Prioridad:
16.05.1997 US 857440

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

73 Titular/es:
**ABBOTT LABORATORIES
CHAD 0377/AP6A-1 100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK IL 60064-3500, US**

72 Inventor/es:
**Rohr, Thomas E.;
Elstrom, Tuan A.;
Howard, Lawrence V. y
Shain, Eric B.**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 782 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

Dispositivo para ensayos de unión asistidos magnéticamente

5 **Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un dispositivo y método para determinar la presencia o cantidad de analito en una muestra de ensayo usando materiales magnéticamente sensibles. Más particularmente, la invención se refiere al uso de materiales magnéticamente sensibles para cambiar las propiedades de componentes en ensayos de unión.

2. Análisis de la técnica

15 Los ensayos de diagnóstico se han convertido en un medio indispensable para la detección de analitos en muestras de ensayo usando la reacción mutua entre el analito y un miembro de unión específico para el analito, tal como la inmunorreacción entre un antígeno y un anticuerpo que se une a ese antígeno. Típicamente, se emplean marcadores detectables o etiquetas unidas a anticuerpos, que a su vez se unen al analito de interés, en tales ensayos de diagnóstico, en los que la detección del complejo de analito-anticuerpo marcado resultante, o detección del anticuerpo marcado que no se una al analito para formar un complejo, se usa para indicar la presencia o cantidad de analito en la muestra de ensayo.

25 Dos técnicas de ensayo de diagnóstico habitualmente usadas que emplean miembros de unión específicos son el radioinmunoensayo (RIA) y el inmunoensayo enzimático (EIA), ambos de los cuales emplean un miembro de unión específico marcado. El RIA usa un isótopo radiactivo como el marcador o etiquetado detectable unido a un miembro de unión específico. Debido a que el isótopo radiactivo puede detectarse en cantidades muy pequeñas, puede usarse para detectar o cuantificar cantidades pequeñas de analito. Sin embargo, desventajas sustanciales asociadas con el RIA incluyen las instalaciones especiales y extremo cuidado que se requieren en la manipulación de materiales radiactivos, los altos costes de tales reactivos y sus requisitos de eliminación únicos.

30 El EIA usa una enzima como el marcador detectable o etiquetado unido a un miembro de unión específico, en el que la actividad enzimática de la enzima se usa para detectar la inmunorreacción. Aunque el EIA no tiene algunas de las mismas desventajas del RIA, las técnicas de EIA típicamente requieren la adición de materiales de sustrato para inducir la reacción enzimática detectable. Además, los sustratos enzimáticos son con frecuencia inestables y tienen que prepararse justo antes de su uso o almacenarse en refrigeración. Además, los marcadores enzimáticos pueden ser difíciles de purificar y conjugar con miembros de unión y pueden ser inestables durante el almacenamiento a temperatura ambiente o incluso en condiciones refrigeradas. Los inmunoensayos enzimáticos son también insatisfactorios porque los métodos típicamente requieren incubaciones complejas, múltiples adiciones de líquidos y múltiples etapas de lavado.

35 Más recientemente, se han desarrollado técnicas de ensayo que usan partículas de sol metálica como marcadores visuales. En estas técnicas, un metal (por ejemplo, oro, plata, platino), un compuesto metálico, o una sustancia no metálica recubierta con un metal o un compuesto metálico, se usa para formar una dispersión acuosa de partículas. Generalmente, el miembro de unión específico a marcar se adsorbe en las partículas de sol metálicas y las partículas se capturan o se agregan en presencia del analito. Aunque las partículas de sol metálicas tienen la ventaja de producir una señal que es visualmente detectable así como medible por un instrumento, son difíciles de medir de forma cuantitativa. Las partículas de sol metálicas también tienen una intensidad de color limitada y en consecuencia, sensibilidad limitada en algunos ensayos. Además, las superficies de partículas de sol metálicas inorgánicas, tales como oro, pueden no aceptar fácilmente la unión covalente de miembros de unión específicos. Por lo tanto, durante su uso en un ensayo de unión, debe tenerse cuidado de que los miembros de unión específicos adsorbidos no se retiren de las partículas inorgánicas a través de la combinación de desplazamiento por otras proteínas o agentes tensioactivos y las fuerzas de cizallamiento que acompañan las etapas de lavado se usan para retirar material unido de forma no específica. Las partículas de sol metálicas pueden ser difíciles de recubrir sin inducir agregación; pueden agregarse tras el almacenamiento o puede agregarse tras la adición de tampones o sales. Además, tales marcadores en partículas son difíciles de concentrar y pueden ser difíciles de dispersar.

40 Otros materiales para marcadores incluyen sustancias quimioluminiscentes y fluorescentes. Sin embargo, estas sustancias pueden ser inestables y los materiales fluorescentes pueden experimentar inactivación. Las partículas no metálicas, tales como partículas de látex teñidas o coloreadas y partículas de selenio, también pueden usarse como marcadores visuales.

45 Los dispositivos de inmunoensayo autorrealizables han demostrado ser de gran beneficio en el campo del diagnóstico. Un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable es un kit que contiene inmunorreactivos a los que se puede añadir en primer lugar una muestra biológica por el paciente o técnico de laboratorio, después el ensayo de diagnóstico se realiza sin la necesidad de instrumentos de laboratorio complejos. Los dispositivos de inmunoensayo autorrealizables disponibles en el mercado, tales como el dispositivo de ensayo de tira que tiene la marca comercial

“TESTPACK PLUS”, distribuido por Abbott Laboratories, permiten que se realicen inmunoensayos de forma rápida y fiable.

5 Típicamente, los dispositivos de inmunoensayo autorrealizables implican tiras de ensayo cromatográficas. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.960.691 describe una tira de ensayo para análisis de un analito en una muestra por medio de una serie secuencial de reacciones. La tira de ensayo comprende una extensión de material cromatográfico que tiene capilaridad y la capacidad de disolvente cromatográfico de reactivos no inmovilizados y componentes reactivos de una muestra por medio de un disolvente cromatográfico seleccionado. La tira de ensayo incluye (1) un primer extremo en el que comienza el transporte de disolvente cromatográfico, (2) un
10 segundo extremo en el que termina el transporte de disolvente cromatográfico y (3) una pluralidad de zonas situadas entre el primer y segundo extremos. Estas zonas incluyen (1) una primera zona impregnada con un primer reactivo que es móvil en el disolvente y capaz de una reacción de unión específica con el analito, (2) una segunda zona para recibir la muestra y (3) una tercera zona, corriente abajo de la segunda zona, impregnada con un segundo reactivo que se inmoviliza contra transporte de disolvente y es capaz de una reacción de unión específica con el analito para
15 inmovilizar el analito en la tercera zona. La tira de ensayo se diseña de tal modo que el primer reactivo pueda detectarse en la tercera zona como una medida del analito.

Una característica habitual de las tiras de ensayo cromatográficas implica el flujo de un fluido o una mezcla de un fluido y partículas a través de una matriz porosa. La tira de ensayo típicamente incluye una zona de reacción en la que pueden producirse reacciones de unión. Para que se produzcan reacciones de unión apropiadas en las tiras de ensayo cromatográficas, el fluido o mezcla debe fluir de forma sustancialmente uniforme a través de la zona de
20 reacción.

Un problema con los dispositivos de ensayo de este tipo es la variabilidad inherente en el material del que se forma la matriz porosa. Esta variabilidad (por ejemplo, en porosidad) afecta directamente al flujo de fluido a través de la matriz y puede afectar de forma adversa a la precisión del dispositivo de ensayo. Además, la matriz con frecuencia se unirá de forma no específica a las partículas o reactivos en sitios en la zona de reacción pretendida o en otro lugar, necesitando por lo tanto el uso de procedimientos pasivantes elaborados después de que se haya aplicado el reactivo inmovilizado. En consecuencia, existe un deseo de desarrollar un dispositivo de ensayo autorrealizable,
25 simple, rápido que no requiera que un fluido fluya a través de una matriz porosa.

Otro problema con dispositivos de inmunoensayo autorrealizables es la necesidad de inmovilizar un reactivo de unión específico en la tira de ensayo de modo que los reactivos implicados en el ensayo puedan capturarse en la zona de reacción. El proceso de inmovilizar los reactivos de unión específicos en la tira de ensayo puede ser difícil de controlar, lo que conduce a variaciones de lote a lote en la capacidad de unión de la zona de reacción. Además, los reactivos de unión inmovilizados pueden ser inestables, lo que provoca que la capacidad de unión de la zona de reacción cambie después del envío o almacenamiento. Debido a que el reactivo de unión específico inmovilizado es específico para el ensayo en un analito particular, las tiras de ensayo deben dedicarse a un ensayo particular. Un problema adicional con los dispositivos de inmunoensayo autorrealizables es la variación de lote a lote que resulta de los procesos de fabricación, especialmente variación de la actividad de los reactivos biológicos, tales como las moléculas de unión. Por ejemplo, las variaciones de lote a lote en la capacidad de unión del reactivo de unión en la zona de captura de una tira de ensayo pueden afectar a los resultados de los ensayos. Aunque los ajustes de las actividades o concentraciones de los otros reactivos pueden compensar, la realización de tales ajustes implica introducir complejidad excesiva al proceso de fabricación y requiere emparejar cada lote de tiras de ensayo con lotes de reactivos particulares. La capacidad para usar una tira de ensayo uniforme, completamente estable en ensayos para varios analitos diferentes simplificaría en gran medida la producción y control de ensayos autorrealizables basados en tiras. Como alternativa, la capacidad de adaptar fácilmente una tira de ensayo durante la fabricación para cumplir los requisitos de un conjunto de reactivos sería ventajosa.
35

50 En varias aplicaciones es deseable usar un ensayo autorrealizable que proporcione un resultado positivo por encima de una cierta concentración de analito y un resultado negativo por debajo de esa concentración, con un intervalo muy estrecho de concentraciones de transición. Este resultado ha sido difícil de conseguir con tiras de ensayo convencionales.

55 También se usan micropartículas superparamagnéticas de forma extensiva en la realización de inmunoensayos. Las micropartículas superparamagnéticas son magnéticamente sensibles por que un campo magnético aplicado provocará que una fuerza actúe sobre ellas en la dirección del generador de campo magnético. Sin embargo, no conservarán ningún magnetismo residual después de que se retire el campo magnético aplicado. Típicamente, las partículas se unen a un miembro de unión específico para formar un conjugado, siendo capaz el miembro de unión específico de unirse a un analito de interés. El conjugado de partícula-miembro de unión específico se dispersa en un líquido, que después se mezcla con la muestra para formar una mezcla de ensayo, permitiendo de este modo que el conjugado de partícula-miembro de unión específico se una al analito, si está presente el analito. El complejo de analito-conjugado se atrae después a una superficie sólida mediante la aplicación de un campo magnético y el material no unido con el conjugado se retira (habitualmente conocido como separación unido/libre), como se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos N° 4.745.077; 4.070.246 y 3.985.649. Habitualmente se requieren etapas adicionales de lavado, adiciones de reactivo y separaciones de unido/libre antes de que se produzca una
60
65

señal medible. Los métodos analíticos de este tipo típicamente usan emisión de luz (quimioluminiscencia o fluorescencia), absorción de luz después de la producción enzimática de un cromóforo o emisión radiactiva como la señal indicativa de la cantidad del analito de interés. Típicamente, la sensibilidad magnética de las partículas superparamagnéticas se usa solamente como una ayuda en las etapas de separación de unido/libre, implicando el resto del procedimiento de ensayo reactivos y protocolos convencionales. En consecuencia, los análisis convencionales que usan partículas superparamagnéticas se limitan a instrumentación automática compleja (por ejemplo, el ACS 180 de Ciba Corning Diagnostics) o una serie extendida de etapas de ensayo manuales.

El tamaño y composición de las partículas superparamagnéticas y la fuerza y gradiente del campo magnético aplicado determinarán la magnitud de la fuerza magnética ejercida sobre ellas. Cuando se aplica un campo magnético a una suspensión líquida de tales partículas, la magnitud de la fuerza ejercida sobre cada partícula y la resistencia hidrodinámica de cada partícula, determinará su velocidad de movimiento a través del líquido hacia el generador del campo magnético. Para partículas magnéticamente sensibles de composición similar, la fuerza ejercida sobre una partícula individual por un campo magnético aplicado y por lo tanto su velocidad de movimiento a través del líquido, depende de su volumen, mientras que la resistencia se determina por su área en sección transversal. Partículas magnéticamente sensibles más pequeñas se moverán más lentamente en un campo magnético aplicado debido a la fuerza más débil ejercida sobre cada partícula en relación con su área de sección transversal y partículas superparamagnéticas muy pequeñas tales como ferrofluidos se moverán muy lentamente debido a que la fuerza ejercida sobre ellas es comparable a la de las fuerzas aleatorias de las moléculas que las rodean. Estas fuerzas aleatorias resultan de movimiento térmico (Browniano). A medida que las partículas aumentan en tamaño sus volúmenes aumentan más rápidamente que sus áreas de sección transversal, con el resultado de que la fuerza magnética aumenta más rápidamente que la resistencia. El ensamblaje de varias partículas de movimiento lento pequeñas en agregados dará como resultado que la suma de las fuerzas que actúan sobre las partículas individuales se ejerzan sobre los agregados, con el resultado de que los agregados se moverán más rápidamente a través del líquido hacia la fuente del campo magnético que las partículas individuales. La fuerza y gradiente del campo magnético aplicado también puede seleccionarse para favorecer el movimiento o captura de tipos o formas particulares de reactivos magnéticamente sensibles.

La Patente de Estados Unidos N° 5.108.933 describe un método por el que las partículas magnéticamente sensibles coloidales pueden usarse para la separación de una cualquiera de una diversidad de sustancias diana de un medio de ensayo sospechoso de contener la sustancia de interés a través de conversión de partículas a microaglomerados incluyendo la sustancia diana, mediante manipulación de sus propiedades coloidales. Los aglomerados resultantes pueden posteriormente retirarse del medio usando imanes de laboratorio ordinarios, puesto que las partículas estarán comprendidas de suficiente material magnético, por encima de un umbral empírico, para efectuar dicha retirada. El método se lleva a cabo añadiendo al medio de ensayo partículas coloidales aglomerables y resuspendibles, que son capaces de suspensión estable en el medio de ensayo, formando un aglomerado magnético que comprende las partículas coloidales y cualquier sustancia de diana presente en el medio de ensayo y separando los aglomerados magnéticos resultantes del medio. Este método de análisis, sin embargo, usa solamente un tipo sencillo de partícula, lo que presenta por lo tanto dificultades en la detección. La presencia o ausencia de partículas magnéticas agregadas en las cercanías del imán no se determina de forma fácil ni precisa por medios visuales. Sería deseable usar partículas indicadores que pudieran detectarse visualmente de forma fácil y precisa.

El uso de partículas indicadoras no magnéticas se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.374.531, que describe el uso simultáneo de partículas magnéticas y partículas fluorescentes no magnéticas en la cuantificación de fenotipos de leucocitos u otros analitos particulados. Tanto las partículas magnéticas como las partículas fluorescentes no magnéticas contienen sustancias de unión que ocasionan la formación de rosetas consistentes en partículas magnéticas, partículas fluorescentes no magnéticas y las células deseadas. Las rosetas se separan de los componentes no magnéticos de la muestra de ensayo por aplicación de un campo magnético, después de lo cual el número de células puede medirse por la cantidad de fluorescencia emitida por las partículas fluorescentes no magnéticas. La formación de rosetas es aplicable solamente a la detección de analitos particulados (tales como células), puesto que implica unir partículas magnéticas y partículas indicadoras alrededor de las células diana, debiendo ser dichas células de tamaño similar o mayor que las partículas magnéticas y las partículas indicadoras. Las rosetas descritas en la presente patente no pueden formarse con analitos de escala molecular, puesto que tales analitos son mucho más pequeños que las partículas magnéticas y las partículas indicadoras.

La agregación de partículas indicadoras no magnéticas y magnéticas como una función de la presencia de analitos de escala molecular se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.145.784. En esta patente, las partículas magnéticas y partículas detectables no magnéticas que tienen antígeno y/o anticuerpo fijado a sus superficies se combinan con la muestra a analizar, anticuerpos libre si se requiere y cualquier tampón, sal y otros reactivos necesarios. Después de incubación durante un tiempo específico y en condiciones apropiadas para que el antígeno y el anticuerpo específico se unan, las partículas magnéticas se retiran por atracción hacia un imán. Se determina posteriormente la presencia o ausencia y/o cantidad de partículas detectables no magnéticas y se determina la presencia o ausencia y/o cantidad de antígeno o anticuerpo de interés en la muestra. En este proceso, la presencia del analito no se detecta observando directamente los complejos de partículas magnéticas/no magnéticas separadas cerca de la localización del imán.

Las Patentes de Estados Unidos N° 5.445.970 y 5.445.971 describen el uso de material atraíble magnéticamente como un marcador detectable en ensayos de unión. El marcador magnético se somete a un campo magnético y el marcador, a su vez, presenta una fuerza resultante o movimiento como resultado de la aplicación del campo magnético. El alcance de la fuerza o movimiento se modula por un analito que puede estar presente en una muestra de ensayo. Debido a que la presencia o cantidad de analito en una muestra de ensayo es responsable de la magnitud de la fuerza ejercida o la cantidad de movimiento presentada por el material atraíble magnéticamente, el efecto del campo magnético sobre el marcador atraíble magnéticamente puede usarse como una medida de la presencia o cantidad de analito en una muestra de ensayo. Este enfoque requiere que la presencia de un analito provoque un cambio en el grado de unión del material atraíble magnéticamente a una fase sólida de modo que se evita que el material atraíble magnéticamente unido se mueva en un campo magnético aplicado. La aplicación de un campo magnético provoca después una separación del material atraíble magnéticamente libre y el material atraíble magnéticamente unido a la fase sólida. La medición de la fuerza ejercida sobre el material atraíble magnéticamente unido a la fase sólida o sobre el material atraíble magnéticamente libre, refleja después la cantidad de analito presente en la mezcla de ensayo. Aunque son posibles formatos de ensayo autorrealizables usando este enfoque, se requiere captura específica en alguna forma de fase sólida no móvil.

Para algunas aplicaciones, un formato de ensayo que use solamente fases móviles sólidas tales como micropartículas tendría ventajas claras, como las tendrían los formatos que no requieran la medición de fuerza magnética para determinar concentración de analitos. También sería ventajoso utilizar reactivos que no se separen por sedimentación de la suspensión. Pueden producirse partículas de látex que formen suspensiones estables, pero las partículas superparamagnéticas suficientemente pequeñas para formar suspensiones estables, llamadas ferrofluidos, se atraen de forma solamente débil a la fuente de un campo magnético y por lo tanto no pueden capturarse fácilmente de forma magnética. Los ferrofluidos tampoco son habitualmente compatibles con soluciones acuosas. Sería ventajoso desarrollar formatos de inmunoensayo autorrealizables que no requieran un material cromatográfico, también sería ventajoso desarrollar un medio para un inmunoensayo autorrealizable que pudiera usarse para una multiplicidad de inmunoensayos y adaptarse fácilmente a variaciones de reactivo resultante de procesos de fabricación.

Como antecedentes adicionales de la técnica, el documento WO 95/30888 describe un dispositivo capilar para su uso en un método de ensayo que se basa en el color para su etapa de detección. Durante la construcción del dispositivo, se unen uno o más reactivos de ensayo a las partículas magnéticas o magnetizables que se unen a la superficie interna del dispositivo por medio de un campo magnético. El campo magnético puede proporcionarse por una tira magnética unida bajo la superficie relevante, por pintura magnética o por incorporación de material magnético al material de fase sólida. El campo magnético actúa para mantener las partículas magnetizables en posición durante el transporte y posterior uso del dispositivo.

Sumario de la invención

La presente invención implica un dispositivo para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de ensayo. El dispositivo comprende:

- (a) al menos un canal capilar a través del que puede fluir una mezcla de reacción, comprendiendo dicho al menos un canal una pared que incluya al menos un sitio magnético seleccionado de una cinta de grabación magnética o una tira magnética para aplicar un campo magnético a los componentes en dicha mezcla de reacción; y
- (b) un medio de medición para evaluar el efecto del campo magnético generado por dicho al menos un sitio magnético sobre los componentes de la mezcla de reacción como una medida de la presencia o cantidad de analito en la muestra de ensayo;

en el que el campo magnético en dicho al menos un sitio magnético tiene un gradiente e intensidad definidos para ocasionar preferentemente la acumulación de reactivos magnéticamente sensible o complejos que tienen una característica particular en el fondo del canal capilar o en el que dicho al menos un sitio magnético consiste en múltiples sitios magnéticos, que difieren en fuerza de campo magnético o gradiente o ambos, en el fondo del canal capilar.

En una realización del dispositivo de la invención, el medio de medición es un dispositivo visual para medir tanto el alcance de la formación de dichos complejos por unión específica de reactivo magnéticamente sensible a reactivo de fase sólida móvil como la separación de reactivo magnéticamente sensible no unido.

En otra realización del dispositivo de la invención, el canal se forma adhiriendo al menos dos capas de película entre sí. Pueden estar presentes uno o más agujeros de apertura en la capa superior para actuar como sitio o sitios de aplicación para una muestra de ensayo.

En otra realización más del dispositivo de la invención, el canal tiene un suelo que está fabricado a partir de material de absorción óptica.

La presente invención también implica el uso de cualquiera de los dispositivos anteriores de la invención para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de ensayo.

5 En una realización de un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable que puede usarse para reemplazar un dispositivo de tira convencional para realizar inmunoensayos, se fijan miembros de unión específicos similares a los fijados a la matriz porosa de un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable convencional a partículas de material magnéticamente sensible, por ejemplo, partículas superparamagnéticas y el reactivo magnéticamente sensible resultante se incluye en una mezcla de reactivos. Se permite que la muestra de ensayo entre en contacto con la mezcla de reactivos para formar una mezcla de ensayo, que se permite que fluya a través de un canal en vez de a través de una matriz porosa. La unión que normalmente se produciría entre partículas indicadoras visibles y los miembros de unión específicos unidos de forma no difusiva a la matriz porosa en la zona de reacción de un dispositivo convencional puede producirse en su lugar entre reactivo magnéticamente sensible y reactivo indicador diamagnético visible. La colocación de un imán en una localización específica a lo largo del canal atrae el reactivo magnéticamente sensible unido al reactivo indicador diamagnético. La presencia de reactivo indicador diamagnético unido atraído al imán puede detectarse visualmente o por un dispositivo óptico e indica la presencia o cantidad de analito en la muestra. También debería observarse que los ensayos que utilizan los principios de la presente invención también pueden llevarse a cabo convenientemente en recipientes de reacción convencionales, por ejemplo, cubetas, pocillos, tubos y similares. Debería observarse adicionalmente que el reactivo magnéticamente sensible puede ser visible y el reactivo diamagnético puede ser transparente, es decir, no visible, por lo que la presencia o cantidad de analito puede detectarse visualmente o por un dispositivo óptico examinando solamente el reactivo magnéticamente sensible acumulado. Además, tanto puede ser visible el reactivo magnéticamente sensible como puede ser visible el reactivo diamagnético, por lo que la presencia o cantidad de analito puede detectarse visualmente o por un dispositivo óptico examinando el reactivo magnéticamente sensible acumulado y el reactivo diamagnético visible.

25 Una ventaja particular de la presente invención es la facilidad con la que puede realizarse un inmunoensayo por medio de un dispositivo auto-contenido portátil. El campo magnético de cinta de grabación magnética ordinaria o tiras magnéticas de tarjetas de crédito son suficientes para provocar la separación de complejos que contienen reactivo magnéticamente sensible de reactivo de fase sólida móvil diamagnético. La presencia de estos complejos puede observarse de forma fácil y fiable visualmente debido a la presencia del material de fase sólida diamagnético dentro de los complejos. Otra ventaja particular de esta invención es la capacidad de crear una zona de captura magnética que se emparejará con los reactivos magnéticamente sensibles y los reactivos de fase sólida móviles empleados. El campo magnético y su gradiente pueden definirse de modo que proporcionen atracción óptima del reactivo magnéticamente sensible. El sitio o sitios de captura magnética pueden usarse para proporcionar lecturas semicuantitativas por medios visuales en ensayos autorrealizables. El sitio o sitios de captura magnética pueden controlarse para proporcionar medios para compensar las variaciones entre lotes en reactivos de ensayo. Como se ha indicado anteriormente, los reactivos usados en ensayos de unión convencionales son habitualmente mezclas biológicas complejas y tienden a variar de un lote a otro debido a los procesos de fabricación. Para formatos de ensayo de tipo sándwich, en los que las partículas del reactivo magnéticamente sensible pueden ser muy pequeñas en relación con las partículas del reactivo de fase sólida móvil, es posible controlar el comportamiento magnético del reactivo magnéticamente sensible controlando la fuerza y el gradiente del campo magnético. También es posible controlar la captura de las partículas del reactivo de fase sólida móvil que pueden ser grandes en relación con las partículas del reactivo magnéticamente sensible. Para capturar de forma más eficaz los complejos que comprenden partículas de reactivo de fase sólida móvil y partículas de reactivo magnéticamente sensible sin capturar las partículas no unidas de reactivo magnéticamente sensible, es posible proporcionar un gradiente de campo que cambie con la distancia comparable a la dimensión de las partículas de reactivo de fase sólida móvil. Un campo tal puede codificarse en un material magnéticamente susceptible durante la fabricación.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 es una vista esquemática de una reacción de unión específica que se utiliza en la presente invención.
 La Figura 2 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un equilibrio para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 55 La Figura 3 es una vista esquemática del aparato de la Figura 2 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 La Figura 4 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un equilibrio para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 La Figura 5 es una vista esquemática del aparato de la Figura 4 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 60 La Figura 6 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un transductor de efecto Hall para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 La Figura 7 es una vista esquemática del aparato de la Figura 6 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.
 65 La Figura 8 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un sensor óptico para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

La Figura 9 es una vista esquemática del aparato de la Figura 8 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

La Figura 10 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un equilibrio para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

5 La Figura 11 es una vista esquemática del dispositivo de la Figura 10 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

La Figura 12 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un microequilibrio para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

10 La Figura 13 es una vista esquemática de una parte del aparato de la Figura 12 durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

La Figura 14A es una vista esquemática de un tipo de dispositivo de inmunoensayo autorrealizable durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible. La figura representa el inmunoensayo antes de que se capture el complejo.

15 La Figura 14B es una vista esquemática del dispositivo de inmunoensayo autorrealizable de la Figura 14A durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible. La figura representa el inmunoensayo después de que se capture el complejo.

20 La Figura 15A es una vista esquemática de otro tipo de dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible. La figura representa el inmunoensayo antes de que se capture el complejo.

La Figura 15B es una vista esquemática del dispositivo de inmunoensayo autorrealizable de la Figura 15A durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible. La figura representa el inmunoensayo después de que se capture el complejo.

25 La Figura 16A es una vista esquemática de un dispositivo de detección de densidad óptica durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible antes de que se acumule un gran número de complejos en el fondo del recipiente de reacción.

30 La Figura 16B es una vista esquemática de la Figura 16A durante el funcionamiento para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible después de haberse acumulado un gran número de complejos en el fondo del recipiente de reacción.

La Figura 17 es una vista esquemática de un aparato que utiliza un dispositivo de microbalanza y posicionamiento de mezcla de ensayo para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

35 La Figura 18 es una gráfica que ilustra la señal generada por el dispositivo ilustrado en la Figura 17 durante el análisis de tres muestras de micropartículas superparamagnéticas.

La Figura 19 es una gráfica que ilustra la medición de la fuerza de atracción de partículas magnéticamente sensibles libres o no unidas en función del tiempo.

40 La Figura 20A es una gráfica que ilustra la separación de ferrofluido en un columna de medio de filtración en gel "SEPHACRYLS-500®".

La Figura 20B es una gráfica que ilustra la separación de ferrofluido en un columna de medio de filtración en gel "SEPHACRYLS-1000®".

45 La Figura 21 es una gráfica que ilustra los resultados de separación magnética como se detectó por el aparato mostrado en las figuras 4, 5 y 17 después de incubación de polipirrol recubierto de antibiotina con diferentes cantidades de ferrofluido recubierto de albúmina de suero bovino-biotina.

Las Figuras 22A, 22B, 22C y 22D son vistas esquemáticas que ilustran los aspectos observables de la unión de ferrofluido con partículas de látex en un campo magnético.

50 La Figura 23 es una gráfica que ilustra la tasa y alcance del cambio de peso aparente de un imán resultante del funcionamiento del aparato de la Figura 17 para medir el efecto de la variación de la concentración de soluciones diluidas de ferrofluido recubierto con BSA biotinilada.

La Figura 24 es una gráfica que ilustra el cambio de peso aparente de un imán resultante de la captura de complejos de polipirrol y reactivo magnéticamente sensible durante un ensayo para albúmina de suero bovino biotinilada libre.

55 La Figura 25A es una vista en perspectiva de un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para la detección asistida magnéticamente de complejos que contienen un reactivo magnéticamente sensible.

La Figura 25B es una vista en perspectiva despiezada del dispositivo de inmunoensayo autorrealizable de la Figura 25A.

60 La Figura 25C es una vista lateral en elevación del dispositivo de inmunoensayo autorrealizable de la Figura 25A.

La Figura 26 es una gráfica que ilustra los resultados obtenidos de usar un dispositivo del tipo mostrado en las Figuras 25A, 25B y 25C por medio de un lector de reflectancia.

La Figura 27 es una gráfica que ilustra los resultados obtenidos de usar un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para fibrina soluble por medio de un lector de densidad óptica.

65

Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones son aplicables a la invención.

5 La expresión “muestra de ensayo”, como se usa en este documento, se refiere a un material sospechoso de contener el analito. La muestra de ensayo puede usarse directamente como se obtienen de la fuente o después de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. La muestra de ensayo puede derivarse de cualquier fuente biológica, tal como un fluido fisiológico incluyendo, pero sin pretensión de limitación, sangre, saliva, fluido del cristalino y fluido cerebro espinal, sudor, orina, leche, fluido ascítico, mucus, fluido sinovial, fluido peritoneal, fluido amniótico y similares; caldos de fermentación; cultivos celulares; mezclas de reacción química y similares. La muestra de ensayo puede tratarse antes de su uso, tal como preparando plasma a partir de sangre, diluyendo fluidos viscosos y similares. Los métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, concentración, inactivación de componentes de interferencia y la adición de reactivos. Además de fluidos biológicos o fisiológicos, pueden usarse otras muestras líquidas tales como agua, productos alimentarios y similares para la realización de ensayos de producción de alimentos o ambientales. Además, puede usarse un material sólido sospechoso de contener el analito como la muestra de ensayo. En algunos casos, puede ser beneficioso modificar una muestra de ensayo sólida para realizar un medio líquido o para liberar el analito.

20 La expresión “miembro de unión específico”, como se usa en este documento, se refiere a un miembro de una par de unión, es decir, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une específicamente a la segunda molécula a través de medios químicos o físicos. Además de los miembros de par de unión de antígeno y anticuerpo bien conocidos, otros pares de unión incluyen, pero sin pretensión de limitación, biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, secuencias peptídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores de enzimas y enzimas, una secuencia peptídica y un anticuerpo específico para la secuencia o la proteína completa, ácidos poliméricos y bases, colorantes y aglutinantes proteicos, péptidos y aglutinantes proteicos específicos (por ejemplo, ribonucleasa, S-péptido y ribonucleasa S-proteína), azúcar y ácido bórico y moléculas similares que tienen una afinidad que permite su asociación en un ensayo de unión. Además, los pares de unión pueden incluir miembros que son análogos al miembro de unión original, por ejemplo un análogo de analito o un miembro de unión preparado por técnicas recombinantes o ingeniería molecular. Si el miembro de unión es un inmunorreactivo este puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, antígeno, hapteno o complejo de los mismos, y si se usa un anticuerpo, este puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, una mezcla o mezclas o fragmento o fragmentos de los mismos, así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión. Los detalles de la preparación de tales anticuerpos, péptidos y nucleótidos y su idoneidad para su uso como miembros de unión en un ensayo de unión se conocen bien por los expertos en la materia.

40 El término “analito” o “analito de interés”, como se usa en este documento, se refiere al compuesto o composición a detectar o medir y que tiene al menos un epítipo o sitio de unión. El analito puede ser cualquier sustancia para la que exista un miembro de unión de origen natural o para la que pueda prepararse un miembro de unión. Los analitos incluyen, pero sin pretensión de limitación, toxinas, compuestos orgánicos, proteínas, péptidos, microorganismos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, hormonas, esteroides, vitaminas, drogas (incluyendo las administradas para fines terapéuticos así como las administradas para fines ilícitos), partículas de virus y metabolitos de o anticuerpos para cualquiera de las sustancias anteriores. Por ejemplo, tales analitos incluyen, pero sin pretensión de limitación, ferritina; creatinina quinasa MIB (CK-MB); digoxina; fenitoina; fenobarbital; carbamazepina; vancomicina; gentamicina; teofilina; ácido valproico; quinidina; hormona luteinizante (LH); hormona estimulante del folículo (FSH); estradiol, progesterona; anticuerpos IgE; micro-globulina de vitamina B2; hemoglobina glucosilada (Gly, Hb); cortisol; digitoxina; N-acetilprocainamida (NAPA); procainamida; anticuerpos para la rubeola, tales como IgG de rubeola e IgM de rubeola; anticuerpos para toxoplasmosis, tales como IgG de toxoplasmosis (Toxo-IgG) e IgM de toxoplasmosis (Toxo-IgM); testosterona; salicilatos; acetaminógeno; antígeno de superficie de virus de la hepatitis B (HBsAg); anticuerpos para el antígeno de núcleo de la hepatitis B, tal como antígeno IgG e IgM anti núcleo de la hepatitis B (Anti-HBC); virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (HTLV); antígeno de hepatitis B e (HBeAg); anticuerpos para el antígeno de hepatitis B e (Anti-HBe); hormona estimulante del tiroides (TSH); tiroxina (T4); triyodotironina total (T3 Total); triyodotironina libre (T3 libre); antígeno carcinoembrionario (CEA); y proteína fetal alfa (AFP); y drogas de sustancias controladas y de abuso, incluyendo pero sin pretensión de limitación, anfetamina; metanfetamina; barbitúricos tales como amobarbital, secobarbital, pentobarbital, fenobarbital y barbital; benzodiazepinas tales como librium y valium; cannabinoides tales como hachís y marihuana; cocaína; fentanilo; LSD; metacualona; opiáceos tales como heroína, morfina, codeína, hidromorfona, hidrocodona, metadona, oxycodona, oximorfona y opio; fenciclidina; y propoxifeno. El término “analito” también incluye cualquier sustancia antigénica, haptenos, anticuerpos, macromoléculas y combinaciones de los mismos.

60 La expresión “análogo de analito”, como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que reacciona de forma cruzada con un miembro de unión específico de analito, aunque puede hacerlo en un grado mayor o menor que el analito en sí mismo. El análogo de analito puede incluir un analito modificado así como una parte fragmentada o sintética de la molécula de analito, siempre que el análogo de analito tenga al menos un sitio epitópico en común con el analito de interés. Un ejemplo de un análogo de analito es una secuencia peptídica sintética que duplica al menos un epítipo del analito de molécula completa de modo que el análogo de analito puede unirse a un miembro

de unión específico del analito.

El término “magnético”, como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que tiene la capacidad de imantarse cuando está en un campo magnético.

El término “paramagnético”, como se usa en este documento, se refiere a una sustancia en la que un campo magnético inducido está en la misma dirección que el campo magnetizante, pero mucho más débil que en materiales ferromagnéticos. Los materiales ferromagnéticos, tales como hierro, níquel o cobalto, muestran alta permeabilidad magnética, la capacidad de adquirir alta imantación en campos magnéticos relativamente débiles, un punto de saturación característico, e histéresis magnética. El término “paramagnético” se refiere a una sustancia para la que la susceptibilidad magnética es positiva.

El término “diamagnético”, como se usa en este documento, se refiere a una sustancia en la que un campo magnético inducido está en la dirección opuesta al campo magnetizante. El término “diamagnético” se refiere a una sustancia para la que la susceptibilidad magnética es negativa.

El magnetismo en un material surge de los espines electrónicos intrínsecos de los átomos que los comprenden. Los espines de electrones no emparejados en elementos tales como el hierro transmiten un espín al átomo completo. Cuando se aplica un campo magnético a dicho material, los espines de los átomos individuales tienden a alinearse con el campo para minimizar su energía, creando un momento magnético neto. Si los átomos sensibles se empaquetan de forma cercana entre sí, como en materiales ferromagnéticos, se influyen entre sí para formar orden magnético de largo alcance. A medida que aumenta la intensidad del campo aplicado, la imantación de un material ferromagnético aumentará hasta que prácticamente todos los átomos que responden se alinean, después de lo cual no se observará mayor aumento de la imantación y se dice que el material está saturado. Durante una reducción posterior de la fuerza del campo aplicado, los materiales ferromagnéticos demostrarán histéresis notable y después de la retirada total del campo aplicado el material conservará parte de su orden magnético de largo alcance y se imantará permanentemente.

En algunos materiales, que se denominan paramagnéticos, los átomos individuales que muestran alta sensibilidad magnética se rodean de átomos de otros elementos que muestran baja sensibilidad magnética. Cuando se someten a un campo magnético aplicado, los átomos que muestran alta sensibilidad magnética se alinearán con el campo, pero no se influirán entre sí y serán incapaces de formar orden magnético de largo alcance. No se observará saturación pronunciada y cuando se retire el campo magnético, no se demostrará histéresis, puesto que los espines de los átomos individuales vuelven a orientaciones aleatorias y se pierde todo el momento magnético residual.

Los materiales superparamagnéticos muestran características de paramagnetismo y ferromagnetismo. Si se dispersan partículas pequeñas de material ferromagnético en una matriz que muestra baja sensibilidad magnética, los átomos dentro de una partícula sencilla se alinean y se influyen entre sí cuando están en un campo. No influyen, sin embargo, en los átomos de una partícula cercana, con el resultado de que no se forma orden magnético de largo alcance. Aunque los materiales superparamagnéticos son capaces de imantarse más que los materiales paramagnéticos cuando se someten a un campo magnético, las partículas superparamagnéticas también muestran poco magnetismo residual después de que se retire el campo magnético.

Pueden encontrarse detalles adicionales con respecto a magnetismo, ferromagnetismo, paramagnetismo, superparamagnetismo y diamagnetismo en Jiles, Introduction to Magnetism and Magnetic Materials, Chapman & Hall (Londres: 1991), incorporado en este documento por referencia.

La expresión “reactivo magnéticamente sensible”, como se usa en este documento, se refiere a una sustancia que implica un material magnéticamente sensible unido a un miembro de unión específico. La unión puede efectuarse por medios de unión covalentes o no covalentes, ramas de enlace y similares. Sin embargo, el método de unión no es crítico para la presente invención. Como se usa en este documento, un “material magnéticamente sensible” es una sustancia que, tras la aplicación de un campo magnético, permite que el reactivo magnéticamente sensible produzca una respuesta detectable que estará relacionada directa o indirectamente con la cantidad de analito de la muestra de ensayo. El componente de miembro de unión específico del reactivo puede seleccionarse para unirse directamente al analito o unirse indirectamente al analito por medio de un miembro de unión específico complementario, que se describe en más detalle posteriormente en este documento. Los reactivos magnéticamente sensibles pueden unirse a miembros de unión específicos complementarios antes, durante o después del contacto con el reactivo magnéticamente sensible con la muestra de ensayo y/u otros reactivos de ensayo. Las expresiones “miembro de unión específico unido a una partícula magnéticamente sensible”, “miembro de unión específico unido a un material magnéticamente sensible”, “miembro de unión específico unido a un reactivo magnéticamente sensible” y términos similares se usan para referirse a la característica principal de los reactivos magnéticamente sensibles de la presente invención, es decir, el reactivo produce una respuesta detectable cuando se somete a un campo magnético.

La expresión “fase sólida”, como se usa en este documento, se refiere cualquier material al que se une analito, complejos de analito o reactivos de ensayo y del que pueden separarse reactivos de ensayo, muestras de ensayo o

soluciones de ensayo que no han reaccionado. La fase sólida en general tiene un miembro de unión específico unido a su superficie para formar un "reactivo de fase sólida", que permite la unión del analito, el reactivo magnéticamente sensible u otro reactivo de ensayo. Los miembros de unión específicos que se unen a la fase sólida pueden seleccionarse para unirse directamente al analito o para unirse indirectamente al analito por medio de un miembro de unión específico complementario, que puede unirse al reactivo de fase sólida antes, durante o después del contacto del reactivo de fase sólida con la muestra de ensayo y/u otros reactivos de ensayo.

Se entenderá, por supuesto, que la fase sólida puede comprender múltiples componentes y que el miembro de unión específica inmovilizado puede unirse directamente a cualquiera o todos los componentes de la fase sólida. Por ejemplo, una fase sólida de múltiples componentes puede incluir un reactivo de fase sólida que está físicamente atrapado o retenido e inmovilizado dentro de un componente segundo o complementario de la fase sólida por un medio físico, químico o bioquímico. Como un ejemplo adicional, un miembro de unión específico de analito puede unirse a micropartículas insolubles, que se retienen posteriormente por un material poroso. Por "retenido" se entiende que las micropartículas, una vez en el material poroso, no son capaces de movimiento sustancial a posiciones distintas dentro del material poroso. Un primer componente de fase sólida, que en sí mismo puede ser un reactivo de fase sólida, puede retenerse por un componente complementario de la fase sólida antes, durante o después del contacto del primer componente de fase sólida con la muestra de ensayo y/u otros reactivos de ensayo. En la mayoría de las realizaciones, sin embargo, el miembro de unión específico se une o se fija a un componente de fase sólida sencillo antes del contacto del reactivo de fase sólida móvil formado de este modo con la muestra de ensayo u otros reactivos de ensayo. Los reactivos de fase sólida de la presente invención muestran un nivel insustancial de sensibilidad magnética.

El término "complejo", como se usa en este documento, se refiere a la sustancia formada por la unión de dos o más materiales con otro material por medio de una o más reacciones de unión específicas. Los ejemplos representativos de complejos incluyen, pero sin limitación, (a) complejos formados por la reacción de unión específica de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil, (b) complejos formados por la reacción de unión específica de un analito con tanto un reactivo magnéticamente sensible como un reactivo de fase sólida móvil, (c) complejos formados por la reacción de unión específica de un analito con un reactivo magnéticamente sensible y (d) complejos formados por la reacción de unión específica de un analito con un reactivo de fase sólida móvil.

La expresión "miembro de unión complementario", como se usa en este documento, se refiere a cualquier miembro de un par de unión que se use en el ensayo además de los miembros de unión específicos del reactivo magnéticamente sensible o reactivo de fase sólida móvil. Por ejemplo, en casos en los que el analito en sí mismo no puede unirse directamente al reactivo magnéticamente sensible, un miembro de unión complementario puede ser capaz de unir el reactivo magnéticamente sensible con el analito de interés. Como se entenderá, por supuesto, puede usarse uno o más miembros de unión complementarios en un ensayo y dicho miembro o miembros de unión complementarios pueden unirse al reactivo magnéticamente sensible o el reactivo de fase sólida móvil antes, durante o después de que el reactivo magnéticamente sensible o reactivo de fase sólida móvil entre en contacto con una muestra de ensayo u otro reactivo de ensayo. El miembro de unión complementario puede incorporarse en el dispositivo de ensayo o puede añadirse al dispositivo como una solución de reactivos separada.

Descripción de la invención

La siguiente descripción se aplica al dispositivo y uso de la invención solamente en tanto que sea coherente con el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otras realizaciones descritas, ejemplificadas e ilustradas se proporcionan para fines comparativos.

Cuando se sitúa un material bajo la influencia de un campo magnético, actuará sobre él una fuerza, estando dirigida dicha fuerza hacia o en sentido contrario a la fuente del campo magnético. Por ejemplo, la fuerza que actúa sobre un material ferromagnético magnéticamente sensible de forma fuerte, tal como magnetita, se dirigirá hacia la fuente del campo magnético. En el mismo campo, la fuerza mucho más débil que actúa sobre un material diamagnético, tal como poliestireno, se dirigirá en sentido contrario a la fuente del campo magnético. El grado de la respuesta de materiales magnéticamente sensibles puede usarse como una medida de la cantidad de material magnéticamente sensible presente. La presente invención resulta del descubrimiento inesperado y sorprendente de que, cuando se usa un material magnéticamente sensible como un componente de un reactivo magnéticamente sensible en un ensayo de unión, es posible detectar la presencia o cantidad de uno o ambos del material magnéticamente sensible libre o material magnéticamente sensible incorporado en un complejo midiendo el grado de respuesta resultante de la interacción del reactivo magnéticamente sensible con un campo magnético aplicado. La respuesta del reactivo magnéticamente sensible a un campo magnético puede manifestarse de maneras tales como, por ejemplo, un movimiento detectable del material magnéticamente sensible o una fuerza resultante detectable ejercida por o sobre el material magnéticamente sensible. Además, la intensidad de la fuerza o el alcance del movimiento tienen una relación clara con la cantidad del material magnéticamente sensible unido a un material de fase sólida, permitiendo de este modo una determinación de la presencia o cantidad de un analito en una muestra de ensayo. Por ejemplo, la fuerza ejercida por un campo magnético sobre partículas individuales de un material ferromagnético suspendido en un fluido (por ejemplo, un ferrofluido) es relativamente pequeña y en consecuencia, difícil de detectar. Sin embargo, cuando una pluralidad o multiplicidad de estas partículas ferromagnéticas individuales se unen a un material de fase

sólida diamagnético, por ejemplo, por unión específica directamente mediante miembros de unión específicos o indirectamente por unión simultánea específica a un analito mediante miembros de unión específicos, la fuerza ejercida por un campo magnético sobre los complejos individuales suspendidos en el fluido es relativamente alta y en consecuencia, mucho más fácilmente detectable. La separación de partículas individuales de complejos y movimiento de complejos en un campo magnético forma la base para el método y aparato de la presente invención.

Reactivos de ensayo

La selección de una composición particular de material magnéticamente sensible no es crítica para la presente invención. Preferiblemente, el material magnéticamente sensible puede unirse a o puede modificarse de modo que sea capaz de unirse a un miembro de unión específico que a su vez se unirá a otro reactivo de ensayo o un componente presente en una muestra de ensayo. También se prefiere que el material magnéticamente sensible sea magnéticamente sensible en un grado tal que permita la partición del reactivo magnéticamente sensible unido y el reactivo magnéticamente sensible no unido y la producción de una respuesta detectable tras someterse a un campo magnético. Para los fines de la presente invención, un material es magnéticamente sensible si está influido por la aplicación de un campo magnético, tal como, por ejemplo, si se atrae a la fuente del campo magnético o tiene una susceptibilidad magnética detectable. Una diversidad de reactivos magnéticamente sensibles diferentes pueden formarse variando el componente magnéticamente sensible o el componente de miembros de unión específica del reactivo. Se entenderá, por supuesto, que la selección implica consideración del analito para detectar y la optimización deseada de la técnica de ensayo.

Una amplia diversidad de materiales magnéticamente sensibles que son adecuados para su uso en reactivos magnéticamente sensibles están disponibles en el mercado o las técnicas de producción para lo mismo se conocen bien en la técnica. Las características preferidas de materiales magnéticamente sensibles pueden conseguirse por una amplia diversidad de materiales magnéticos. Los materiales magnéticamente sensibles adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos, paramagnéticos, superparamagnéticos y similares. El término "ferromagnéticos" se usa generalmente para describir materiales que se atraen por un imán y que típicamente se imantan permanentemente tras exposición a un campo magnético. Los materiales ferromagnéticos también pueden reducirse en tamaño de partícula de modo que cada una de las partículas sea un dominio magnético sencillo. Estas partículas pueden dispersarse en una matriz para crear una micropartícula o una partícula de ferrofluido. En este estado de subdivisión, el material puede denominarse "superparamagnético" y se caracteriza por la ausencia de cualquier imantación medible permanente significativa. Los materiales adecuados para su uso como una matriz en la presente invención incluyen, pero sin limitación, materiales tales como, por ejemplo, polímeros orgánicos, incluyendo poliestireno, y similares.

Los materiales ferromagnéticos, ferrimagnéticos, paramagnéticos y superparamagnéticos adecuados incluyen, pero sin limitación, metales, tales como hierro, níquel, cobalto, cromo, manganeso y similares; elementos de la serie lantánida, tales como neodimio, erbio y similares; aleaciones, tales como aleaciones magnéticas de aluminio, níquel, cobalto, cobre y similares; óxidos, tales como óxido férrico (Fe_3O_4), óxido g-férrico ($\text{g-Fe}_3\text{O}_4$), óxido de cromo (CrO_2), óxido de cobalto (CoO), óxido de níquel (NiO_2), óxido de manganeso (Mn_2O_3) y similares; materiales compuestos, tales como ferritas y similares; y soluciones sólidas, tales como magnetita con óxido férrico y similares. Son materiales magnéticamente sensibles preferidos para su uso en la presente invención magnetita, óxido férrico (Fe_3O_4) y óxido ferroso (Fe_2O_3).

Las partículas sólidas pueden hacerse de hierro, óxido de hierro, un núcleo de material magnéticamente sensible recubierto con un óxido metálico o una partícula coloidal magnética que contiene magnetita o hematita. Las partículas sólidas típicamente tienen una gravedad específica de hasta 8 y un tamaño medio, por ejemplo, diámetro de hasta 800 nanómetros.

Las partículas en capas pueden comprender un núcleo de material magnéticamente sensible que tenga un recubrimiento magnéticamente no sensible. Por ejemplo, una partícula en capas puede comprender un núcleo de óxido de metal magnético que generalmente se rodea de un recubrimiento de silano polimérico; una partícula en capas puede comprender un sustrato metálico insoluble en agua recubierto con un producto de condensación de un ácido aminobenzoico con un aldehído, adecuado para acoplamiento con un compuesto que tenga afinidad biológica. Una partícula en capas puede comprender un núcleo formado de una partícula sencilla de un material magnéticamente sensible que tenga un recubrimiento de un material polimérico reticulado insoluble en agua que tenga grupos reactivos en la superficie de los mismos. Una partícula en capas puede comprender un núcleo de un material no magnético que tenga un recubrimiento de un material magnéticamente sensible. Una partícula en capas puede comprender una partícula polimérica orgánica que tenga un recubrimiento de ferrita; una partícula en capas puede comprender un núcleo de material termoplástico que tenga un recubrimiento de un material magnéticamente sensible (en al menos una parte de la superficie del núcleo); una partícula en capas puede comprender una microesfera de polialdehído recubierta con metal; una partícula en capas puede comprender un núcleo de una partícula polimérica (por ejemplo, poliestireno) que tenga un recubrimiento de polímero/óxido de metal magnéticamente sensible que cubre de forma uniforme el núcleo. Una partícula en capas puede comprender un núcleo de un material magnéticamente no sensible que tenga una capa de un material magnéticamente sensible y un recubrimiento magnéticamente no sensible. Por ejemplo, una partícula en capas puede comprender una

microesfera de polialdehído recubierta de metal encapsulado en agarosa, una perla de resina termoplástica (por ejemplo, poliestireno, cloruro de polivinilo, poliacrilato, nylon, etc.) que tenga de 1 a 25 % en peso de un polvo magnéticamente sensible unido a la superficie de la perla y un polímero que la recubre, teniendo el polímero de recubrimiento grupos funcionales para unirse a un componente biológicamente activo.

5 Las partículas compuestas pueden comprender un material magnéticamente sensible incluido dentro de un material magnéticamente no sensible. Los ejemplos representativos de partículas compuestas incluyen: (a) cristales magnéticos que contienen hierro (< 1000 Å) incorporados dentro de una estructura de vidrio y/o cristal; (b) una matriz de copolímero formada a partir de al menos un monómero monoetilénico (30-99 % en peso) que no se coordina con un complejo metálico, al menos un monómero polietilénico reticulable (0,5-50 % en peso) que no se coordina con un complejo metálico y al menos un monómero nucleófilo (0,5-30 % en peso) que puede coordinarse con un complejo metálico, con cristallitos encapsulados de un metal; (c) partículas imantables que tengan un tamaño medio (por ejemplo, de diámetro) menor de 300 Å, encapsuladas en una matriz de organopolisiloxano; (d) un producto de reacción en partículas de una forma soluble en agua de hierro y un polímero soluble en agua que tiene 10 sitios de coordinación disponibles (par de electrones libre para una unión coordinada con un átomo de metal de transición); (e) una matriz polimérica orgánica, inorgánica o sintética que contiene un material magnéticamente sensible; (f) una fase continua de una matriz polimérica insoluble en agua que tiene dispersados (incluidos) en la misma: un material magnéticamente sensible y un material particulado absorbente (seleccionado de carbón, talco, resinas de intercambio iónico, tierra de Batán, dióxido de silicio, óxidos de zirconio, aluminio o titanio, vidrio poroso, zeolitas, polímeros naturales o sintéticos, primeros o segundos anticuerpos polimerizados o enzimas polimerizadas, antígenos de superficie celular o receptores en una forma particulada, partículas subcelulares y células bacterianas); (g) partículas preparadas polimerizando uno o más monómeros en presencia de sólidos magnéticamente sensibles para formar directamente una matriz polimérica insoluble en agua sintética que tenga los sólidos incluidos de forma uniforme en la misma; (h) partículas de proteína o polipéptido reticulado y un material magnéticamente sensible 20 preparado combinando: una solución de disolvente orgánico de alto peso molecular (por ejemplo, poliestireno), un material magnéticamente sensible particulado y un agente de reticulación polifuncional (por ejemplo, polialdehído); (i) partículas poliméricas aromáticas de vinilo hidrófobo que tienen un diámetro medio de 0,03 a 5 micrómetros y un material magnéticamente sensible en una cantidad de 0,5 a 50 % en peso con respecto a la porción polimérica de las partículas, dispersándose el material magnéticamente sensible dentro de las partículas poliméricas; (j) una carga 30 seleccionada del grupo que consiste en un metal, aleación de metal, óxido de metal, sal de metal, sulfuro de metal, pigmento y compuesto de quelado metálico y una capa superficial oleófila sobre la carga y una capa de material polimérico sobre la superficie oleófila que cubre la carga.

Los reactivos magnéticamente sensibles formados como matriz o partículas compuestas pueden opcionalmente 35 incluir recubrimientos o capas adicionales de materiales magnéticamente sensibles o materiales magnéticamente no sensibles o mezclas de los mismos. Las composiciones de matriz pueden prepararse por cualquiera de una diversidad de métodos, incluyendo, pero sin limitación, (1) polimerización del material magnéticamente sensible con el monómero seleccionado, (2) hinchamiento del material de matriz con la introducción del material magnéticamente sensible en poros dentro de la matriz y similares. La matriz puede incluir materiales orgánicos e inorgánicos, tales como, por ejemplo, vidrio, celulosa, materiales poliméricos sintéticos, agarosa y similares. Los materiales poliméricos adecuados para la presente invención incluyen, pero sin limitación, polímeros de estireno; poliestirenos sustituidos; derivados de polinaftaleno; ácidos poliacrílicos y polimetacrílicos; poliacrilamida y polimetacrilamida; policarbonato; poliésteres; poliamidas; polipirrol; ácidos poliaminoaromáticos; polialdehídos; materiales proteínicos, tales como 40 gelatina, albúmina y similares; polisacáridos, tales como almidón, dextrano y similares; y copolímeros de materiales poliméricos. El polímero también puede usarse en una mezcla con una carga inerte o puede incluir un material absorbente. 45

Preferiblemente, las partículas de material magnéticamente sensible adecuadas para su uso en la presente invención son de forma sustancialmente esférica, aunque otras formas son adecuadas y pueden ser ventajosas en algunas circunstancias. Otras formas posibles incluyen, pero sin limitación, placas, varillas, barras y formas irregulares. El diámetro de partículas de material magnéticamente sensible preferiblemente varía de aproximadamente 0,01 micrómetros (μm) a aproximadamente 1.000 μm , más preferiblemente de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 100 μm y más preferiblemente de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 10 μm . Como se apreciará por los expertos en la materia, la composición, forma, tamaño y densidad del material magnéticamente sensible puede variar ampliamente y puede seleccionarse un material magnéticamente sensible basándose en tales factores como el análisis de interés y el protocolo de ensayo deseado. 50 55

De acuerdo con una realización de la presente invención, las partículas de material magnéticamente sensible puede seleccionarse para tener una gravedad específica de modo que permanezcan suspendidos dentro de la mezcla de reacción, potenciando de este modo la reactividad del miembro de unión específico. Generalmente, las partículas magnéticamente sensibles pequeñas que tienen un diámetro medio de menos de aproximadamente 0,03 μm (300 Å) pueden permanecer suspendidas en solución por agitación térmica sin sedimentación espontánea. En realizaciones alternativas, las partículas de material magnéticamente sensible pueden seleccionarse para tener una gravedad específica de modo que sedimenten en la mezcla de reacción, potenciando de este modo la reactividad del miembro de unión específico con un reactivo inmovilizado en una fase sólida. Generalmente, las partículas grandes de material magnéticamente sensible, por ejemplo, las que tienen un diámetro medio mayor de aproximadamente 10 60 65

µm, pueden responder a campos magnéticos débiles. Aunque pueden usarse partículas grandes o densas de material magnéticamente sensible, tales partículas pueden requerir que la mezcla de reacción se agite o remueva durante las etapas de incubación para inhibir la sedimentación de las partículas. En otra realización, las partículas de material magnéticamente sensible pueden seleccionarse para permanecer dispersadas en la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para permitir las reacciones de unión requeridas, sin necesidad de mezcla o agitación.

En la formación del reactivo magnéticamente sensible, la unión del miembro de unión con el material magnéticamente sensible puede conseguirse por cualquier mecanismo de unión o acoplamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, adsorción, unión covalente, reticulación (químicamente o a través de miembros de unión), una combinación de tales mecanismos de unión y similares. Típicamente, los grupos de acoplamiento y agentes de acoplamiento o unión se seleccionan de modo que la actividad de unión del miembro de unión específico no se modifique sustancialmente o se destruya tras la unión con el material magnéticamente sensible. La cantidad de miembro de unión que puede unirse al material magnéticamente sensible depende en gran medida de su concentración, las condiciones usadas y la cantidad y naturaleza de los grupos funcionales disponibles en el material magnéticamente sensible o agente de acoplamiento.

Preferiblemente, el miembro de unión específico se enlaza covalentemente con el material magnéticamente sensible y el enlace covalente puede formarse entre un componente y una forma químicamente activa del otro componente. Por ejemplo, un éster activo tal como N-hidroxisuccinimida puede introducirse en un componente y permitirse que reaccione con una amina libre en el otro componente para formar un acoplamiento covalente de los dos. Otros ejemplos incluyen, pero sin limitación, la introducción de maleimida a un componente, que después se permite que reaccione con restos de sulfhidrilo introducido o endógeno en el otro componente; la oxidación de grupos de carbohidrato introducidos o endógenos en un componente para formar aldehídos, que pueden reaccionar con aminas libres o hidrazidas en el otro componente. Cuando el marcador magnéticamente atraíble incluye una matriz o recubrimiento polimérico, el polímero puede seleccionarse de modo que contenga, o puede proporcionarse con, grupos reactivos adecuados, tales como, por ejemplo, azida, bromoacetilo, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, epóxido, carboxílico u otros grupos para facilitar la unión del miembro de unión específico. Los reactivos adecuados, así como técnicas de conjugación para sintetizar el reactivo magnéticamente sensible, se conocen bien por los expertos habituales en la materia. Se entenderá, por supuesto, que los métodos para sintetizar un reactivo magnéticamente sensible no pretenden limitar la invención.

El material de fase sólida y los reactivos de fase sólida móviles pueden generalmente comprender materiales que incluyen, pero sin limitación, polímeros, tales como, por ejemplo, polímeros de estireno; poliestireno sustituido; derivados de polinaftaleno; ácidos poliacrílico y polimetacrílico; poli(acrilamida) y polimetacrilamida; policarbonato; poliésteres; poliamidas; polipirrol; polipropileno; látex; politetrafluoroetileno; poli(acrilonitrilo); policarbonato; vidrio u otros materiales vítreos; ácidos poliaminoaromáticos; polialdehídos; materiales proteínicos, tales como gelatina, albúmina y similares; polisacáridos, tales como almidón, dextrano y similares; y copolímeros de materiales poliméricos.

Como ejemplos adicionales, pueden usarse materiales naturales, sintéticos o de origen natural que se modifican de forma sintética como un material de fase sólida. Los ejemplos de tales materiales incluyen, pero sin limitación, polisacáridos, tales como materiales celulósicos, incluyendo papel y similares y derivados de celulosa, tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa; sílice; partículas de silicio; materiales inorgánicos, tales como alúmina desactivada u otro material inorgánico finamente dividido dispersado de forma uniforme en una matriz porosa polimérica. La matriz polimérica puede comprender polímeros, tales como polímeros de cloruro de vinilo, copolímeros de cloruro de vinilo y propileno y copolímeros de polímero de cloruro de vinilo y acetato de vinilo; textiles sintéticos y de origen natural, tales como algodón, nylon y similares; geles porosos, tales como gel de sílice, agarosa, dextrano, gelatina y similares; películas poliméricas, tales como poli(acrilatos) y similares; membranas de unión a proteína; y similares. La fase sólida también puede comprender micropartículas, que pueden seleccionarse de cualquier tipo de material adecuado, incluyendo, pero sin limitación, poliestireno, polimetilacrilato, poli(acrilamida), polipropileno, látex, politetrafluoroetileno, poli(acrilonitrilo), policarbonato, vidrio y similares.

Aunque el material de fase sólida preferiblemente tiene una fuerza razonable o puede proporcionarse dicha fuerza por medio de un soporte, el material de fase sólida preferiblemente no interfiere con la producción de una señal detectable. Se entenderá, por supuesto, que el material de fase sólida muestra típicamente sensibilidad magnética relativamente menor que el material magnéticamente sensible y que su contribución magnética al ensayo se puede corregir, por ejemplo, situando dicho material de una manera que no esté sustancialmente afectado por un campo magnético. Como alternativa, el efecto del material de fase sólida puede diferenciarse del de material magnéticamente sensible. Como otra alternativa, dicho material puede desmagnetarse.

El medio para fijar un miembro de unión específico a una fase sólida para formar de este modo un reactivo de fase sólida móvil abarca tanto unión covalente como unión no covalente, que se han descrito anteriormente con respecto a sintetizar un reactivo magnéticamente sensible. Generalmente se prefiere que el miembro de unión específico esté unido a la fase sólida por unión covalente.

Métodos y dispositivos de ensayo

La siguiente descripción de métodos de ensayo y dispositivos se aplica al dispositivo y uso de la invención solamente en tanto que es coherente con el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Se proporcionan otras realizaciones descritas, ejemplificadas e ilustradas para fines de comparación.

Los métodos y dispositivos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier formato de ensayo adecuado que implique miembros de pares de unión específicos incluyendo, pero sin limitación, los miembros de pares de unión previamente descritos. Los métodos de ensayo de la presente invención utilizan la respuesta de un reactivo magnéticamente sensible a la influencia de un campo magnético para medir cualitativa o cuantitativamente la unión entre miembros de pares de unión específicos. De acuerdo con la presente invención, la presencia de un analito media el grado en que el reactivo magnéticamente sensible se une a un reactivo de fase sólida móvil. El grado de unión modulará la respuesta del reactivo magnéticamente sensible o la del reactivo de fase sólida móvil o ambos, a la influencia de un campo magnético. Por lo tanto, midiendo la respuesta del reactivo magnéticamente sensible o la del reactivo de fase sólida móvil, o ambos, al campo magnético, la presencia o cantidad de analito contenido en una muestra de ensayo puede determinarse de forma precisa.

Los reactivos y dispositivos magnéticamente sensibles de la presente invención pueden usarse en una diversidad de formatos de inmunoensayo. La presente invención, sin embargo, no se limita a inmunoensayos. En general, puede realizarse cualquier configuración de ensayo que use miembros de pares de unión específicos y un reactivo magnéticamente sensible, tal como, por ejemplo, las micropartículas superparamagnéticas usadas en la presente invención. Se conocen bien por los expertos habituales en la materia formatos de inmunoensayo y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.459.

Los formatos de inmunoensayo se describen particularmente bien en la columna 5, línea 55 a columna 9, línea 62 de la Patente de Estados Unidos N° 5.252.459.

La presente invención es aplicable a diversos formatos de ensayo competitivos y formatos de ensayo de tipo sándwich que se conocen bien en la técnica. Se han descrito numerosos formatos de ensayo competitivos, de inhibición y de tipo sándwich por los que un reactivo marcado se reparte entre una fase líquida y una fase sólida en relación con la presencia del analito en la muestra de ensayo.

De acuerdo con un formato de ensayo competitivo, un reactivo magnéticamente sensible puede comprender un primer miembro de unión (por ejemplo, un análogo de analito) unido a un material magnéticamente sensible, para formar de este modo un reactivo magnéticamente sensible. Un reactivo de fase sólida móvil puede comprender un material de fase sólida móvil, tal como un látex polimérico o micropartícula, a la que se une un segundo miembro de unión, uniéndose dicho segundo miembro de unión específicamente al analito y el primer miembro de unión, que se une al reactivo magnéticamente sensible. Durante el transcurso del ensayo, un analito en la muestra de ensayo y el reactivo magnéticamente sensible compiten por los sitios de unión en el reactivo de fase sólida móvil. Como alternativa, el miembro de unión específico unido a la fase sólida puede ser un análogo de analito seleccionado para competir con el analito por unión a un miembro de par de unión específico unido a un material magnéticamente sensible. Por lo tanto, la cantidad de reactivo magnéticamente sensible que se une a la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra de ensayo.

De acuerdo con un formato de ensayo de tipo sándwich, un primer miembro de unión específico se une a un material magnéticamente sensible para formar un reactivo magnéticamente sensible y un segundo miembro de unión específico se une a una fase sólida móvil para formar un reactivo de fase sólida móvil. Los miembros de unión específicos se seleccionan para unirse directamente o indirectamente al analito de interés. Durante el transcurso del ensayo, tanto el reactivo magnéticamente sensible como el reactivo de fase sólida móvil se unen al analito para formar un complejo. Por lo tanto, la cantidad de reactivo magnéticamente sensible que forma un complejo con el reactivo de fase sólida móvil uniéndose al analito es proporcional a la cantidad de analito en la muestra de ensayo.

De acuerdo con la presente invención, los protocolos de ensayo pueden comprender opcionalmente el uso de miembros de unión complementarios para unir indirectamente el analito o análogo de analito con el reactivo magnéticamente sensible o con el reactivo de fase sólida móvil. El miembro de unión complementario puede unirse a un reactivo de fase sólida móvil o a un reactivo magnéticamente sensible antes, durante o después de poner en contacto el reactivo de fase sólida móvil o el reactivo magnéticamente sensible con la muestra de ensayo u otros reactivos de ensayo.

Además, los protocolos de ensayo pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto los reactivos de ensayo y muestra de ensayo de forma simultánea para formar una mezcla de reacción o los reactivos de ensayo y muestras de ensayo pueden ponerse en contacto de forma secuencial y durante un periodo de tiempo adecuado para unión, para formar múltiples mezclas de reacción. De acuerdo con tales protocolos de ensayo, después de un periodo adecuado para unión para formar un complejo, el reactivo magnéticamente sensible que no ha experimentado una reacción de unión específica para formar un complejo (es decir, el reactivo magnéticamente sensible no unido) puede separarse del reactivo magnéticamente sensible que ha experimentado una reacción de unión específica para

formar un complejo (es decir, el reactivo magnéticamente sensible unido) debido a su comportamiento diferente en un campo magnético aplicado. Se entenderá, por supuesto, que la separación del reactivo magnéticamente sensible unido y el reactivo magnéticamente sensible no unido puede implicar la retirada completa del reactivo magnéticamente sensible no unido de la mezcla de reacción y/o del reactivo magnéticamente sensible unido.

La separación del reactivo magnéticamente sensible unido y el reactivo magnéticamente sensible no unido también puede implicar la segregación del reactivo magnéticamente sensible no unido del reactivo magnéticamente sensible unido de modo que el reactivo magnéticamente sensible no unido permanece en la mezcla de reacción pero no afecta de forma adversa a la respuesta detectable cuando el reactivo magnéticamente sensible unido se coloca en las cercanías de un campo magnético. Como alternativa, el reactivo magnéticamente sensible no unido, el reactivo magnéticamente sensible unido o el reactivo de fase sólida móvil pueden observarse con respecto a una respuesta a un campo magnético. Además, el reactivo magnéticamente sensible no unido, el reactivo magnéticamente sensible unido o el reactivo de fase sólida móvil pueden observarse con respecto a una respuesta a un campo magnético, por lo que puede observarse una relación de la repartición.

En general, los dispositivos descritos en este documento comprenden componentes para realizar ensayos de unión asistida magnéticamente como se enseñan en este documento. En consecuencia, tales dispositivos preferentemente comprenden (i) un recipiente de reacción; (ii) un generador de campo magnético para la aplicación de un campo magnético al reactivo magnéticamente sensible; y (iii) un medio de medición para evaluar el efecto del campo magnético generado por el generador de campo magnético sobre el reactivo magnéticamente sensible o el reactivo de fase sólida móvil, o ambos, como una medida de la presencia o cantidad de analito en la muestra de ensayo.

El recipiente de reacción puede ser cualquier dispositivo capaz de contener los reactivos de ensayo descritos en este documento y en el que el reactivo magnéticamente sensible no unido y el reactivo magnéticamente sensible unido pueden producirse en relación con la cantidad de un analito en una muestra de ensayo.

La separación del reactivo magnéticamente sensible unido del reactivo magnéticamente sensible no unido puede conseguirse por cualquier medio adecuado para repartición del reactivo magnéticamente sensible no unido y el reactivo magnéticamente sensible unido, tal como, por ejemplo, aplicación de un campo magnético.

El generador de campo magnético puede ser cualquier medio para generar un campo magnético que induzca una respuesta del reactivo magnéticamente sensible. Los generadores de campo magnético preferidos para la presente invención incluyen imanes permanentes y electroimanes. También se entenderá, por supuesto, que el generador de campo magnético también puede usarse para separar el reactivo magnéticamente sensible libre o no unido del reactivo magnéticamente sensible unido o en complejo.

La respuesta de un reactivo magnéticamente sensible a un campo magnético puede manifestarse de muchas formas medibles incluyendo una fuerza resultante o movimiento del reactivo tal como, por ejemplo, un cambio aparente en la fuerza que actúa sobre el reactivo en el recipiente de reacción, un desplazamiento del reactivo y similares. Se entenderá, por supuesto, que estas manifestaciones pueden medirse directamente mediante detección y medición de las manifestaciones del reactivo magnéticamente sensible, o las manifestaciones pueden medirse indirectamente mediante detección y medición del efecto del reactivo magnéticamente sensible en, por ejemplo, el reactivo de fase sólida móvil o el generador de campo magnético. La influencia del campo magnético sobre un reactivo magnéticamente sensible puede observarse o detectarse y medirse mediante cualquier medio adecuado para medir directa o indirectamente la respuesta del reactivo magnéticamente sensible al campo magnético. Por ejemplo, (a) un cambio en el peso aparente puede detectarse y medirse por un equilibrio; (b) un cambio de masa aparente puede detectarse y medirse por un equilibrio o un cambio resultante de la frecuencia de un oscilador, tal como un cristal de cuarzo; (c) un desplazamiento puede detectarse y medirse por un sensor óptico para evaluar la magnitud de un cambio desde una posición inicial a una posición posterior asumida por el reactivo magnéticamente sensible, el reactivo de fase sólida móvil o el complejo que comprende un reactivo de fase sólida móvil y un reactivo magnéticamente sensible; (d) un movimiento puede detectarse y medirse por detector de movimiento para evaluar movimiento, tal como, por ejemplo, una película piezoeléctrica, o una bobina, tal como, por ejemplo, un susceptómetro, que puede crear un campo que se interrumpe de forma medible por la presencia y/o movimiento de material magnético; y (e) un cambio en la cantidad de tensión puede detectarse incorporando materiales sensibles a tensión en un recipiente o material de fase sólido de modo que tras la aplicación de un campo magnético, el cambio de tensión será detectable. Se entenderá, por supuesto, que dependiendo del ensayo particular, puede preferirse detectar, directa o indirectamente, la respuesta del reactivo magnéticamente sensible no unido, la respuesta del reactivo magnéticamente sensible unido o tanto la respuesta del reactivo magnéticamente sensible unido como el reactivo magnéticamente sensible no unido al campo magnético. También se entenderá, por supuesto, que puede usarse una amplia diversidad de instrumentos para detectar cambios de masa, cambios de posición, movimientos, cambios de peso, cambios de fuerza, susceptibilidad magnética, inducción, cambios ópticos y similares, todos los cuales resultan de la interacción entre un campo magnético y el reactivo magnéticamente sensible.

La presente descripción resuelve los problemas de ensayos de aglutinación y heterogéneos convencionales permitiendo que el reactivo magnéticamente sensible se asocie con reactivos similares o con otras partículas magnéticamente no sensibles, aplicando después un campo magnético y midiendo las consecuencias de la fuerza

magnética ejercida sobre el reactivo magnéticamente sensible para proporcionar resultados de ensayo cualitativos o cuantitativos. Pueden determinarse fácilmente pequeños niveles de fuerza usando detectores que incluyen, pero sin limitación, balanzas electrónicas; sensores ópticos; dispositivos sensores de presión piezoeléctrica tales como, por ejemplo, dispositivos de silicio micromecánicos o microplacas electrónicas; dispositivos de fibra vibrante; bobinas que producen un campo que se interrumpe por la presencia de un reactivo magnéticamente sensible, tal como, por ejemplo, bobinas de inducción y similares; y dispositivos de brazo voladizo incluyendo, pero sin limitación los usados para percibir cambios de fuerza en un microscopio de fuerza atómica; y similares. Estos detectores permiten la realización de ensayos muy sensibles y evitan la necesidad de amplificación del marcador, como se requiere en muchos ensayos convencionales.

Los ensayos de unión heterogéneos convencionales requieren el lavado vigoroso de la fase sólida para separar reactivo marcado unido y reactivo marcado no unido y para suprimir la unión no específica de materiales a la fase sólida. Tales etapas de lavado complican el protocolo de ensayo y restringen el ensayo al uso de miembros de pares de unión específicos que tienen alta afinidad, es decir, una fuerza de unión que resistirá dicha manipulación física.

En ensayos de aglutinación de partículas convencionales, pueden usarse miembros de unión de baja afinidad porque pueden cooperar varios sitios de unión en cada miembro para proporcionar alta avidéz y la ausencia de etapas de lavado permite que se mantengan asociaciones débiles simplificando a la vez el formato de ensayo. Resulta amplificación de señal porque la interacción de unos pocos sitios de unión puede provocar la agregación de complejos varios órdenes de magnitud mayores en tamaño y masa que los miembros de unión original y por lo tanto proporcionar un cambio macroscópico, que puede interpretarse visualmente. Sin embargo, los ensayos de aglutinación de partículas con frecuencia son difíciles de interpretar, no producen resultados cuantitativos y no son fácilmente aptos para automatización.

De acuerdo con la presente descripción, la intensidad del campo magnético puede manipularse de forma precisa, por ejemplo, por medio de un electroimán, un imán permanente móvil o codificando campos magnéticos de fuerzas específicas o gradientes o ambos en materiales magnéticamente sensibles. Puede seleccionarse una intensidad de campo o gradiente o ambos que sea óptimo, para un ensayo particular y reactivos de unión particulares permitiendo de este modo la corrección de variaciones entre lotes en otros reactivos o en la unión selectiva de ciertos subconjuntos de reactivos o complejos para obtener resultados de ensayo más precisos. Debe entenderse que las ventajas anteriormente mencionadas permiten que los ensayos se adapten fácilmente al control por ordenador.

Aunque se contemplan diversos dispositivos y protocolos de ensayo por la presente descripción, los siguientes protocolos representan ejemplos y no se limitan a un formato de ensayo de tipo sándwich y formato de ensayo indirecto/competitivo usando detección asistida por imán de un reactivo magnéticamente sensible. A este respecto, pueden realizarse los siguientes protocolos en cualquier orden de etapas o, como alternativa, de una manera simultánea.

Protocolo A

1) Un primer miembro de unión específico que tiene un sitio de unión capaz de unirse a un primer sitio de unión en el analito de interés se une a un material magnéticamente sensible para formar un reactivo magnéticamente sensible;

2) un segundo miembro de unión específico que tiene un sitio de unión capaz de unirse a un segundo sitio de unión en el analito de interés se une a una fase sólida móvil para formar un reactivo de fase sólida móvil;

3) una muestra de ensayo se pone en contacto con el reactivo de fase sólida móvil para formar una primera mezcla de reacción, por lo que el analito de interés se une al reactivo de fase sólida móvil;

4) la primera mezcla de reacción se pone en contacto con el reactivo magnéticamente sensible para formar una segunda mezcla de reacción, por lo que el reactivo magnéticamente sensible forma un complejo con el reactivo de fase sólida móvil y el analito por unión al analito unido (la proporción de reactivo magnéticamente sensible que forma un complejo con el reactivo de fase sólida móvil y el analito está directamente relacionada con la cantidad de analito en la muestra de ensayo);

5) la segunda mezcla de reacción se somete a un detector;

6) la segunda mezcla de reacción se expone a un campo magnético de modo que se ejerce una fuerza magnética sobre el complejo del reactivo magnéticamente sensible, el reactivo de fase sólida móvil y el analito, manifestándose la influencia de esta fuerza por el movimiento o captura de los complejos de reactivo de fase sólida móvil-analito-reactivo magnéticamente sensibles a una velocidad diferente de la del reactivo magnéticamente sensible no en complejo o de la del reactivo de fase sólida móvil no en complejo y el grado de la manifestación se determina por detector; y

7) el grado medible de la manifestación proporciona una medida de la cantidad del reactivo magnéticamente sensible que se ha incorporado en complejos.

Protocolo B

1) Un primer miembro de unión específico que tiene un sitio de unión (primer sitio de unión) capaz de unirse a un sitio de unión en el analito de interés (segundo sitio de unión) se une a un material magnéticamente

sensible para formar un reactivo magnéticamente sensible;

2) un segundo miembro de unión específico que tiene un sitio de unión (tercer sitio de unión) capaz de unirse al primer sitio de unión se une a un material de fase sólida móvil para formar un reactivo de fase sólida móvil;

3) una muestra de ensayo se pone en contacto con el reactivo magnéticamente sensible para formar una primera mezcla de reacción, por lo que el analito se une al reactivo magnéticamente sensible;

4) la primera mezcla de reacción se pone en contacto con el reactivo de fase sólida móvil para formar una segunda mezcla de reacción, por lo que el reactivo magnéticamente sensible se une al reactivo de fase sólida móvil por unión con el segundo miembro de unión específico (la proporción de reactivo magnéticamente sensible que se une al reactivo de fase sólida móvil está inversamente relacionada con la cantidad de analito en la muestra de ensayo);

5) la segunda mezcla de reacción se somete a un detector;

6) la segunda mezcla de reacción se expone a un campo magnético tal que se ejerce una fuerza magnética sobre el complejo del reactivo magnéticamente sensible unido a la fase sólida, manifestándose la influencia de esta fuerza por el movimiento o captura de los complejos que contienen el reactivo magnéticamente sensible y el reactivo de fase sólida móvil a una velocidad diferente de la del reactivo magnéticamente sensible no en complejo o de la del reactivo de fase sólida móvil no en complejo y el grado de la manifestación se determina por detector; y

7) el grado de la manifestación proporciona una medida de la cantidad del reactivo magnéticamente sensible que se ha incorporado en complejos.

La Figura 1 ilustra las reacciones de unión del Protocolo B. La Figura 1 ilustra esquemáticamente la unión de un reactivo magnéticamente sensible 2 (por ejemplo, ferrofluido) con un reactivo de fase sólida móvil 4 (por ejemplo, látex de polipirrol) para producir un complejo 6 con propiedades magnéticas alteradas. Una partícula de ferrofluido que no está en un complejo no respondería tan rápidamente a un campo magnético aplicado como un complejo que contiene una multiplicidad de partículas de ferrofluido.

En el Protocolo A o Protocolo B, las etapas 5 y 6 pueden invertirse.

Las siguientes realizaciones ejemplifican como realizar inmunoensayos. La realización 7 se relaciona con la siguiente invención en tanto que es coherente con las reivindicaciones adjuntas.

Realización 1

Las Figuras 2 y 3 ilustran esquemáticamente la medición asistida magnéticamente de la unión de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y sustancialmente sigue el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se halla sometido a un detector (etapa 6 del Protocolo A).

Como se muestra en la Figura 2, el recipiente de reacción 10 contiene una mezcla de reacción 12, que comprende el analito 14, una suspensión de partículas del reactivo de fase sólida móvil 16 y partículas del reactivo magnéticamente sensibles 18. La mezcla de reacción 12 se somete al detector 20 situando el recipiente de reacción 10 sobre o fijando el recipiente de reacción 10 a un soporte 22. El soporte 22 se apoya sobre el detector 20. El detector 20 puede ser una microbalanza que se carga por la parte superior típica, que tiene un platillo 26, que recibirá el soporte 22. Una vez que el platillo 26 recibe el soporte 22 y el soporte 22 recibe el recipiente de reacción 10, el detector 20 puede tararse o establecerse en equilibrio (centrarse en cero).

Como se muestra en la Figura 3, se pone un imán 28 próximo al fondo del recipiente de reacción 10, por lo que el campo magnético ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible en la mezcla de reacción 12. Generalmente, el imán 28 se fija a una rama 30, que permite ajustes precisos del movimiento del imán 28 hacia y en sentido contrario al recipiente de reacción 10. El campo magnético debe proporcionarse por medio de un imán permanente o un electroimán y puede aplicarse de forma intermitente o continua. Puede usarse un electroimán de modo que el campo magnético pueda cambiarse apagando y encendiendo en lugar de moviendo el imán 28 o el recipiente de reacción 10. También puede controlarse un electroimán por un ordenador, permitiendo de este modo ajustes finos de la fuerza del campo magnético. Además, puede usarse un electroimán para generar un campo magnético alterno, que puede proporcionar la ventaja adicional de provocar la mezcla del reactivo magnéticamente sensible en la mezcla de reacción 12, si se desea dicha mezcla.

La fuerza ejercida sobre el reactivo magnéticamente sensible en el recipiente de reacción 10 se manifiesta como un cambio aparente del peso del recipiente de reacción, que se registra en la pantalla 32 del detector 20. La fuerza magnética que se ejerce sobre una partícula del reactivo de fase sólida móvil que tiene más de una partícula del reactivo magnéticamente sensible unido a él (por medio de un analito) es mayor que la fuerza ejercida sobre una partícula del reactivo de fase sólida móvil solo o sobre una partícula del reactivo magnéticamente sensible solo. En consecuencia, los complejos 34 que comprenden en el reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible se mueven más rápidamente en el campo magnético que las partículas individuales del reactivo magnéticamente sensible. La fuerza de atracción entre los complejos 34 y el imán 28 provoca que se ejerza una fuerza sobre el recipiente de reacción 10 y por lo tanto sobre el soporte 22 en la misma dirección que la debida

a la gravedad, que se registra en la pantalla 32 del detector 20 como un aumento del peso aparente. A medida que los complejos 34 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran hacia el fondo del recipiente de reacción 10 y por tanto se mueven más cerca del imán 28, la fuerza entre los complejos 34 y el imán 28 aumenta, acelerando adicionalmente el movimiento de los complejos 34. A medida que los complejos 34 alcanzan el fondo del recipiente de reacción 10 y se acumulan allí, ejercen su máxima fuerza sobre el recipiente de reacción 10 y su soporte 22 debido a su proximidad al imán. Este fenómeno aumenta adicionalmente el peso aparente del recipiente de reacción 10 como se indica por la lectura de la pantalla. La velocidad a la que los complejos 34 llegan al fondo del recipiente de reacción 10 y por lo tanto la tasa de cambio de peso aparente registrada por el detector 20 es una medida del grado de unión entre el reactivo de fase sólida móvil, el analito y reactivo magnéticamente sensible, y por lo tanto de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. Esta velocidad puede registrarse como un cambio de peso aparente en función del tiempo en un dispositivo de registro convencional. El cambio de peso aparente es una medida de la cantidad de analito en la mezcla de ensayo.

Realización 2

Las Figuras 4 y 5 son vistas esquemáticas de un medio alternativo para la medición de la unión de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y sigue sustancialmente el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se haya situado en un detector (etapa 6 del Protocolo A).

Como se muestra en la Figura 4, un recipiente de reacción 100 contiene una mezcla de reacción 102, que comprende el analito 104, una suspensión de partículas del reactivo de fase sólida móvil 106 y partículas de un reactivo magnéticamente sensible 108. En la Figura 4, la mezcla de reacción se somete a un detector 110 situando el recipiente de reacción 100 sobre o fijando el recipiente de reacción 100 a un soporte 112. El soporte 112 sitúa el recipiente de reacción 100 sobre el detector 110. Puede usarse una microbalanza cargada por la parte superior típica con un platillo sensible a peso 116 como el detector 110. Se sitúa un imán 118 sobre el platillo 116 debajo de la posición del recipiente de reacción 100. Antes de que se sitúe el recipiente de reacción 100 en el soporte 112 o antes o justo después de que la mezcla de reacción se sitúe en el recipiente de reacción 100, el detector 110 puede tararse o establecerse en equilibrio (centrarse en cero).

La Figura 4 muestra el procedimiento justo después de que el recipiente de reacción 100 se halla situado en el soporte 112. El campo magnético producido por el imán 118 ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible en la mezcla de reacción 102 en la dirección del imán y se ejerce una fuerza correspondiente sobre el imán en la dirección del reactivo magnéticamente sensible. La fuerza ejercida sobre el imán tiende a contrarrestar la fuerza ejercida sobre él debido a la gravedad, dando como resultado un cambio de la respuesta del detector 110. Esta respuesta de detector inicial se debe a la fuerza entre el imán y el reactivo magnéticamente sensible en sus posiciones iniciales. Si la balanza se centra en cero en este punto, esta respuesta inicial será parte del peso de tara de la balanza y el detector 110 presentará una lectura cero. La respuesta del detector 110 puede observarse en la pantalla 120.

El campo magnético producido por el imán 118 ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible en la mezcla de reacción 102. La fuerza magnética que se ejerce sobre una partícula del reactivo de fase sólida móvil que tiene más de una partícula del reactivo magnéticamente sensible unido a él (por medio de un analito) es mayor que la fuerza ejercida sobre una partícula del reactivo de fase sólida móvil solo o sobre una partícula del reactivo magnéticamente sensible solo. En consecuencia, los complejos 122 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible se mueven más rápidamente en el campo magnético que las partículas individuales del reactivo magnéticamente sensible. A medida que los complejos 122 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran hacia el fondo del recipiente de reacción 100, y por lo tanto se acercan al imán 118, la fuerza entre los complejos 122 y el imán 118 aumenta, acelerando adicionalmente el movimiento de los complejos. Como se muestra en la Figura 5, a medida que los complejos 122 alcanzan el fondo del recipiente de reacción 100 y se acumulan allí, ejercen su máxima fuerza sobre el imán 118, reduciendo adicionalmente el peso aparente del imán 118, como se indica por un cambio en la lectura del detector. La velocidad a la que los complejos 122 alcanzan el fondo del recipiente de reacción 100 y por lo tanto la velocidad de cambio de peso aparente registrada por el detector 110 es una medida del grado de unión entre el reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible y por lo tanto de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. Esta velocidad puede registrarse como un cambio de peso aparente en función del tiempo en un dispositivo de registro. El cambio final en respuesta de detector después de que todos los complejos hayan migrado al fondo del recipiente de reacción 100 o la velocidad de cambio de la respuesta del detector durante la migración de los complejos puede usarse para medir la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción y por lo tanto en la mezcla de ensayo original. En la Figura 5, las flechas dentro de la figura representan la fuerza entre los complejos y el imán.

Realización 3

Las Figuras 6 y 7 son vistas esquemáticas de un medio alternativo para la medición de la unión de reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y sigue sustancialmente el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se halla situado sobre un detector (etapa 6 del Protocolo A).

Como se muestra en la Figura 6, un recipiente de reacción 200 contiene una mezcla de reacción 202, que comprende el analito 204, una suspensión de partículas de un reactivo de fase sólida móvil 206 y partículas de un reactivo magnéticamente sensible 208. La mezcla de reacción se somete a un detector 210 situando el recipiente de reacción 200 sobre o fijando el recipiente de reacción 200 a un soporte 212. El soporte 212 sitúa el recipiente de reacción 200 sobre un sensor 214, que comprende un diafragma de material sensible 216 que tiene un imán 218 unido al mismo. El diafragma de material flexible 216 está soportado sobre una base 220. El detector 210 comprende un transductor de efecto Hall 222 que se sitúa debajo del diafragma de material sensible 216. La detección se consigue controlando la salida de un circuito electrónico conectado al transductor de efecto Hall 222. Los cambios de la fuerza sobre el imán 218 dan como resultado cambios en su posición relativa al transductor de efecto Hall 222, debido a la flexión del diafragma 216. Esto a su vez da como resultado un cambio del campo magnético detectado por el transductor de efecto Hall 222, que se manifiesta por un cambio en la salida del circuito electrónico. La Figura 6 muestra el procedimiento justo después de que se haya situado el recipiente de reacción 200 sobre el soporte 212 y se halla centrado en cero el detector.

El imán 218 unido al diafragma 216 se sitúa en proximidad al recipiente de reacción 200, por lo que el campo magnético ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible en el mismo. Como resultado, los complejos 224 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible se mueven más rápidamente en el campo magnético que las partículas individuales del reactivo magnéticamente sensible. A medida que los complejos 224 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran hacia el fondo del recipiente de reacción 200 y por lo tanto se mueven más cerca del imán 218, la fuerza entre los complejos 224 y el imán 218 aumenta, acelerando adicionalmente el movimiento de los complejos 224. Como se muestra en la Figura 7, a medida que los complejos 224 alcanzan el fondo del recipiente de reacción 200 y se acumulan allí, ejercen su máxima fuerza de atracción sobre el imán 218, esta fuerza se ejerce a su vez sobre el diafragma 216, provocando que se flexione y desplace el imán 218 lejos del transductor 222. El grado de desplazamiento desde la posición original del imán 218 depende de la cantidad del reactivo magnéticamente sensible unido al reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y se manifestará como una alteración de la señal producida por el circuito electrónico. La velocidad a la que los complejos 224 alcanzan el fondo del recipiente 200 y por lo tanto la velocidad del cambio de señal registrado por el circuito transductor es una medida del grado de unión entre el reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible y por lo tanto de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. Esta velocidad puede registrarse como un cambio de peso aparente en función del tiempo en un dispositivo de registro. La velocidad de cambio de señal puede observarse en una pantalla 226. El cambio final en respuesta del detector después de que todos los complejos hayan migrado al fondo del recipiente de reacción 200 o la velocidad de cambio de la respuesta del detector durante la migración de los complejos puede usarse para medir la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción y por lo tanto en la mezcla de ensayo original. El dispositivo de esta realización puede hacerse funcionar en cualquier orientación espacial.

Pueden usarse otros dispositivos de medición de proximidad además del transductor de efecto Hall 222. Los ejemplos representativos de tales dispositivos incluyen dispositivos ópticos en los que se refleja un rayo de luz desde el fondo del diafragma 216 a un detector, provocando un desplazamiento del diafragma una alteración de la intensidad de la luz que alcanza al detector. Pueden usarse dispositivos ópticos que miden el cambio de patrones de interferencia de la luz reflejada desde el diafragma en función de distorsión o distancia de la posición. También pueden usarse métodos no ópticos para determinar cambios de la forma o posición del diafragma, tales como los sensores de capacitación habitualmente usados como detectores de proximidad. En lugar del diafragma, pueden usarse otros elementos flexibles, tales como tiras, muelles, brazos voladizos y similares. En la Figura 7, las flechas dentro de la figura representan la fuerza entre los complejos y el imán.

Realización 4

La Figura 8 y Figura 9 son vistas esquemáticas de un medio alternativo para la medición de la unión de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito), y sigue sustancialmente el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se haya colocado en el detector (etapa 6 del Protocolo A).

Como se muestra en la Figura 8, un recipiente de reacción 300 contiene una mezcla de reacción 302, que comprende el analito 304, una suspensión de partículas de un reactivo de fase sólida móvil 306 y partículas de un reactivo magnéticamente sensible 308. En la Figura 8, la mezcla de reacción 302 se somete a un detector 310 ajustando el recipiente de reacción 300 sobre o fijando el recipiente de reacción 300 a un sensor 312. El sensor 312 comprende un diafragma de un material flexible 314. El diafragma del material flexible 314 está soportado sobre una base 316. La detección se consigue por medio de una fuente de luz 318 y un sensor óptico 320. La luz de la fuente de luz 318 se refleja de un sitio reflectante 321 en el diafragma 314 sobre el sensor óptico 320. Cualquier desviación de la posición del diafragma 314 da como resultado un desplazamiento de la posición o deflexión de la luz reflejada que alcanza el sensor óptico 320, provocando de este modo un cambio en el resultado del sensor óptico 320. Debe entenderse que el diafragma 314 en sí mismo puede servir como un medio para detectar la posición, reflejándose luz directamente de la superficie inferior del diafragma 314.

Como se muestra en la Figura 9, un imán 322 se sitúa en proximidad al diafragma 314, por lo que el campo magnético ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible en la mezcla de reacción. Como resultado,

los complejos 326 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible se mueven más rápidamente en el campo magnético que las partículas individuales del reactivo magnéticamente sensible. A medida que los complejos 326 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran hacia el fondo del recipiente de reacción 300 y por lo tanto se acercan al imán 322, la fuerza entre los complejos 326 y el imán 322 aumenta, acelerando adicionalmente el movimiento de los complejos 326. A medida que los complejos 326 alcanzan el fondo del recipiente de reacción 300 y se acumulan allí, ejercen su máxima fuerza de atracción sobre el imán 322. Esta fuerza a su vez se ejerce sobre el diafragma 314, provocando de este modo que este se flexione. El grado de desplazamiento o distorsión desde la posición original del diafragma 314 depende en gran medida del grado de unión entre el reactivo magnéticamente sensible, el analito y el reactivo de fase sólida móvil y por lo tanto de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. El grado de unión puede medirse por el detector 310. Debe entenderse que el recipiente de reacción 300 puede fijarse permanentemente al diafragma flexible 314 y reutilizarse retirando y reemplazando la mezcla de reacción 302. También debe entenderse que el recipiente de reacción 300 o el diafragma flexible 314 pueden ser desechables. También debe entenderse que el soporte flexible no necesita estar en forma de un diafragma. Puede usarse cualquier soporte flexible o desplazable, tal como, por ejemplo, brazos voladizos, sostenedores elásticos, muelles o dispositivos flotantes.

Debe entenderse que el material flexible en sí mismo puede actuar como el recipiente de reacción, colocándose la mezcla de reacción directamente sobre él. Debe entenderse adicionalmente que el material flexible puede ser de una forma tal que forme sitios en los que podría contenerse la mezcla de reacción. También debe entenderse que el material flexible puede ser una red que puede moverse a través del sensor. En la Figura 9, las flechas dentro de la figura representan la fuerza entre los complejos y el imán.

Realización 5

La Figura 10 y Figura 11 son vistas esquemáticas de otro medio para medición de la unión de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y sustancialmente sigue el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se haya colocado en un detector (etapa 6 del protocolo A).

Como se muestra en la Figura 10, un recipiente de reacción 400 comprende un pocillo 402, que tiene una tapa 404. El pocillo 402 contiene una mezcla de reacción 406. Si está presente el analito 408, una parte del reactivo magnéticamente sensible 410 se une al reactivo de fase sólida móvil 412 para formar complejos 414 (por medio del analito). El pocillo 402 se sitúa sobre o se fija a un dispositivo de detección de fuerza, tal como una balanza 416 que tiene un platillo 418, que recibe el pocillo 402. Una vez que la balanza 416 recibe el pocillo 402, la balanza 416 puede centrarse en cero.

Como se muestra en la Figura 11, un imán 420 se pone cerca de la tapa 404, por lo que el campo magnético ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible dentro del pocillo 402. Bajo la influencia de esta fuerza, los complejos 414 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran a la parte inferior de la tapa 404 en la que la fuerza de atracción magnética es más intensa debido a la proximidad más cercana con el imán 420. El reactivo magnéticamente sensible no unido 410 se mueve más lentamente bajo este nivel de intensidad de campo magnético que los complejos 414 y tarda más en alcanzar la parte inferior de la tapa 404. A medida que los complejos 414 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible se acumulan en la parte inferior de la tapa 404, producen una fuerza hacia arriba contra ella, contrarrestando la fuerza de la gravedad y provocando una reducción del peso aparente del pocillo 402, que se registra en la pantalla 422 de la balanza 426. La velocidad a la que los complejos 414 alcanzan la parte inferior de la tapa 404 y por lo tanto la tasa de cambio de peso aparente registrado por la balanza 416, también es una medida del grado de unión entre el reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible y por lo tanto también es una medida de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. Esta tasa puede registrarse como un cambio de peso aparente en función del tiempo en un medio de registro. Este método también puede aplicarse usando recipientes de reacción abiertos, sirviendo la tensión superficial de la superficie de mezcla de reacción el mismo fin que la tapa. La tasa aparente de cambio del peso del pocillo 402 será rápida al principio pero disminuirá a medida que se capturan todos los complejos. El cambio total de peso en este criterio de valoración puede usarse para medir la cantidad de analito en la mezcla de reacción. En la Figura 11, las flechas dentro de la figura representan la fuerza entre los complejos y el imán. Como alternativa, el imán 420 podría unirse a una balanza de modo que se medirían los cambios de la fuerza ejercida sobre el imán por los complejos.

Realización 6

Las Figuras 12 y 13 ilustran un detector alternativo para la medición de la unión de un reactivo magnéticamente sensible con un reactivo de fase sólida móvil (por medio del analito) y sustancialmente sigue el Protocolo A después de que la mezcla de reacción se haya colocado en el detector (etapa 6 del Protocolo A).

Como se muestra en la Figura 12 y en más detalle en la Figura 13, un recipiente de reacción 500 comprende un pocillo 502 que contiene una mezcla de reacción 503 que comprende partículas de un reactivo magnéticamente sensible 504, un reactivo de fase sólida móvil 506 y, si está presente, un analito 508. Al menos una parte del reactivo magnéticamente sensible 504 está unida a partículas del reactivo de fase sólida móvil 506 (por medio del analito

508). La mezcla de reacción 503 se somete a un detector 510 situando el recipiente de reacción 500 en o fijando el recipiente de reacción 500 a un primer soporte 512. El soporte 512 sirve para situar el recipiente de reacción 500 cerca de un imán 514, que está unido a un segundo soporte 516. El segundo soporte 516 tiene una cuchilla 518 que se apoya sobre una superficie sólida 520 y una rama lateral 522 que cubre el platillo 524 de una balanza 526. El segundo soporte 516 se coloca de una manera tal que es libre de rotar sobre su cuchilla 518 y se mantiene en su posición vertical solamente por el apoyo de la rama lateral 522 sobre el platillo 524 de la balanza 526 a través de un tornillo de ajuste 527. Una vez que se han colocado los soportes 512, 516, la balanza 526 puede tararse o establecerse en equilibrio (centrarse en cero).

El pocillo 502 se sitúa después en o se fija al primer soporte 512, poniéndolo de este modo cerca del imán 514, por lo que el campo magnético ejerce una fuerza sobre el reactivo magnéticamente sensible dentro del pocillo 502. Bajo la influencia de esta fuerza, los complejos 528 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible migran al lateral del pocillo 502 en el que la atracción magnética es más intensa, debido a la proximidad más cercana del imán 514. El reactivo magnéticamente sensible no unido 504 se mueve más lentamente bajo este nivel de intensidad de campo magnético y tarda más en alcanzar el lateral del pocillo 502.

Los complejos 528 del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible producen una fuerza sobre el imán 514 dirigida lateralmente hacia el pocillo 502. Esta fuerza contrarresta la fuerza de la rama lateral 522 del segundo soporte 516 que se apoya sobre el platillo 524 de la balanza 526, dando como resultado una reducción del peso aparente de la rama lateral 522 indicada por la balanza 526. La fuerza ejercida sobre el imán no es suficiente para mover sustancialmente el segundo soporte 516, pero es suficiente solamente para reducir su peso apoyado en el platillo de la balanza 524. También están disponibles dispositivos de balanza que mantienen la posición del platillo independientemente del peso que se apoya sobre él. También debe entenderse que el concepto de esta realización no se restringe al uso de balanzas. Puede usarse cualquier dispositivo de medición de fuerza, incluyendo los descritos anteriormente, es decir, los que usan soportes flexibles y sensores de posición ópticos u otros. La velocidad a la que los complejos 528 alcanzan el lateral del pocillo 502 y por lo tanto la tasa de cambio de peso aparente registrada por la balanza 526, es una medida del grado de unión entre el reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible, y por lo tanto de la cantidad de analito presente en la mezcla de reacción. Esta tasa puede registrarse como un cambio de peso aparente en función del tiempo en un medio de registro.

Realización 7 (invención)

Como una realización adicional de la presente invención, las Figuras 14A y 14B ilustran un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para realizar ensayos analíticos. El dispositivo 600 comprende un canal capilar 602 que tiene uno o más sitios magnéticos 604. La mezcla de reacción 606 se extrae por el canal 602 por acción capilar. La mezcla de reacción contiene un reactivo magnéticamente sensible 610, el analito 612 y un reactivo de fase sólida móvil 614. A medida que la mezcla de reacción 606 fluye a través del canal 602, pasa sobre el sitio o sitios magnéticos 604, en cuya posición o posiciones los complejos 616 del reactivo de fase sólida móvil 614, el analito 612 y el reactivo magnéticamente sensible 610 preferentemente se acumulan contra la pared del canal 602. En algunas aplicaciones, puede ser ventajoso seleccionar la intensidad o gradiente del campo magnético en el sitio o sitios magnéticos, o el tamaño y composición del reactivo magnéticamente sensible, de modo que el reactivo magnéticamente sensible se acumulará si no está unido o forma un complejo con el reactivo de fase sólida móvil. La presencia o alcance de esta acumulación del reactivo de fase sólida móvil puede medirse de una diversidad de maneras.

En una realización preferida de la presente invención, las partículas del reactivo de fase sólida móvil 614 o partículas del reactivo magnéticamente sensible 610 se fabrican de modo que la acumulación de los complejos 616 del reactivo de fase móvil 614, el analito 612 y el reactivo magnéticamente sensible 610 en el sitio o sitios magnéticos 604, provoque que se formen resultados visibles. Sin embargo, debe entenderse que la acumulación de los complejos 616 puede detectarse o medirse por emisión de fluorescencia, reflectividad, densitometría, actividad enzimática o cualquiera de los métodos de las otras realizaciones descritas en este documento o por otro medio.

En una realización particularmente preferida, el sitio de imán 604 puede ser una cinta de grabación magnética o una tira magnética similar a la hallada en una tarjeta de crédito convencional. El sitio magnético 604 también puede servir como una superficie interior del canal capilar 602. El sitio o sitios magnéticos 604 pueden ser sencillos o múltiples, de diversas formas, y de diversos gradientes o intensidades de campo, de modo que los complejos del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible que tienen diferentes relaciones de reactivo de fase sólida móvil y reactivo magnéticamente sensible se capturan en un sitio o sitios diferentes 604 como un indicio de concentración de analito en la muestra de ensayo.

Las intensidades de campo, gradientes, tamaños y formas del sitio o sitios magnéticos así como el tamaño, forma y composición del reactivo magnéticamente sensible pueden seleccionarse para optimizar resultados cualitativos, por ejemplo, positivos/negativos, o resultados más cuantitativos, por ejemplo, semicuantitativos. Por ejemplo, podría codificarse una serie de sitios de captura magnética idénticos a lo largo del fondo del canal capilar ilustrado en las Figuras 14A y 14B. Cada sitio podría codificarse de modo que tuviera una capacidad limitada para unirse a los

complejos que comprenden el reactivo magnéticamente sensible y el reactivo de fase sólida móvil. A medida que la mezcla de reacción avanza corriente abajo a lo largo del canal, los complejos se encontrarían en primer lugar con los sitios de captura magnética más corriente arriba de la serie y se acumularían allí. En una mezcla de reacción que contenga pocos complejos, solamente los sitios de captura magnéticos más corriente arriba presentarían

5

10

acumulación de complejos. Si, sin embargo, hubiera suficientes complejos para saturar los sitios de captura magnética más corriente arriba, fluirían complejos adicionales más allá de ese sitio para acumularse en los siguientes sitios de captura magnética más corriente arriba y así sucesivamente. El número de sitios de captura magnética que presentan acumulación de complejos serviría entonces como una medida del alcance de la formación de complejos en la mezcla de reacción y por lo tanto de la concentración de analito en la muestra de ensayo.

Como alternativa, en ciertos formatos de ensayo, la concentración de analito en la mezcla de reacción puede manifestarse por el número de partículas de reactivo magnéticamente sensible unido a cada partícula de reactivo de fase sólida móvil en lugar de por el alcance de la formación de complejos. En estos casos, pueden codificarse sitios de captura magnética múltiples, que difieren en intensidad de campo magnético o gradiente o ambos, en el fondo del canal capilar. Cada combinación de gradiente/intensidad de campo mostraría una preferencia para atraer complejos con una relación particular de reactivo magnéticamente sensible y reactivo de fase sólida móvil. Por ejemplo, a medida que la mezcla de reacción avanza corriente abajo a lo largo del canal, los complejos se encontrarían en primer lugar con el sitio de captura magnética que tiene la intensidad de campo más débil. Este sitio solamente capturaría los complejos que tuvieran una relación alta de reactivo magnéticamente sensible y reactivo de fase sólida móvil. Los sitios de captura magnética posteriores aumentarían progresivamente en intensidad de campo, siendo capaces por lo tanto de capturar complejos que tengan relaciones cada vez más bajas de reactivo magnéticamente sensible y reactivo de fase sólida móvil. En este caso, qué sitio o sitios de captura magnética de la serie presenten acumulación de complejos será un indicio de lo extensiva que ha sido la acumulación del reactivo magnéticamente sensible y, en consecuencia, cuánto analito estaba presente en la muestra de ensayo. Debe entenderse que la acumulación de los complejos puede detectarse o medirse visualmente o por emisión de fluorescencia, reflexividad, densitometría, actividad enzimática o cualquiera de los métodos de las otras realizaciones descritos en este documento o por otro medio. Esta realización proporciona un dispositivo analítico pequeño, portátil, potencialmente desechable que no requiere energía eléctrica.

15

20

25

30

35

En otra realización de la presente invención, que emplea un dispositivo como se ilustra en las Figuras 14A y 14B, el suelo del canal capilar se fabrica a partir de material de absorción óptica. El reactivo de fase sólida móvil presenta propiedades ópticas (reflectancia, color, fluorescencia, quimioluminiscencia o similares) que proporcionan contraste con el suelo del canal capilar de absorción óptica en proporción al alcance de la acumulación del reactivo de fase sólida móvil. De esta manera, las propiedades ópticas del reactivo magnéticamente sensible pueden enmascararse, lo que es una propiedad especialmente útil en formatos en los que el reactivo magnéticamente sensible se captura siempre en el sitio de captura magnética.

Realización 8

40

45

50

En otra realización las Figuras 15A y 15B ilustran un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para realizar ensayos analíticos. El dispositivo 700 comprende un elemento 702 que tiene una superficie plana 704 que contiene uno o más sitios magnéticos 706. Una mezcla de reacción 708 se pone en contacto con la superficie 704 o con una capa de material que cubre la superficie 704. La mezcla de reacción 708 contiene un reactivo magnéticamente sensible 710, el analito 712 y un reactivo de fase sólida móvil 714. Los complejos 716 del reactivo de fase sólida móvil 714, el analito 712 y el reactivo magnéticamente sensible 710 migran preferentemente a y se acumulan en los sitios magnéticos 706. En algunas aplicaciones, puede ser ventajoso seleccionar la intensidad o gradiente del campo magnético en el sitio o sitios de captura magnética, o el tamaño y composición del reactivo magnéticamente sensible, de modo que el reactivo magnéticamente sensible se acumule si no está unido o forma un complejo con el reactivo de fase sólida móvil. La presencia o alcance de esta acumulación del reactivo de fase sólida móvil puede medirse de una diversidad de maneras.

55

60

En una realización preferida, las partículas del reactivo de fase sólida móvil 714 o partículas del reactivo magnéticamente sensible 710 se fabrican de modo que cuando los complejos 716 del reactivo de fase sólida móvil 714, el analito 712 y el reactivo magnéticamente sensible 710 se acumulan en el sitio magnético 706, se forma un resultado visible. La forma, color, densidad, alcance, posición, etc. sirven como una medida de la presencia o cantidad de analito en la mezcla de ensayo. Los sitios magnéticos 706 pueden ser sencillos o múltiples, de diversas formas y de diversos gradientes o intensidades de campo, de modo que los complejos del reactivo de fase sólida móvil, el analito y el reactivo magnéticamente sensible que tienen diferentes relaciones de reactivo de fase sólida móvil y reactivo magnéticamente sensible se capturan en diferentes sitios 706 como un indicio de la concentración del analito en la muestra de ensayo. Debe entenderse que la acumulación de los complejos puede detectarse o medirse por emisión de fluorescencia, reflectividad, densitometría, actividad enzimática o cualquiera de los métodos de las otras realizaciones descritas en este documento o por otro medio.

65

En una realización particularmente preferida, el sitio magnético 706 puede ser una cinta de grabación magnética o una tira magnética similar a la hallada en una tarjeta de crédito convencional. Esta realización proporciona un dispositivo analítico pequeño, portátil, potencialmente desechable que no requiere energía eléctrica.

Realización 9

En otra realización, los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para determinar las propiedades de materiales magnéticamente sensibles. El tamaño, forma, contenido de magnetita, estado de agregación, y otros factores influirán en la velocidad a la que las partículas de un material magnéticamente sensible se muevan en un fluido en respuesta a un campo magnético aplicado. La aplicación de las técnicas de la presente invención a muestras de materiales magnéticamente sensibles puede actuar como medio de control de la calidad de estos materiales, así como determinar la cantidad de estos materiales en una muestra desconocida o una muestra de concentración desconocida.

Realización 10

En otra realización, las Figuras 16A y 16B ilustran un dispositivo de inmunoensayo autorrealizable para realizar ensayos analíticos. El dispositivo 800 comprende un recipiente de reacción 802 soportado sobre un imán 804. El recipiente de reacción 802 contiene una mezcla de reacción 808, que comprende partículas de un reactivo magnéticamente sensible 810, un analito 812, si lo hubiera, y partículas de un reactivo de fase sólida móvil 814. Si está presente analito, una parte del reactivo magnéticamente sensible 810 se une al reactivo de fase sólida móvil 814 (por medio del analito) para formar complejos 816. Debido a que la fuerza magnética que se ejerce sobre una partícula del reactivo de fase sólida móvil que tiene más de una partícula de reactivo magnéticamente sensible unido a él (por medio del analito) es mayor que la fuerza ejercida sobre una partícula de un reactivo magnéticamente sensible solo, los complejos 816 del reactivo de fase sólida móvil 814, el analito 812 y el reactivo magnéticamente sensible 810 se mueven más rápidamente en el campo magnético que las partículas de un reactivo magnéticamente sensible por sí solas y se eliminan de la suspensión.

En una realización preferida las partículas del reactivo de fase sólida móvil o partículas del reactivo magnéticamente sensible o ambas se fabrican de modo que una, o ambas, puedan detectarse cuando están en suspensión. La eliminación de los complejos de las suspensiones puede detectarse visualmente o medirse usando un dispositivo óptico tal como el mostrado en la Figura 16. Un haz de luz de una fuente de luz 820 pasa a través del recipiente de reacción 802 y la mezcla de reacción 808 hasta alcanzar un detector óptico 822. Los resultados de las mediciones de densidad óptica pueden verse en una pantalla 824. La cantidad de reactivo de fase sólida móvil 814 o reactivo magnéticamente sensible 810 o ambos se determina observando cambios de la densidad óptica, emisión de fluorescencia, dispersión de la luz o cualquiera de los métodos de las otras realizaciones descritas en este documento, o por otro medio.

Debe entenderse que puesto que la presente descripción implica la evaluación de la fuerza, movimiento o acumulación manifestada por complejos del reactivo de fase sólida móvil y el reactivo magnéticamente sensible, los diversos métodos y reactivos de detección descritos en este documento son fácilmente adaptables a un funcionamiento o sistema automático. Sin embargo, dicho funcionamiento o sistema automático no pretende excluir la posibilidad de que algunas operaciones de ensayo en un sistema automático puedan llevarse a cabo manualmente.

Las realizaciones anteriores se ilustrarán ahora por los siguientes ejemplos no limitantes. El ejemplo 5 y las Figuras 25A, 25B y 25C ilustran las construcciones de un dispositivo que tiene canales capilares que pueden usarse de acuerdo con la invención.

EjemplosEjemplo 1Microbalanza Electrónica Modificada para Medición de Fuerza Magnética

Se diseñó un dispositivo y se construyó para medir y registrar automáticamente fuerzas ejercidas sobre material magnéticamente sensible mediante campos magnéticos aplicados. Se obtuvo una microbalanza electrónica 900 modelo UMT-2 de Mettler - Toledo Inc., Hightstown, N.J. En referencia ahora a la Figura 17, esta balanza 900 se modificó en la fábrica para aceptar pesos por encima de su intervalo normal. Se produjo una palanca de aluminio 902 para reemplazar el platillo de balanza normal. Se elaboró a máquina un rebaje circular 904 en la parte superior de la palanca 902 para recibir un imán cilíndrico de neodimio-hierro-boro 906 de 0,64 cm (0,25 pulgadas) de diámetro, obtenido de Cookston Magnets. Un extremo del imán cilíndrico de 0,64 cm (0,25 pulgadas) de longitud se redondeó para darle una ligera forma de bóveda para modificar la forma del campo magnético producido, de modo que la región de máxima fuerza sobre las partículas magnéticamente sensibles estuviera en el centro de la cara del imán. Se fabricó una tapa de aluminio 908 para la cámara de pesado de la microbalanza para reemplazar la tapa de vidrio que normalmente se proporciona. La tapa 908 consistió en un anillo exterior de aluminio 910 que tenía un agujero central grande, que soportaba un disco de aluminio 912, que tenía un diámetro menor que el diámetro de la cámara de pesado. El disco 912 se atravesó por dos agujeros sin rosca 914, 916 cerca del extremo y un agujero con rosca más grande 920 en el centro. El disco 912 se situó en el anillo de soporte 910 de modo que se pasaron tornillos prisioneros 924, 926 a través de cada agujero sin rosca 914, 916 y se atornillaron en agujeros con rosca

928, 929 en el anillo de soporte 910. El agujero ensartado central 920 en el disco 912 aceptó un inserto de aluminio cilíndrico con rosca 930 en el que se había perforado un agujero de fondo plano 932 desde la parte superior hasta 0,025 mm (0,001 pulgadas) del fondo, dejando una "ventana" de aluminio fina para formar el suelo 934 del agujero 932. El agujero central 932 del inserto 930 aceptó adaptadores de aluminio cilíndricos 936 con agujeros perforados a través de sus centros 937 para alojar recipientes de ensayo 938 de diversas formas y tamaños. El dispositivo de medición de fuerza se ensambló retirando el platillo de la balanza y reemplazándolo con la palanca de aluminio 902. El imán moldeado 906 se colocó en el rebaje 904 sobre la palanca 902 con el extremo redondeado hacia arriba. La parte superior de vidrio de la cámara de pesado de la microbalanza se reemplazó con el anillo exterior de aluminio 910, con el disco de aluminio 912 centrado en él. El inserto de aluminio con rosca 930 se atornilló en el agujero con rosca central 920 en el disco 912 y se insertó en él un adaptador de recipiente de ensayo 936. La balanza en sí misma y todas las partes añadidas se conectaron a tierra para evitar cualquier acumulación de carga estática.

Interfaz Microbalanza-Ordenador para Recogida de Datos Automática

El dispositivo de microbalanza modificado se comunicó mediante una interfaz con el programa de adquisición de datos LabVIEW® de National Instruments, Inc., Austin TX, residente en un ordenador Macintosh si por medio de un cable proporcionado por Mettler-Toledo, Inc. El programa se preparó para adquirir, registrar y presentar continuamente las lecturas de peso enviadas desde la microbalanza a una velocidad de una lectura cada 0,3 segundos.

Alineamiento y Ensayos

El aparato de microbalanza 900 se centró en cero y se inició la recogida de datos en el ordenador unido. Se transfirió una alícuota de 20 µl de una suspensión diluida de macropartículas superparamagnéticas obtenidas de Nippon Paint por pipeta a un microtubo de polipropileno, que después se colocó en el soporte del recipiente de ensayo de aluminio sobre la microbalanza, de modo que el fondo del tubo descansara sobre el fondo plano del inserto de aluminio con rosca 930. El inserto 930 se rotó después en la dirección de las agujas del reloj para hacer que el fondo del inserto 930 se acercara a la parte superior del imán 906. El peso aparente del imán 906 indicado por la balanza 900 se controló y se descubrió que se reducía a medida que el inserto 930 se acercaba al imán 906. Este cambio aparente de peso resultó de la fuerza ejercida por el imán 906 sobre las macropartículas superparamagnéticas en el microtubo, que contrarrestaban la fuerza gravitacional del imán 906. A medida que el inserto 930 continuaba rotando, se consiguió una posición en la que el fondo del inserto 930 entraba en contacto con la parte superior del imán 906. En este punto, el peso aparente del imán 906 aumentó drásticamente a medida que el inserto 930 ejercía una fuerza hacia abajo en él. La dirección de rotación del inserto 930 después se invirtió hasta que el peso aparente del imán 906 volvió al observado justo antes de que se hiciera contacto. El inserto 930 se rotó después 10° adicionales en dirección contraria a las agujas del reloj, dejando un hueco muy pequeño entre el fondo del inserto 930 y la parte superior del imán 906. Los tornillos prisioneros 924, 926 que sostenían el disco de aluminio 912 que contenía el inserto con rosca 930 contra el anillo de aluminio 910 se soltaron y el disco 912 se ajustó horizontalmente hasta que se indicó el peso aparente mínimo por la balanza 900; después los tornillos prisioneros 924, 926 se volvieron a apretar. El ajuste vertical del inserto con rosca 930 descrito anteriormente se repitió después y su posición se fijó por aplicación de una gota de un adhesivo de caucho a las roscas. El resultado de estos ajustes fue situar las macropartículas superparamagnéticas en la región de la mayor fuerza de atracción vertical desde el imán 906 que se pesa por la balanza 900.

La sensibilidad y reproducibilidad del dispositivo de balanza se ensayó usando una suspensión de 0,01 % (peso/volumen) de macropartículas superparamagnéticas que tenían un diámetro de 0,8 µm y que contenían magnetita 30 % en peso de partículas. Se transfirieron alícuotas de 20 µl cada una a tubos de microcentrifuga de polipropileno de 0,5 cm x 3 cm (Robbins Scientific). El dispositivo de balanza se centró en cero y comenzó la recogida de datos. Después de 10 segundos, el primer tubo se insertó en el dispositivo. Inmediatamente después de la inserción del tubo el peso aparente indicado del imán comenzó a descender rápidamente (véase Figura 18). Aproximadamente 10 segundos después de la inserción, la tasa de cambio de peso comenzó a reducirse hasta que el cambio se había detenido casi completamente después de aproximadamente 30 segundos, siendo el cambio final de peso de 2,4 mg. Tras la retirada del tubo de microcentrifuga, el peso aparente volvió rápidamente a cero. La repetición del peso con dos muestras adicionales proporcionó resultados sustancialmente idénticos (véase Figura 18).

Ejemplo 2

Preparación de Reactivo Magnéticamente Sensible de Ferrofluido Dispersable Acuoso y un Miembro de Unión Específico

Propiedades del Ferrofluido

Se obtuvo un ferrofluido capaz de formar dispersiones acuosas estables de Xerox Specialty Materials, Pitts-ford, NY. Este material se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.322.756 y 5.358.659. El ferrofluido se proporcionó como una suspensión acuosa al 60 % (peso/volumen). Las partículas del ferrofluido fueron superparamagnéticas y

comprendían una matriz polimérica, en la que se incluyeron nanocristales monodominio de Fe_2O_3 , que componían el 27 % del peso de la partícula. El tamaño de partícula varió de partícula a partícula. El diámetro medio de las partículas fue de aproximadamente 20 nm. Se indicó que la imantación de las partículas fue de 12,2 UEM/gm a 6 kilogauss.

5 El ferrofluido concentrado se diluyó 100 veces con agua, produciendo una suspensión marrón transparente. Se transfirió una alícuota de 5 μl del ferrofluido diluido a un microtubo de polipropileno y se colocó en el dispositivo de balanza descrito en el Ejemplo 1. Se observó un cambio de peso de 5,2 mg rápido, equivalente a 104 mg/ μl para el ferrofluido no diluido. El ferrofluido diluido se diluyó 16 veces adicionales (un total de 1600 veces) en agua, y se analizó una alícuota de 100 μl en el dispositivo de balanza como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. Se observó un cambio inmediato de peso de 0,5 mg, seguido de un cambio de peso muy lento hasta un cambio de peso total de 8 mg durante un periodo de 20 horas (véase Figura 19). Este resultado indicó la fuerza muy débil ejercida sobre cada partícula individual de ferrofluido por el campo aplicado. Aunque la fuerza de atracción de agregados de todas las partículas en el campo se detectó inmediatamente por la balanza, la migración de las partículas a la región de mayor campo y gradiente fue muy lenta como indicó el cambio posterior muy lento del peso.

10 El ferrofluido concentrado se diluyó 100 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino 0,1 % (BSA) y se aplicó a una columna de cromatografía de 1 cm x 40 cm empaquetada con medio de filtración de gel "SEPHAROSE S-300®" (Pharmacia Biotech, límite de exclusión 1×10^6 dalton) previamente equilibrado con BSA 0,1 % en PBS, y se eluyó con el mismo tampón. El ferrofluido eluyó como una banda marrón en el volumen excluido de la columna. La separación en una columna de medio de filtración en gel "SEPHACRYL S-500®" (límite de exclusión 2×10^7 dalton) dio como resultado que el ferrofluido se incluyera parcialmente (véase Figura 20A), mientras que la separación en una columna de medio de filtración en gel "SEPHACRYL S-1000®" (límite de exclusión $>10^8$ dalton) dio como resultado que la mayoría de las partículas se incluyeran, eluyendo como una banda ancha después de las macropartículas de 30 μm de referencia (véase Figura 20B). En la Figura 20B, la curva A representa reactivo magnéticamente sensible y la curva B representa reactivo de fase sólida móvil. El ferrofluido pudo subfraccionarse basándose en el tamaño de partícula de esta manera.

30 Recubrimiento del Ferrofluido con BSA Biotinilada

Para evaluar la utilidad del ferrofluido en los ensayos de unión, el ferrofluido se recubrió con BSA biotinilada (albúmina, marcada con biotinamidocaproilo bovino, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se mezcló una alícuota de 100 μl de una solución de 10 mg/ml de la BSA biotinilada en PBS con 850 μl de tampón de bicarbonato 1 % (pH 9,0) y 50 μl del ferrofluido concentrado. La mezcla se incubó a una temperatura de 37 °C durante una hora, después se añadieron 200 μl de BSA 1 % en PBS, y la incubación continuó durante 45 minutos adicionales. La mezcla se aplicó después a una columna de cromatografía de 1 cm x 40 cm empaquetada con medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300®" previamente equilibrado con BSA 0,1 % en PBS y se eluyó con el mismo tampón. Las fracciones que contenían el ferrofluido, como se indica por su color marrón, eluyeron en el volumen hueco de columna. Una alícuota de 5 μl de las fracciones agrupadas dio una lectura de 5 mg en el dispositivo de balanza. El material agrupado se diluyó 50 veces con PBS para su uso en ensayos de unión (véase Ejemplos 3, 4, 5, 6, 7 y 8 posteriormente).

40 Recubrimiento del Ferrofluido con Anti-hCG

45 Se obtuvo un anticuerpo con actividad de unión contra la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana de Abbott Laboratories y se marcó con tritio por oxidación de peryodato, seguido de reducción con $\text{NaCNH}_3(^3\text{H})$. Después de la aplicación a una columna de 1 cm x 40 cm de medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300®" (Pharmacia Biotech), el marcador eluyó en tres picos en el volumen excluido, el volumen parcialmente incluido y el volumen totalmente incluido, que representaban agregados de anticuerpo marcado, anticuerpo marcado libre y marcador libre, respectivamente. Se mezcló una alícuota de 10 μl del anticuerpo marcado no separado (340.000 dpm) con una alícuota de 20 μl de ferrofluido en 220 μl de tampón de carbonato sódico 1 %, pH 9,0. Después de incubación durante dos horas a una temperatura de 37 °C, se añadieron 800 μl de BSA 0,1 % en PBS y la incubación continuó durante 45 minutos a una temperatura de 37 °C. La mezcla se aplicó después a la columna de medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300" como se ha descrito anteriormente. El marcador eluyó como dos picos, uno que eluía con el ferrofluido en el volumen excluido y uno en el volumen totalmente incluido. El procedimiento de recubrimiento se repitió con anticuerpo anti-hCG no marcado. El material que eluía en el volumen excluido se recogió y se diluyó cincuenta veces con PBS para su uso en inmunoensayos.

60 Reparación de Partículas de Látex de Poli(pirrol) Recubiertas con Anticuerpo

Se preparó una muestra de partículas de látex de polipirrol recubiertas con un anticuerpo con afinidad de unión por biotina como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.252.459.

Estas partículas fueron de 0,3 a 0,7 μm de diámetro y las suspensiones de ellas son de un color negro intenso.

Ejemplo 3**Efecto de la Unión de Ferrofluido a Partículas de Látex en el Comportamiento en un Campo Magnético.**

5 Se transfirieron cinco alícuotas (un ml cada una) del ferrofluido recubierto con BSA biotinilada diluido cincuenta veces de la columna que contenía medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300[®]" (véase Ejemplo 2) a frascos de vidrio que tenían una capacidad de 4 ml. Se transfirieron alícuotas de 0, 2, 5, 10 y 20 μ l de una suspensión 0,1 % de látex de polipirrol recubierto con antibiotina a cada frasco que contenía el ferrofluido recubierto con BSA biotinilada y los contenidos de cada frasco se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos. Se transfirió después
10 una alícuota (100 μ l) de cada frasco a un microtubo de polipropileno, el microtubo se colocó en el aparato de microbalanza descrito en el Ejemplo 1 y el peso aparente del imán se registró en función del tiempo.

Tanto la velocidad como el grado de la respuesta del aparato reflejó la cantidad de látex de polipirrol recubierto con antibiotina presente (véase Figura 21). La balanza se ajustó a cero y comenzó la recogida de datos a los 0 segundos (véase Figura 21). El microtubo de polipropileno que contenía la alícuota de la mezcla incubada sin látex de polipirrol recubierto con antibiotina añadido (la muestra de cero microlitros) se insertó en el aparato después de 45 segundos. El peso indicado del imán se redujo rápidamente de 0 mg a -0,06 mg, después se redujo adicionalmente a una velocidad constante hasta -0,10 mg durante un periodo de tres minutos, lo que reflejaba la velocidad de migración del ferrofluido al fondo del microtubo (véase segmento de curva A, Figura 21). El microtubo se retiró después del
20 aparato y el peso indicado del imán volvió rápidamente a cero.

El microtubo de polipropileno que contenía la alícuota de la mezcla incubada que tenía dos microlitros de látex de polipirrol recubierto con antibiotina añadido se insertó en el aparato después de 30 segundos adicionales. El peso indicado del imán descendió rápidamente de 0 a -0,06 mg, después se redujo adicionalmente a una velocidad constante hasta -0,12 mg durante un periodo de tres minutos (véase segmento de curva B, Figura 21), tras lo cual se retiró. El análisis de microtubos que contenían alícuotas de las mezclas incubadas que tenían 5, 10 y 20 μ l de látex de polipirrol recubierto con antibiotina añadido (véase segmentos de curva C, D y E, Figura 21) mostró velocidades crecientemente mayores de reducción del peso del imán indicado, lo que refleja la mayor velocidad de migración del ferrofluido en complejos de látex de polipirrol-ferrofluido que en el ferrofluido solamente (véase Tabla 1).
25

30

Tabla 1

Volumen de polipirrol (μ l)	Peso después de tres minutos (mg)	Velocidad de cambio (μ g/segundo)
0	-0,10	-0,25
2	-0,12	-0,38
5	-0,16	-0,63
10	-0,22	-1,13
20	-0,38	-2,25

La velocidad lineal de los cambios de peso durante los periodos de tres minutos de observación indicó que la captura de los complejos no se completó en este tiempo. Durante periodos más largos de observación, el cambio de peso más rápido de las muestras que contenían mayores concentraciones de látex de polipirrol se ralentizó a la de la muestra cero, lo que indicaba que todos los complejos habían migrado al fondo del microtubo. La tasa lenta de cambio de peso vista con la muestra cero se debió a la agregación de las partículas de ferrofluido durante el procedimiento de recubrimiento con albúmina de suero bovino biotinilada y puede reducirse por sonicación previa.
35

El efecto también pudo observarse visualmente comprobando la velocidad y grado de eliminación del látex de polipirrol de la muestra de ensayo (véase Figuras 22A, 22B, 22C y 22D). En todas las muestras que contenían látex de polipirrol, todo el látex se eliminó de la muestra de ensayo, lo que indicaba la presencia de un exceso de ferrofluido en todas las muestras. En la serie de Figuras 22A, 22B, 22C y 2D, la Figura 22A precede a la Figura 22B, la Figura 22B precede a la Figura 22C y la Figura 22C precede a la Figura 22D.
40

Para determinar la concentración óptima de ferrofluido requerido para conferir sensibilidad magnética al látex de polipirrol, el ferrofluido recubierto con BSA biotinilada de la columna que contenía medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300" se diluyó 50 veces, 100 veces, 200 veces, 400 veces y 800 veces con PBS. Todas las soluciones diluidas fueron transparentes, siendo la dilución de 50 veces de color paja, siendo la dilución de 100 veces de color amarillo claro, siendo la dilución de 200 veces de color amarillo muy claro, y siendo las diluciones de 400 veces y 800 veces incoloras. Para cada solución diluida, se transfirió una alícuota (1 ml) a un frasco de 4 ml, y se añadieron después 20 μ l de la suspensión de polipirrol recubierto con antibiotina a cada frasco. Después de incubación durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C, se transfirió una alícuota de 100 μ l de cada mezcla de ensayo a un microtubo y el microtubo se insertó en el aparato de microbalanza descrito en el Ejemplo 1. En todas las muestras de ensayo que contenían ferrofluido, todo el látex de polipirrol migró con el tiempo al fondo del microtubo, como se determinó visualmente. La velocidad y alcance del cambio de peso aparente del imán como se
45
50
55

indicó por el aparato varió con la concentración del ferrofluido (véase Figura 23). Estos resultados indican que aunque las suspensiones de ferrofluido más altamente diluidas eran capaces de unir números suficientes de partículas de ferrofluido a las partículas de látex de polipirrol para permitir que los complejos se capturaran magnéticamente, el uso de suspensiones de ferrofluido más concentradas dio como resultado una mayor carga de ferrofluido en el látex de polipirrol.

Ejemplo 4

Ensayo de Inhibición para BSA Biotinilada Libre

Se prepararon soluciones diluidas de BSA biotinilada libre con un diluyente de ensayo obtenido de Abbott Laboratories para proporcionar concentraciones de 0 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml y 40 µg/ml. Para cada solución diluida, se colocó una alícuota (20 µl) en un microtubo y se mezcló con 20 µl del látex de polipirrol recubierto con antibiotina. Después de que cada solución se incubara durante una hora a temperatura de 37 °C, se añadieron 40 µl del ferrofluido recubierto con BSA biotinilada a cada solución, la incubación continuó durante 30 minutos adicionales, después cada tubo se colocó en el aparato de microbalanza descrito en el Ejemplo 1 para análisis. Se comprobó el cambio de peso aparente observado del imán con los tubos colocados en relación con el peso aparente del imán cuando se colocaba un microtubo que contenía 40 µl de diluyente en lugar del ferrofluido. Como se muestra en la Figura 24, concentraciones crecientes de albúmina de suero bovino biotinilada libre inhiben la captura del ferrofluido por el látex de polipirrol, con el resultado de que se forman menos complejos y se acumula menos ferrofluido al fondo del microtubo donde puede ejercer su mayor fuerza de atracción sobre el imán. La muestra de 40 µg/ml (10 µg/ml en la mezcla incubada) mostró un cambio de peso de 0,2 mg, lo que indica que se obtuvo inhibición máxima en estas condiciones en concentraciones de albúmina de suero bovino biotinilada de 4-5 µg/ml en la mezcla incubada.

Estos resultados demuestran que el ferrofluido y el látex de polipirrol se unen entre sí debido a los miembros de unión específicos con los que están recubiertos. El alcance de la unión provoca un cambio predecible en el efecto de un campo magnético aplicado sobre la mezcla de ensayo.

Ejemplo 5 (invención)

Fabricación de Dispositivo que Tiene Canales Capilares para Inmunoensayos Autorrealizables

En referencia ahora a las Figuras 25A, 25B y 25C, se laminaron tres láminas 1000, 1002 y 1004 de película polimérica juntas para crear un laminado de canal capilar 1006. Uno o más agujeros de apertura 1008 en la lámina superior 1000 sirvieron como sitio o sitios de aplicación para la muestra de ensayo, permitiéndole acceder al extremo o los extremos proximales 1010 del canal o canales 1012 cortados en la lámina media 1002. El fondo 1014 de la lámina inferior 1004 se recubrió con adhesivo de modo que se adhiriera a una placa de base magnética 1016, que se describe posteriormente. La muestra de ensayo se extrajo a través del canal 1012 por acción capilar hasta que alcanzó el extremo o los extremos 1018 del canal o canales 1012, en cuyo punto el movimiento del líquido a través del canal se detendría. En ocasiones se situó un material de mecha poroso (no mostrado) en el extremo o extremos 1018 del canal o canales 1012 para continuar extrayendo la muestra de ensayo a través del canal hasta que se hubiera alcanzado el final del canal.

Aunque el dispositivo de este ejemplo se realiza adhiriendo tres capas de material polimérico entre sí, está dentro del alcance de la presente invención preparar dispositivos que tengan canales capilares con una capa sencilla, dos capas, o cuatro o más capas de material polimérico o equivalente, tal como, por ejemplo, vidrio u hojas metálicas. Se conocen bien por los expertos en la materia medios para adherir dos o más capas de material polimérico o equivalente, tales como, por ejemplo, adhesivos, sellado por calor, cierres y similares.

Fabricación de Una Placa de Base Magnética para Soportar los Canales Capilares.

Se elaboró a máquina una placa base de 20 x 20 cm a partir de placa de aluminio de 12,7 mm (1/2 pulgadas) 1016. Se elaboró a máquina un canal 1020 (12,7 mm de anchura y 6,4 mm de profundidad (1/2 pulgadas de anchura y 1/4 pulgadas de profundidad)) a lo largo de la cara de la placa, cuyo canal se llenó con un inserto "DELTRIN[®]" 1022. Se cortó un canal de 3,2 mm de profundidad por 1,6 mm de anchura (1/8 pulgadas de profundidad x 1/32 pulgadas de anchura) longitudinalmente a través del centro del inserto 1022 y se cargó con una tira de 3,2 mm x 1,6 mm x 15,2 mm (1/8 pulgadas x 1/32 pulgadas x 6 pulgadas) 1024 de material magnético flexible.

Ejemplo 6

Captura de Látex de Polipirrol en un Sitio Magnético en un Canal Capilar como Resultado de la Formación de Complejo con Ferrofluido

Para determinar la concentración óptima de ferrofluido requerida para conferir sensibilidad magnética a látex de

polipirrol para su uso en un formato de ensayo que emplea un dispositivo que tiene canales capilares, el ferrofluido recubierto con BSA biotinilado de la columna que contiene medio de filtración en gel "SEPHAROSE S-300®" se diluyó 50 veces, 100, veces, 200 veces, 400 veces y 800 veces con PBS. Para cada solución diluida, se transfirió una alícuota (1 ml) a un vial de 4 ml y se añadieron 20 µl de la suspensión de polipirrol recubierto con antibiotina a cada frasco. Después de incubación durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C, se aplicó después una alícuota de 7 µl de cada frasco al sitio de aplicación del laminado de canal capilar, que se había unido a la placa base magnética de modo que el eje largo de la tira magnética se orientó a 90° del eje largo de los canales, y se situó por debajo de los canales a 0,5 cm de distancia de la abertura del canal proximal (véase Figuras 25A y 25B). Todos los canales correspondientes a muestras de ensayo que contenían las soluciones diluidas de ferrofluido mostraron una banda negra de látex de polipirrol capturado en la posición de la tira magnética, aumentando la intensidad de la banda a medida que aumentaba la concentración del ferrofluido en la muestra de ensayo. Las muestras de ensayo que no contenían ferrofluido no mostraron banda del látex de polipirrol.

Ejemplo 7

Ensayo de Inhibición Cualitativa para BSA Biotinilada Libre Realizado Usando un Dispositivo que Tiene Canales Capilares

Se prepararon cuatro soluciones separadas que contenían 0 µg, 5 µg, 20 µg y 80 µg de la BSA biotinilada descrita en el Ejemplo 4 en 1 ml de PBS. Se añadió una alícuota (20 µl) del látex de polipirrol recubierto con antibiotina descrito en el Ejemplo 2 a cada mezcla, seguido de incubación a una temperatura de 37 °C durante una hora, tras lo cual se añadió una alícuota de 20 µl del ferrofluido recubierto con BSA biotinilado del Ejemplo 2. Después de la incubación a una temperatura de 37 °C durante 5 minutos o 25 minutos, se aplicaron alícuotas al dispositivo de canal capilar descrito en el Ejemplo 5. La presencia de BSA biotinilada libre a una concentración de 5 µg/ml o más inhibió la captura de látex de polipirrol en el sitio magnético de los canales.

Ejemplo 8

Ensayo de Inhibición Cuantitativa para Biotina Libre Realizada Usando un Dispositivo que Tiene Canales Capilares

Se prepararon soluciones diluidas de la BSA biotinilada descrita en el Ejemplo 4 en diluyente de ensayo a concentraciones de 0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, y 80 µg/ml. Se mezcló adicionalmente una alícuota de 20 µl de cada solución de BSA biotinilada diluida con 60 µl de diluyente y 10 µl de látex de polipirrol recubierto con antibiotina descrito en el Ejemplo 2. Después de haber permitido a la mezcla reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió una alícuota de 10 µl del ferrofluido recubierto con BSA biotinilada del Ejemplo 2 a la misma. Después de incubación adicional a una temperatura de 20 °C durante 15 minutos, se aplicaron alícuotas (7 µl) de la mezcla resultante al dispositivo de canal capilar descrito en el Ejemplo 5. La presencia de BSA biotinilada libre a una concentración de 5 µg/ml o más inhibió la captura de látex de polipirrol en el sitio magnético de los canales.

Pudieron obtenerse resultados cuantitativos para este tipo de ensayo midiendo el cambio de reflectancia del sitio de captura magnético debido a la presencia de látex de polipirrol capturado. El ensayo se repitió como anteriormente, excepto que se usaron concentraciones de BSA biotinilada de 0,125 µg/ml, 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml y 80 µg/ml. Después de aplicaciones de alícuotas (7 µl) de las mezclas de reacción a los canales capilares, los canales se exploraron usando un lector de reflectancia de exploración fabricado en Abbott Laboratories. La reflectancia en el sitio de captura magnético se comparó con la reflectancia en sitios en cada lado del sitio de captura magnético y la reflectancia neta se calculó como la diferencia entre la reflectancia en el sitio de captura magnética y la media de los dos sitios adyacentes. La diferencia entre la reflectancia en el sitio de captura magnética y los sitios no magnéticos adyacentes se redujo a medida que la concentración de BSA biotinilada libre aumentaba, debido a que la BSA biotinilada libre inhibía la unión entre látex de polipirrol y el ferrofluido (véase Figura 26). La respuesta de ensayo muestra el estrecho intervalo deseable para un formato de ensayo positivo/negativo.

Ejemplo 9

Un Inmunoensayo Puntual Autorrealizable para Gonadotropina Coriónica Humana

Recubrimiento de Ferrofluido con Anticuerpo

Se diluyó ferrofluido en ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) 20 mM, que se había ajustado a pH 7,0 con HCL, a una concentración de sólidos de 1 %. Todas las etapas adicionales con el ferrofluido hasta el ensayo final se realizaron en este tampón. Se retiraron material soluble y partículas sin hierro unido de la preparación de ferrofluido aplicando una capa de 3,3 ml de la suspensión 1 % a 10 ml de sacarosa 20 % en un tubo de centrifuga de 15 ml. La preparación se centrifugó durante dos horas en un rotor flotante a 170.000 x g a una temperatura de 4 °C. El sedimento resultante de la misma se lavó dos veces en 10 ml de tampón, tras lo cual, el sedimento se centrifugó a 170.000 x g durante una hora. El sedimento final se suspendió en tampón MOPS para proporcionar una

concentración de sólidos 1 % y después se almacenó a una temperatura de 4 °C.

Un anticuerpo monoclonal murino que se unía a la subunidad alfa de hCG β se ajustó a una concentración de 4 mg/ml; se añadieron 5 ml de esta solución a un volumen igual de la suspensión de partículas superparamagnéticas lavadas. Esta suspensión se agitó a temperatura ambiente en un agitador de plataforma a 160 RPM durante una hora. Las partículas recubiertas se lavaron dos veces por centrifugación a 170.000 x g durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C, se suspendieron para formar una suspensión que contenía sólidos 1 % y se sonicó en un baño de hielo/agua durante 15 segundos. Se añadió azida sódica para proporcionar una concentración final de 0,01 %; las partículas se almacenaron a una temperatura de 4 °C. Para su uso como un control en algunos experimentos, las partículas superparamagnéticas se recubrieron de forma similar con albúmina de suero bovino (BSA).

Recubrimiento de Partículas de Látex con Anticuerpo

Se obtuvieron partículas de látex azul, 3 μ m de diámetro, de Polysciences, Inc., Warrington, Pa. Las partículas se diluyeron a 0,1 % de sólidos en tampón MOPS 20 mM que contenía NaCl 0,1 M (MOPS-NaCl). Las partículas se lavaron una vez por centrifugación a 17.000 x g durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C y se suspendieron en tampón a una concentración de 0,4 % de sólidos. Se ajustó IgG de cabra purificada por afinidad reactiva con la subunidad beta de hCG a una concentración de 250 μ g/ml en tampón MOPS-NaCl. Se mezclaron volúmenes iguales de partículas de látex y solución de anticuerpo y se agitaron en un agitador de plataforma a 160 RPM durante una hora a temperatura ambiente. Las partículas de látex recubiertas se lavaron dos veces y se suspendieron en un tampón a una concentración de 0,4 % de sólidos en tampón MOPS-NaCl que contenía azida sódica. Las partículas de látex se recubrieron con BSA por el mismo procedimiento para su uso como un control. Todas las partículas recubiertas se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

Ensayo con Muestras de Ensayo Clínicas

Se realizó un ensayo con 10 muestras de ensayo de orina de mujeres embarazadas y 10 muestras de ensayo de mujeres que no estaban embarazadas. Las muestras de ensayo codificadas se procesaron en un experimento a ciegas. Los controles positivos que contenían hCG β a una concentración de 64 ng/ml y los controles negativos se ensayaron junto con las muestras de ensayo clínicas. De forma independiente, todas las muestras de ensayo se evaluaron en el ensayo Abbott Test-Pack Plus™ para confirmar la presencia o ausencia de hCG β a cantidades coherentes con el embarazo.

El ensayo se realizó mezclando: (a) 30 μ l de las partículas de látex azul de 3 μ m recubiertas con IgG que se habían diluido a 0,2 % de sólidos en tampón MOPS-NaCl que contenían 1,0 mg de albúmina de suero bovino por ml (MOPS-NaCl-BSA), (b) 10 μ l de partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal a 0,0066 % de sólidos en MOPS-NaCl-BSA y (c) 40 μ l de muestra de ensayo de orina no diluida. Se permitió que la mezcla reposara durante 15 minutos a temperatura ambiente, después de dicho periodo se aplicaron puntualmente 15 μ l sobre cinta de Teflon® superpuesta en la tira magnética de la placa base magnética descrita en el Ejemplo 5 y se representa en la Figura 25. Se colocó un cubreobjetos de vidrio sobre dos soportes de 0,5 mm de grosor en cada lado de la cinta de Teflon® para crear una cámara de reacción que tuviera una superficie de visualización ópticamente plana (véase Figura 15A y 15B). Se registraron resultados después de 5 minutos y 10 minutos. Cuando el ensayo se realizó con las 10 muestras de ensayo positivas y el control positivo, se observó un conjunto de partículas azules ajustadas a la forma del campo magnético. Por el contrario, las partículas azules permanecieron dispersadas de forma homogénea cuando se ensayaron las muestras de ensayo negativas y el control negativo. Los resultados obtenidos con el ensayo Test-Pack Plus™ estaban de acuerdo con los del presente ensayo.

EJEMPLO 10

Ensayo Autorrealizable para Fibrina Soluble Utilizando Mediciones de Densidad Óptica

Se desarrolló un ensayo autorrealizable para fibrina soluble en plasma humano. El ensayo se basó en la velocidad de cambio de densidad óptica de una suspensión de látex de polipirrol recubierto con un miembro de unión específico y ferrofluido recubierto con un miembro de unión específico bajo la influencia de un campo magnético aplicado. Se produjo látex de polipirrol (diámetro de 0,2 μ m, 2 % de sólidos) en Abbott Laboratories (véase Ejemplo 2). Se obtuvieron un primer anticuerpo que tenía afinidad de unión por un epítipo en fibrina soluble humana y un segundo anticuerpo que tenía afinidad de unión por un epítipo diferente en fibrina soluble humana de American Biogenetic Sciences (Boston, MA). Se mezcló una alícuota del primer anticuerpo (125 μ l, 5,58 mg/ml) con tampón de borato 0,1 M (187 μ l, pH 10,0), tensioactivo "BRIJ 35" 1 % (375 μ l), látex de polipirrol (1,87 ml) y agua (1,2 ml). Después de haberse incubado la mezcla con balanceo durante dos horas a temperatura ambiente, se añadieron 1,25 ml de albúmina de suero bovino 4 % en tampón Bis Tris 0,25 M (pH 7,0) y 555 μ l de ácido peryódico 0,3 M en trietanolamina 0,5 M, y la mezcla resultante se incubó durante dos horas adicionales a temperatura ambiente. La mezcla se circuló después a través de un aparato de diafiltración "MICROGON®" para intercambiar la parte líquida de la mezcla con tampón de MOPS-etanolamina 25 mM (pH 7,2) que contenía albúmina de suero bovino 0,5 % y tensioactivo "BRIJ 35®" 0,1 %. El látex de polipirrol recubierto con anticuerpo se almacenó en esta solución. Se usó

una solución diluyente que contenía albúmina de suero bovino 0,5 %, sacarosa 5 %, tensioactivo "TWEEN 20[®]" 0,1 % y conservante "PROCLIN[®]" 0,05 % en solución salina tamponada con fosfato para diluir el patrón de fibrina soluble y la solución de polipirrol de reserva. La suspensión de polipirrol de reserva se diluyó doce veces con diluyente para su uso en el ensayo.

5 Se diluyó una alícuota (250 μ l) del ferrofluido descrito en el Ejemplo 2 a una concentración de 3 % de sólidos en carbonato sódico 0,05 M (pH 9,1) y se mezcló con una solución del segundo anticuerpo (2 μ l, 14,7 μ g/ml). Después la mezcla se incubó a 37 °C durante una hora, se añadió albúmina de suero bovino 1 % (110 μ l), y la mezcla
10 40 cm empaquetada con medio de permeabilidad en gel "SEPHACRYL S-300[®]" y se equilibró con solución salina tamponada con fosfato que contenía albúmina de suero bovino 0,1 %. La columna se eluyó con el mismo tampón y el material excluido se recuperó en 3 ml.

15 La mezcla de reactivo de ensayo se preparó mezclando 1 ml de la suspensión de polipirrol recubierto con anticuerpo diluido con 100 μ l de la suspensión de ferrofluido recubierto con anticuerpo.

Se prepararon patrones de ensayo a partir de fibrina soluble humana (obtenida de American Biogenetic Sciences) diluida a diferentes concentraciones con la solución diluyente.

20 Se usó un espectrofotómetro Cary 3 para determinar la densidad óptica de la mezcla de ensayo. Se obtuvo una cubeta de fluorímetro de diámetro interior de 5 mm x 30 mm de Wilmad Glass Inc. Se enroscó un tapón de rosca de cabeza hexagonal en el agujero con rosca en el fondo del soporte de la cubeta del espectrofotómetro y se colocó un imán de neodimio-hierro-boro de 6,4 mm x 6,4 mm (0,25 pulgadas x 0,25 pulgadas) sobre él. La posición del
25 imán en el soporte de la cubeta se ajustó después girando el tapón de rosca hasta que el imán empezó a bloquear la parte del fondo del haz de luz a través del soporte de la cubeta (según se valoró por una reducción de la densidad óptica aparente indicada por el instrumento). La parte superior e inferior del haz de luz se bloqueó por tiras horizontales de cinta eléctrica hasta que quedó un hueco vertical de 3 mm, el fondo del cual se alineó con el suelo interior de la celda fluorométrica cuando se insertó en el soporte de cubeta hasta que se apoyó sobre la parte superior del imán. El soporte de cubeta de referencia se bloqueó de forma similar. El instrumento se centró en cero
30 antes de que comenzara el ensayo.

El ensayo se realizó mezclando en primer lugar 50 μ l de la mezcla de reactivo de ensayo con 50 μ l de la mezcla de ensayo y transfiriendo después la mezcla resultante a la cubeta. La cubeta se insertó después en el soporte de cubeta hasta que su fondo se apoyó sobre el imán, y la recogida continua de datos de densidad óptica por el
35 espectrofotómetro comenzó inmediatamente. La velocidad de eliminación del látex de polipirrol de la solución por captura magnética se reflejó en la velocidad de cambio de la densidad óptica de la suspensión. Una representación de la velocidad de cambio de densidad óptica en la mezcla de ensayo en función de la concentración de fibrina soluble en la muestra de ensayo muestra una relación lineal (véase Figura 27).

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para determinar la presencia o cantidad de analito en una muestra de ensayo, comprendiendo dicho dispositivo:
- 5 (a) al menos un canal capilar a través del que puede fluir una mezcla de reacción, comprendiendo dicho al menos un canal una pared que incluye al menos un sitio magnético seleccionado de una cinta de grabación magnética o una tira magnética para aplicar un campo magnético a los componentes en dicha mezcla de reacción; y
- 10 (b) un medio de medición para evaluar el efecto del campo magnético generado por dicho al menos un sitio magnético en los componentes de la mezcla de reacción como una medida de la presencia o cantidad de analito en la muestra de ensayo;
- en el que el campo magnético en dicho al menos un sitio magnético tiene una intensidad y gradiente definidos para
- 15 ocasionar preferentemente la acumulación de reactivo magnéticamente sensible o complejos que tienen una característica particular en el fondo del canal capilar, o en el que dicho al menos un sitio magnético consiste en múltiples sitios magnéticos, que difieren en gradiente o fuerza de campo magnético o ambos, en el fondo del canal capilar.
- 20 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho medio de medición es un dispositivo visual para medir tanto el alcance de la formación de dichos complejos por unión específica de reactivo magnéticamente sensible a reactivo de fase sólida móvil como separación de reactivo magnéticamente sensible no unido.
- 25 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho canal se forma adhiriendo al menos dos capas de película entre sí.
4. El dispositivo de la reivindicación 3, en el que están presentes uno o más agujeros de apertura en la capa superior para actuar como sitio o sitios de aplicación para una muestra de ensayo.
- 30 5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que dicho canal tiene un suelo que se fabrica a partir de material de absorción óptica.
6. Uso de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para determinar la presencia o cantidad de un analito en una muestra de ensayo.

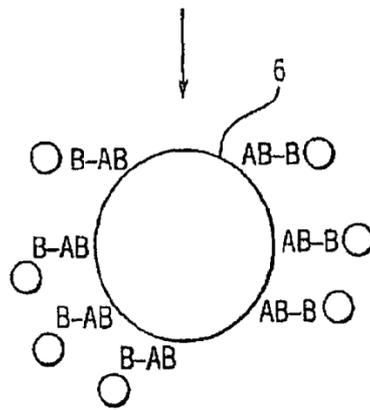
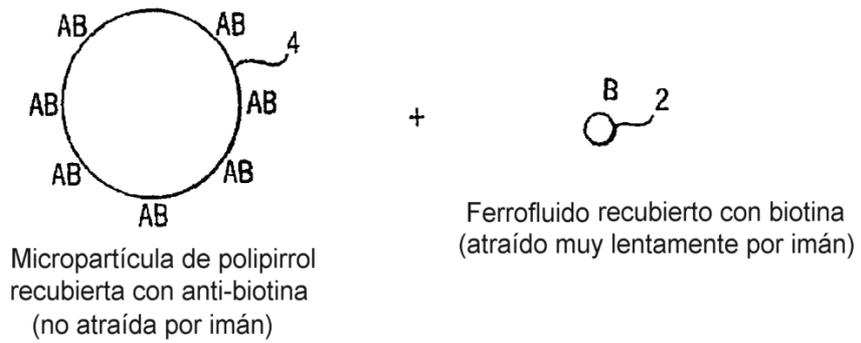
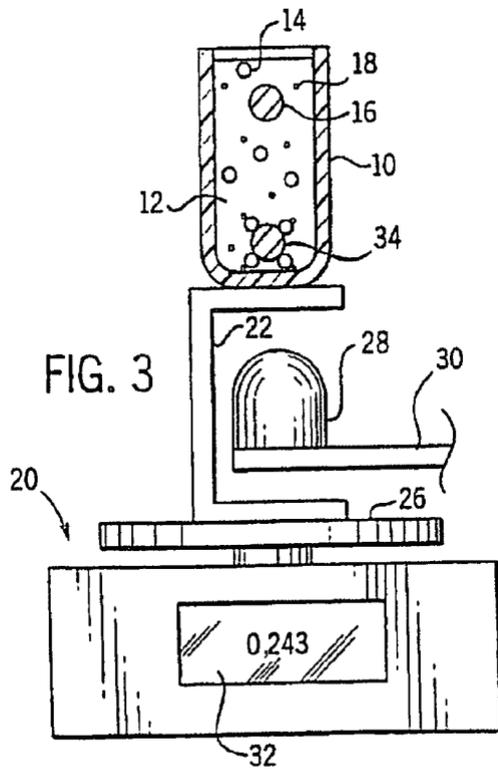
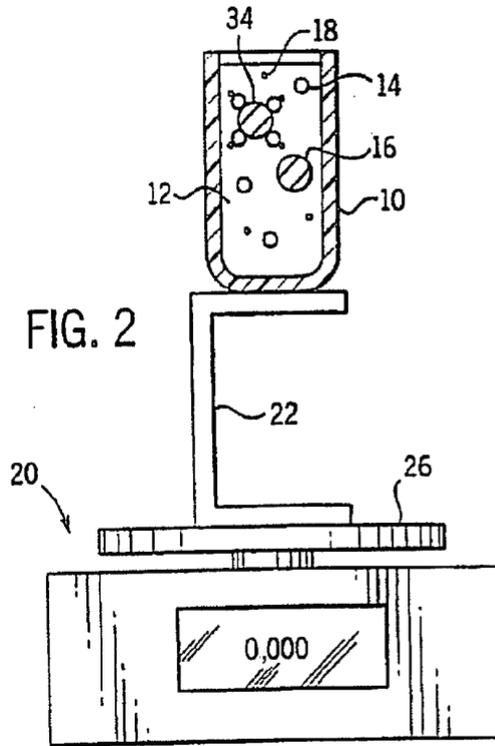
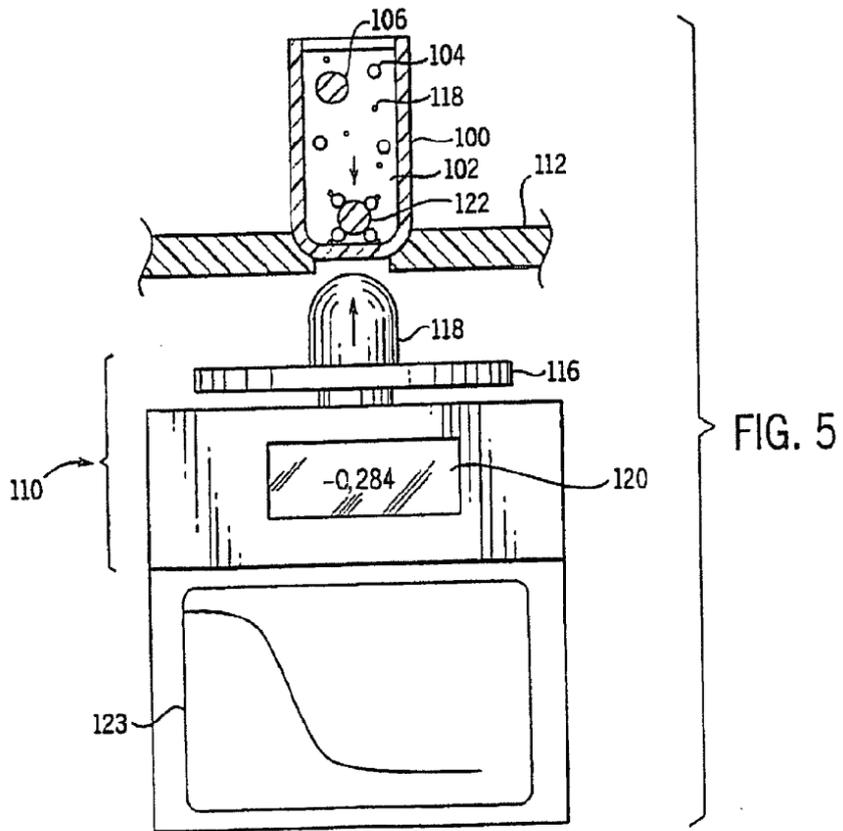
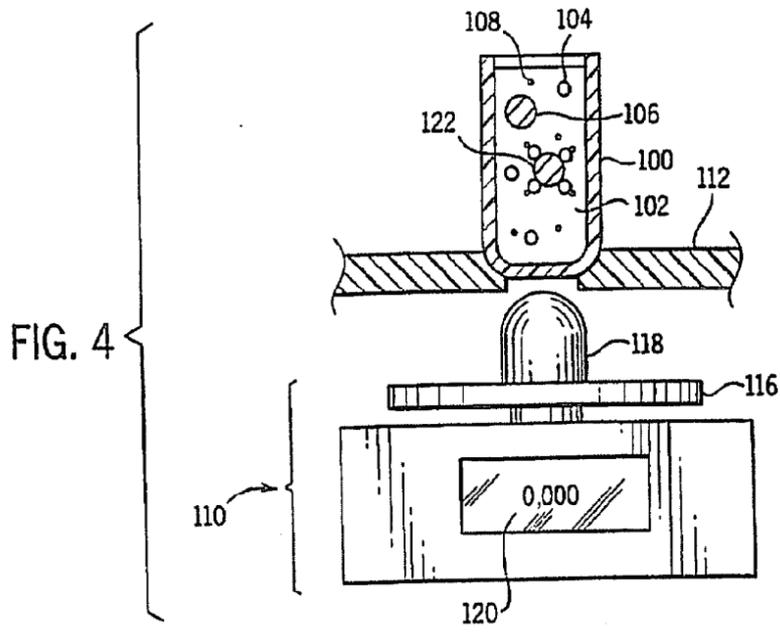
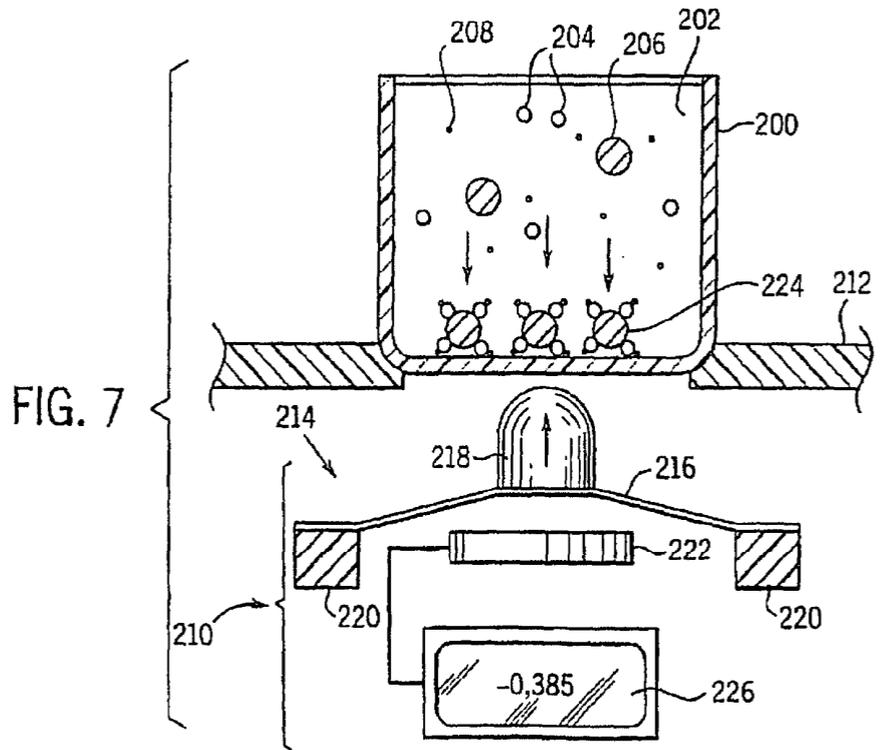
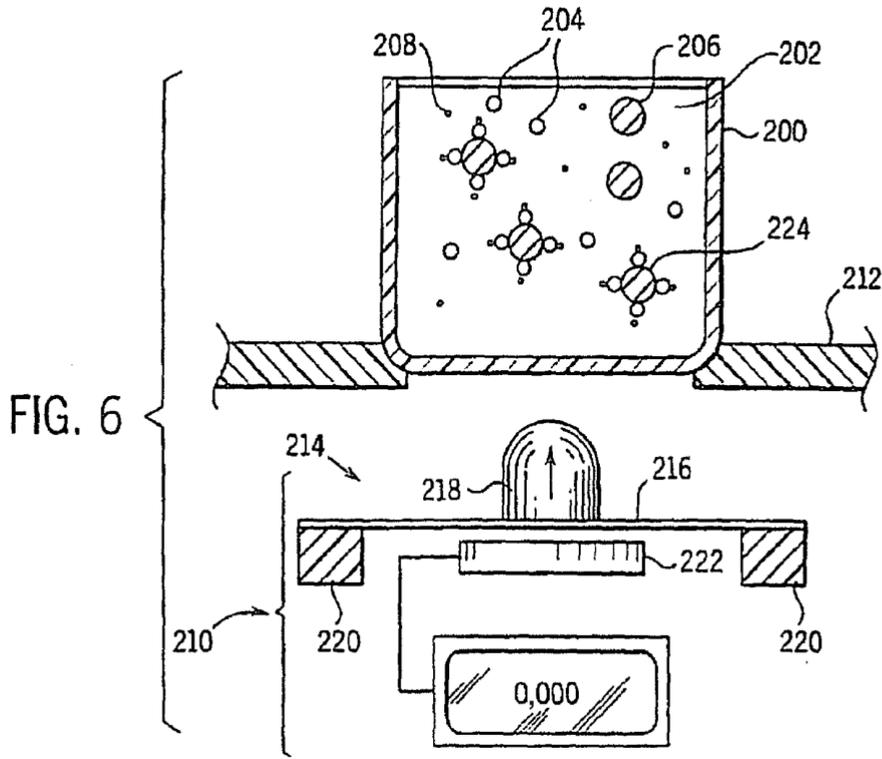


FIG. 1







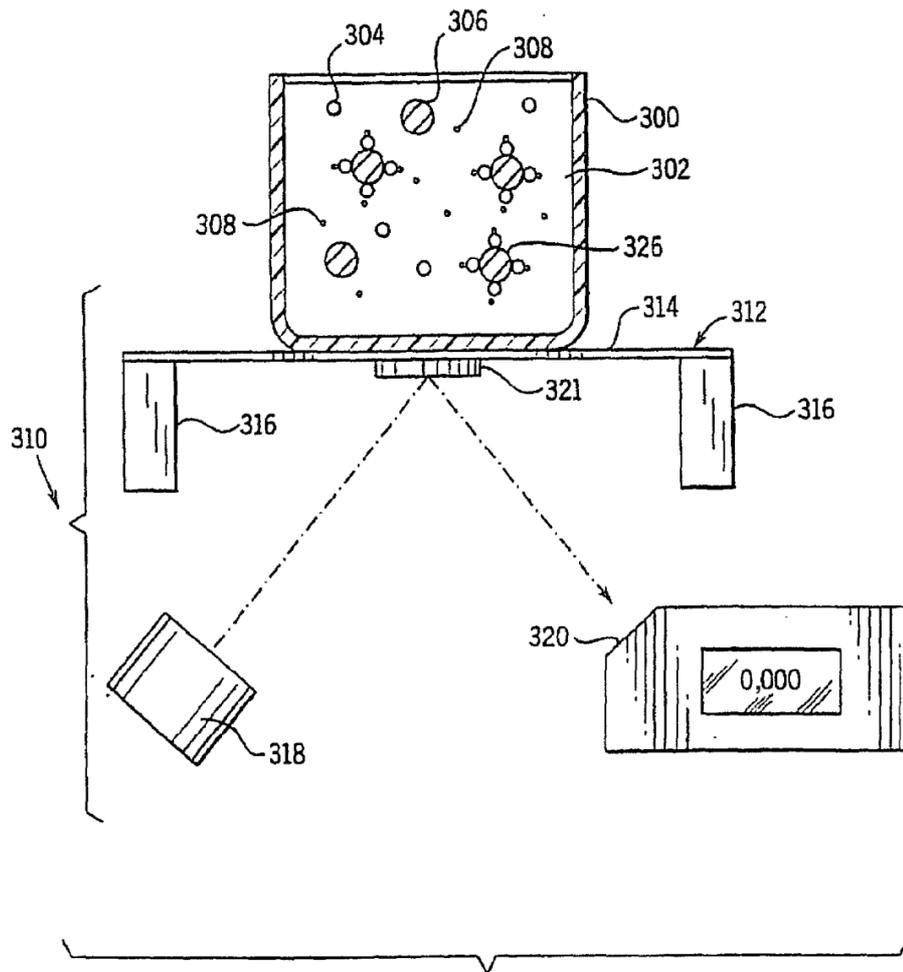


FIG. 8

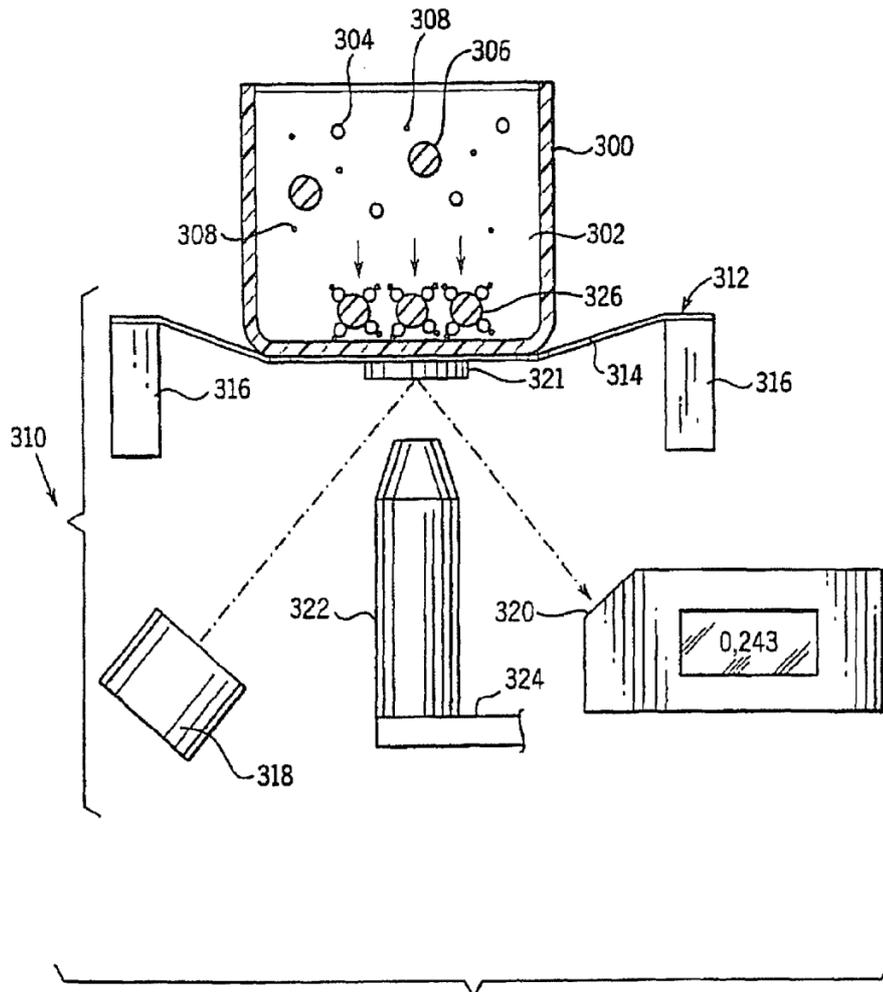
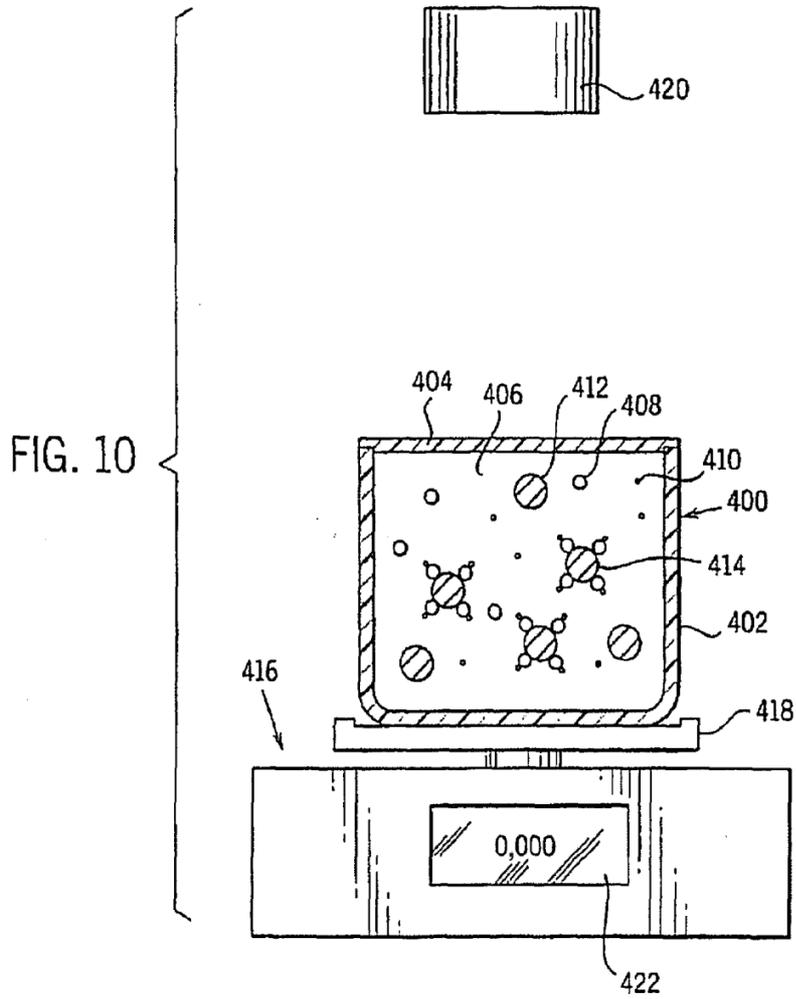


FIG. 9



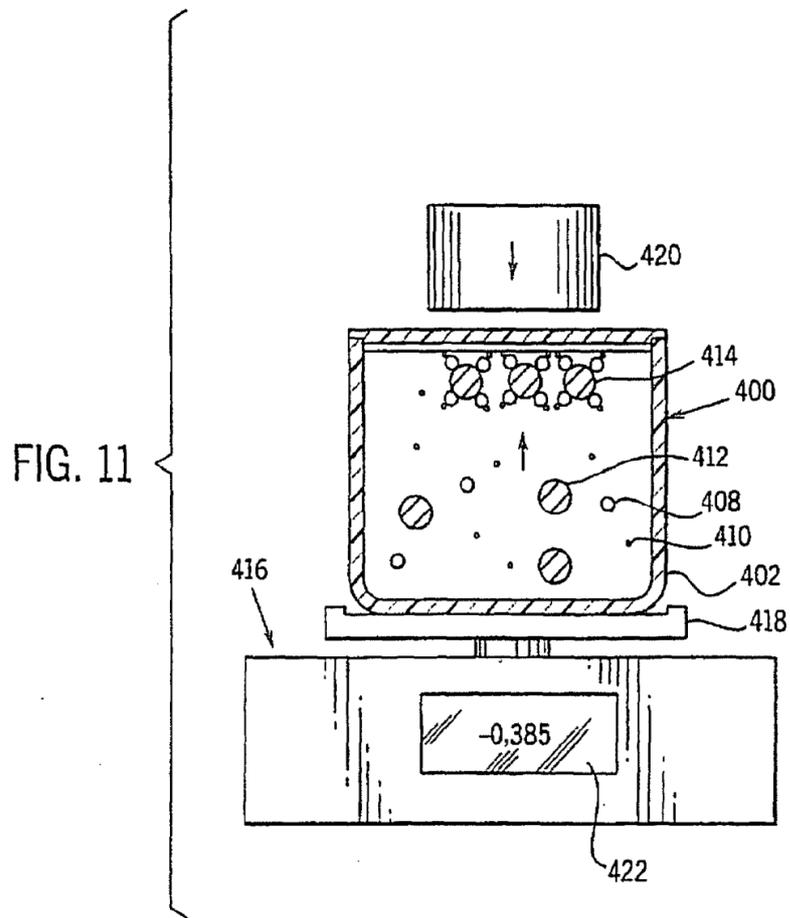
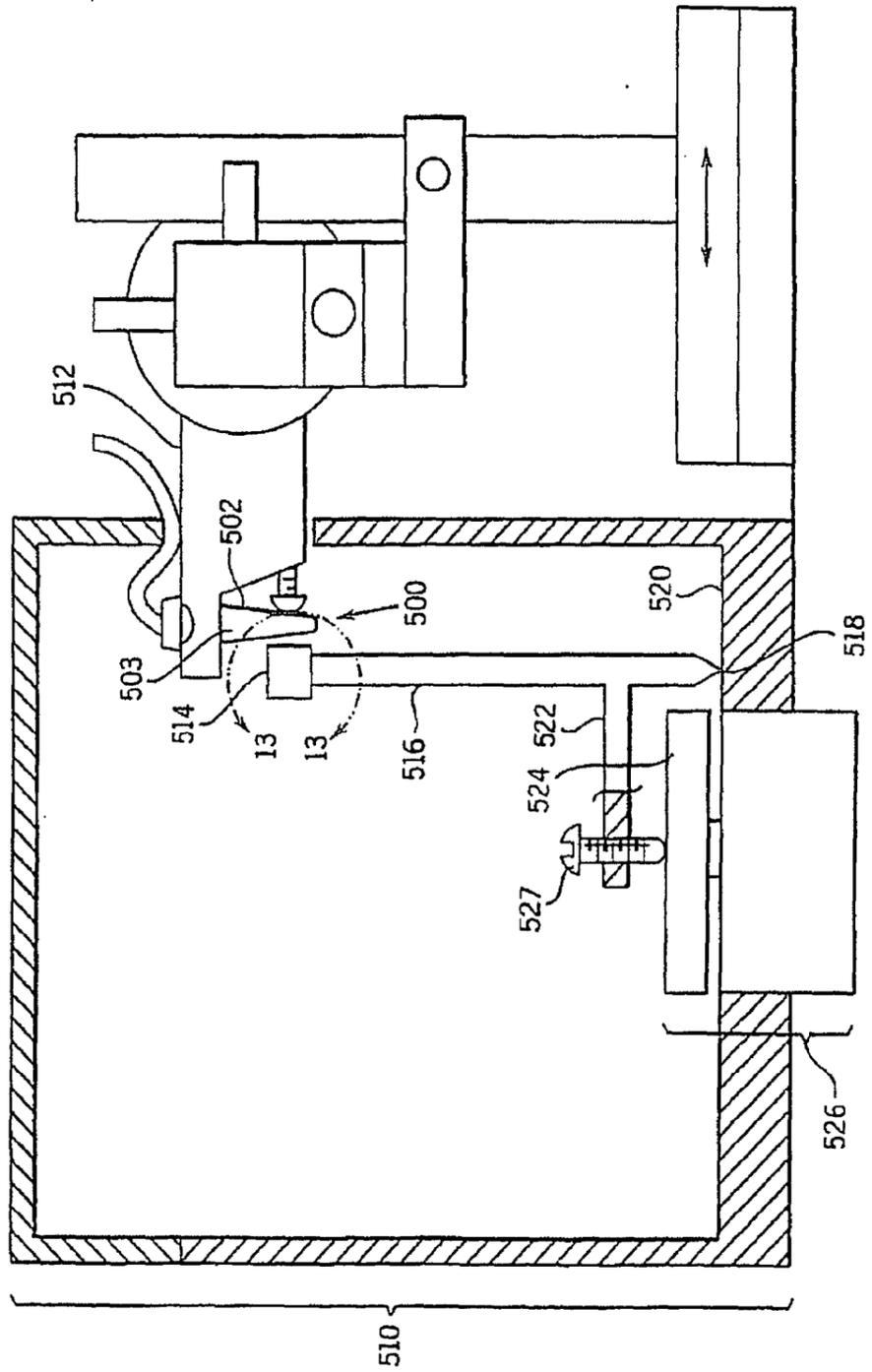


FIG. 12



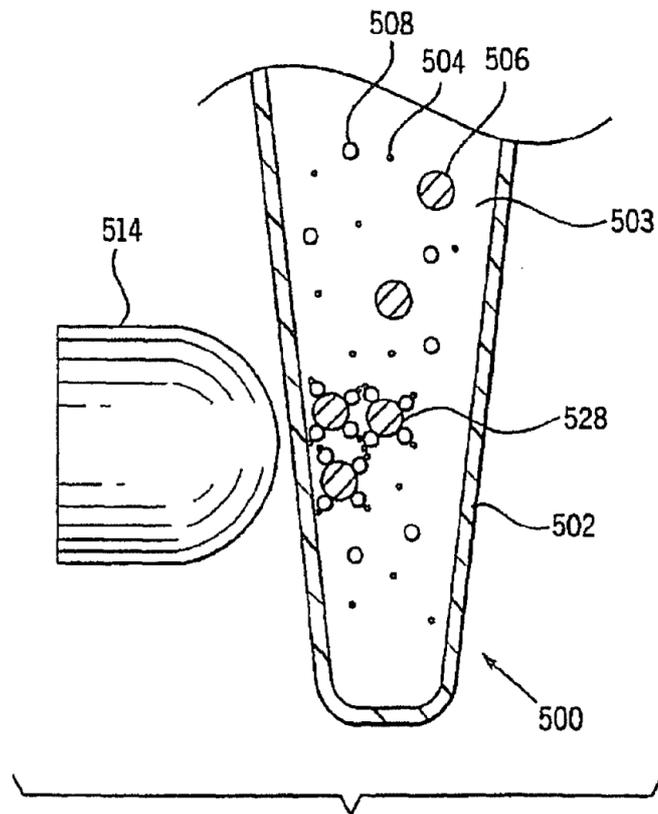
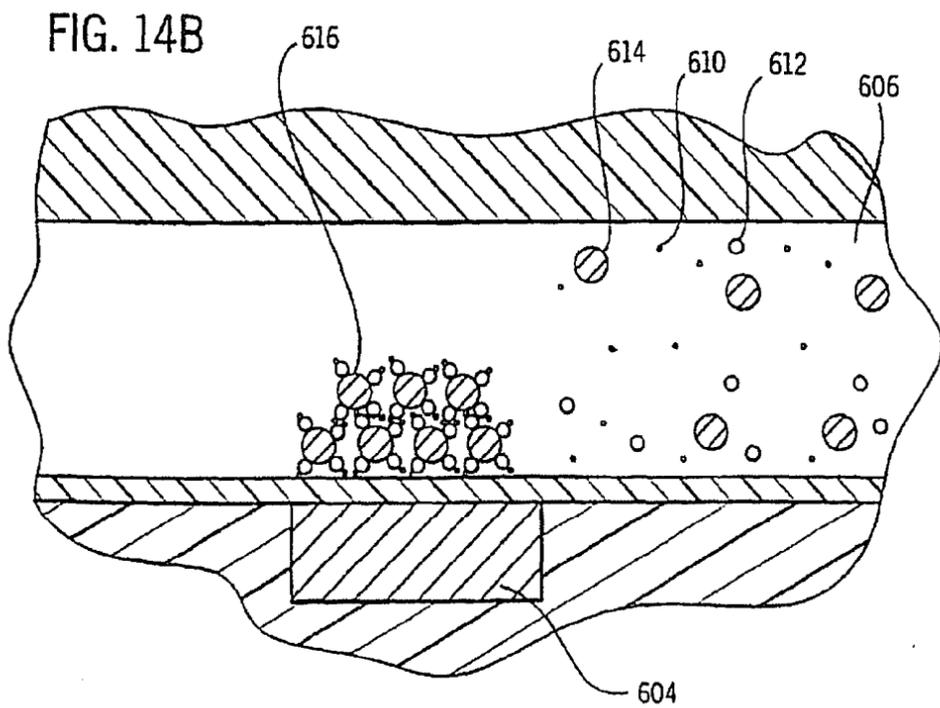
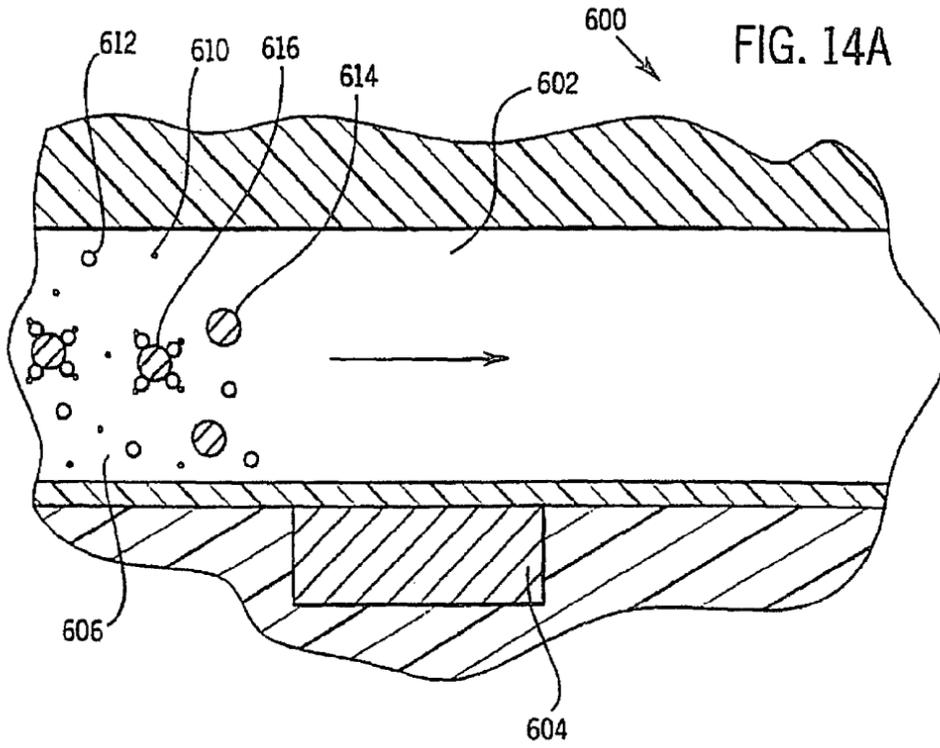
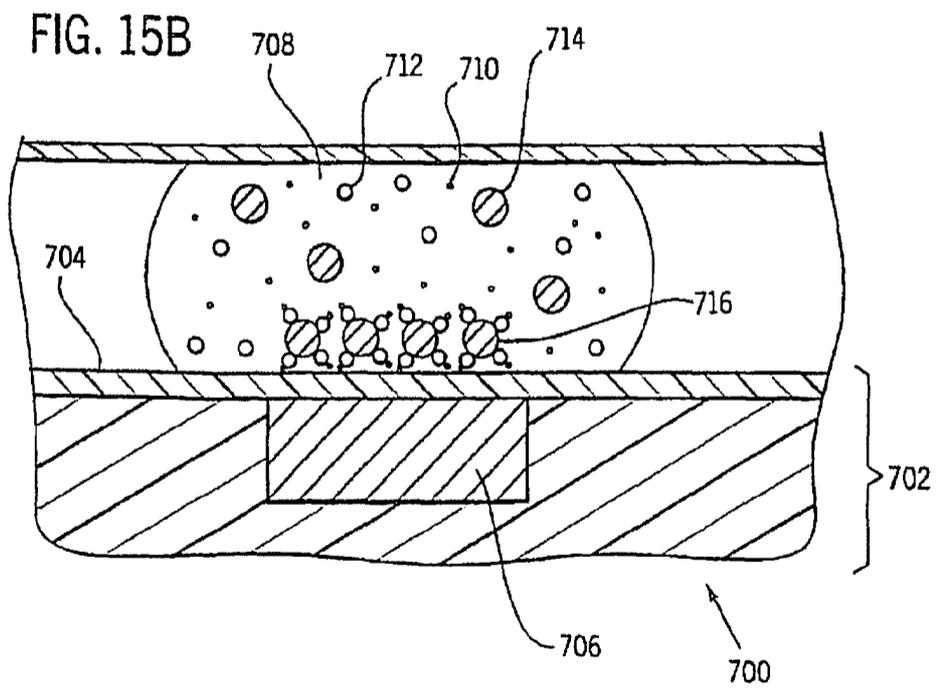
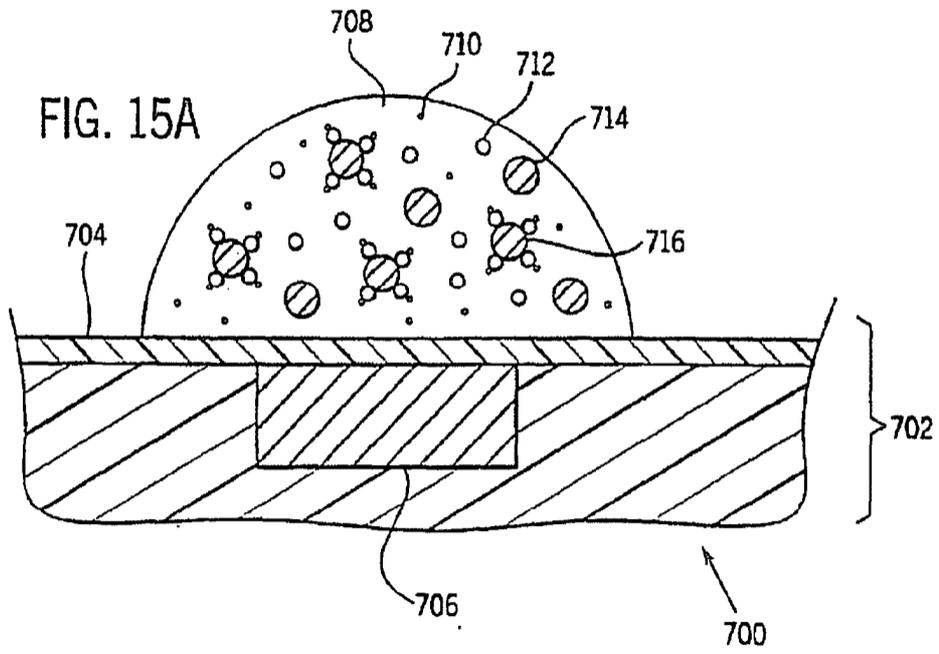


FIG. 13





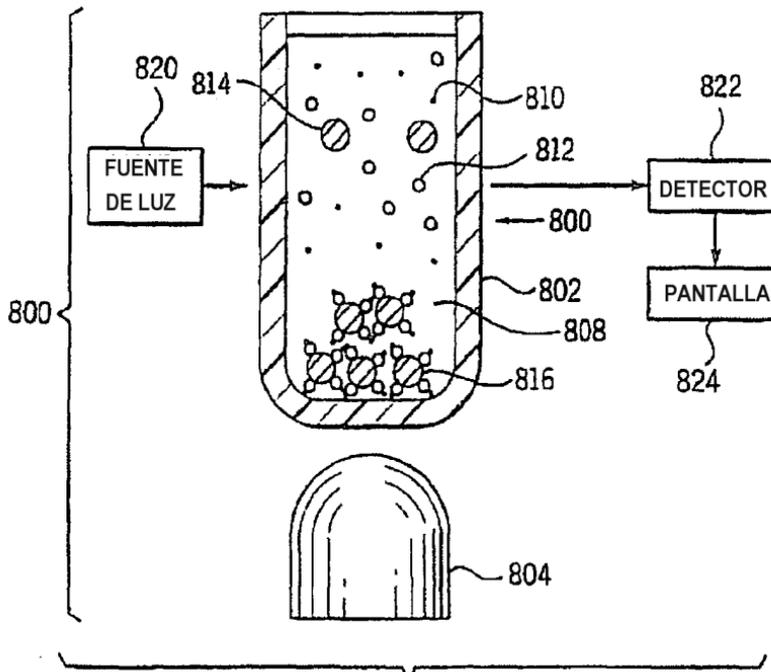
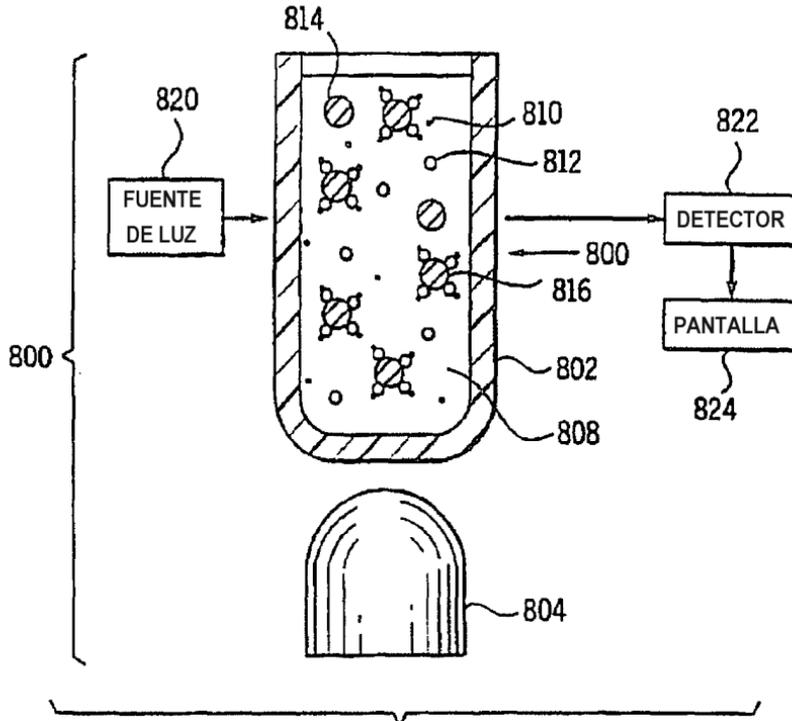


FIG. 17

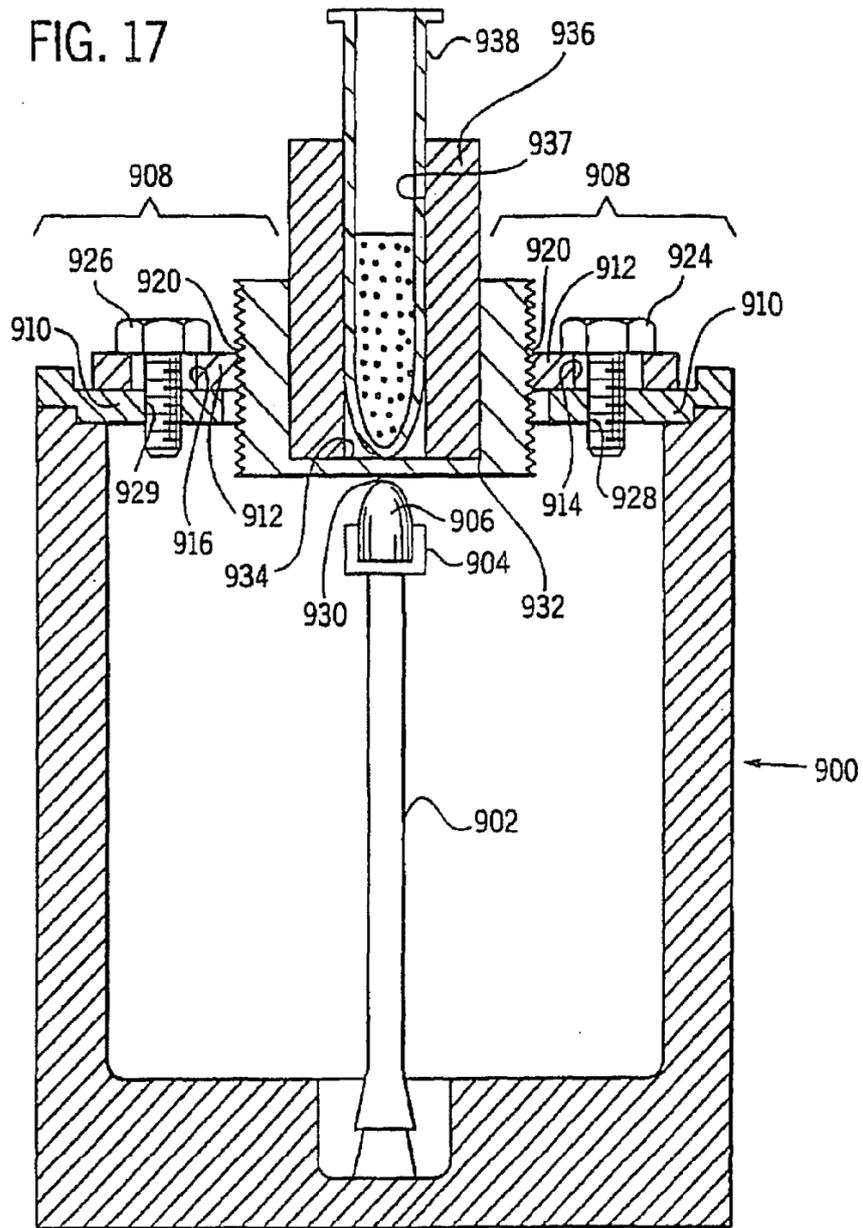


FIG. 18

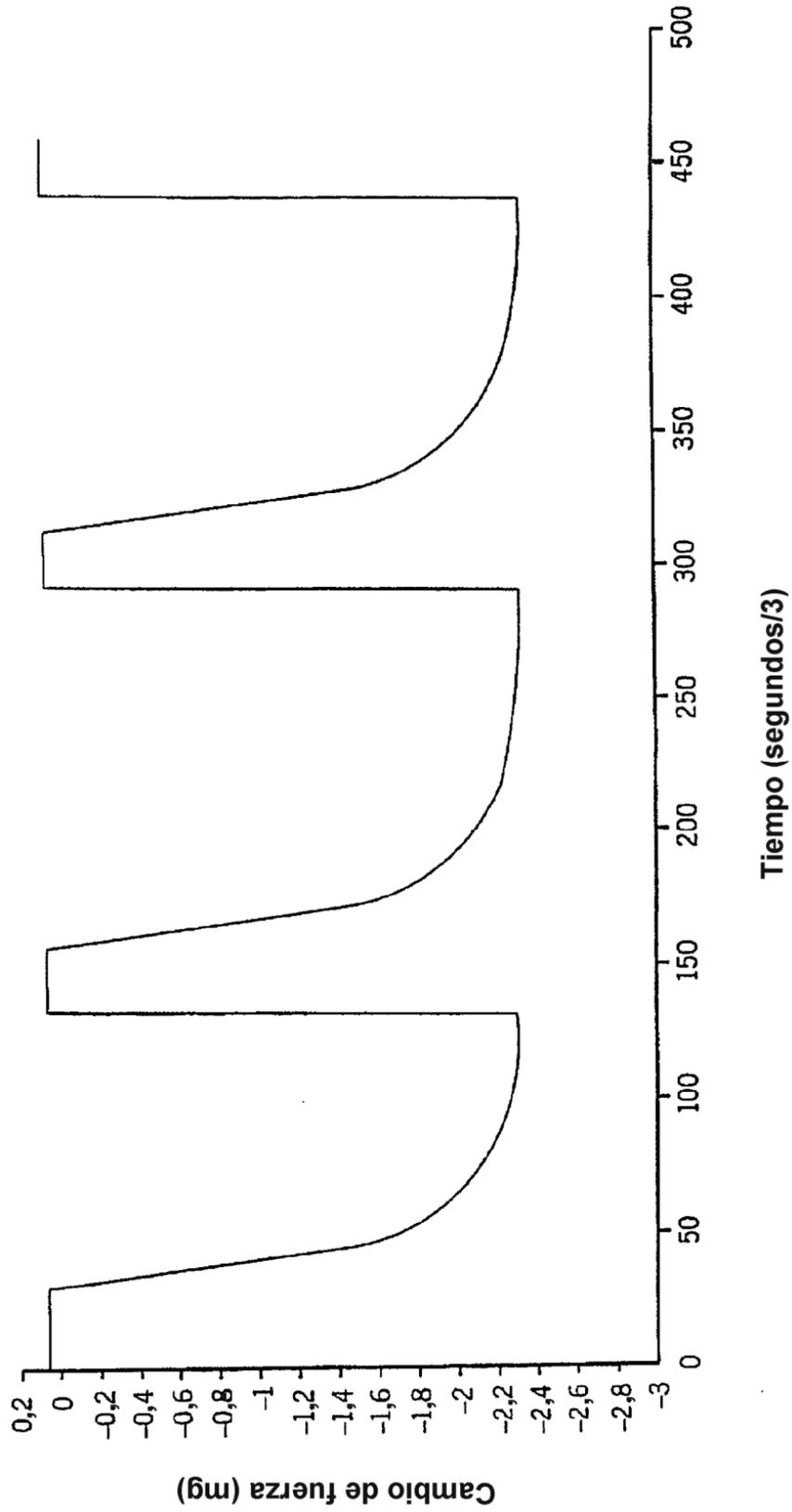
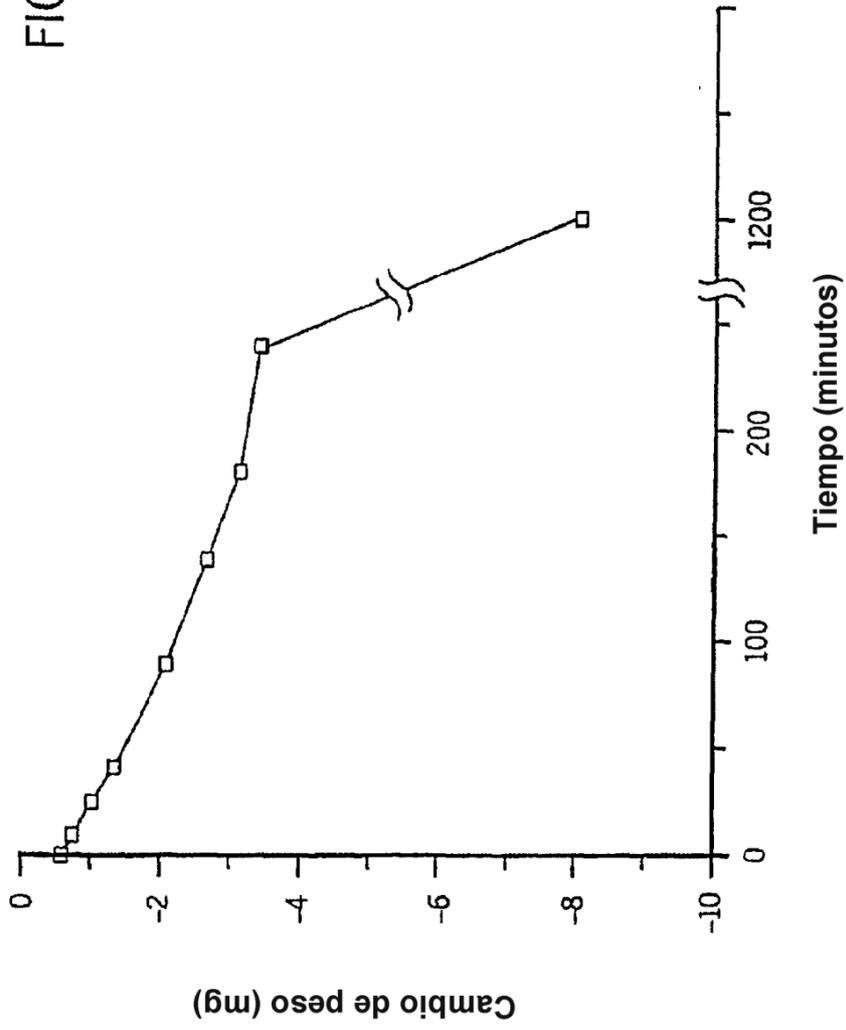


FIG. 19



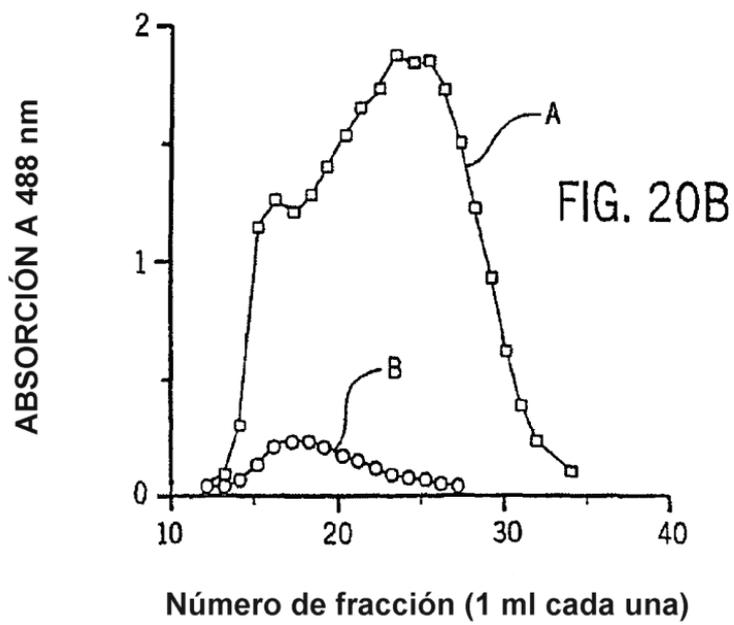
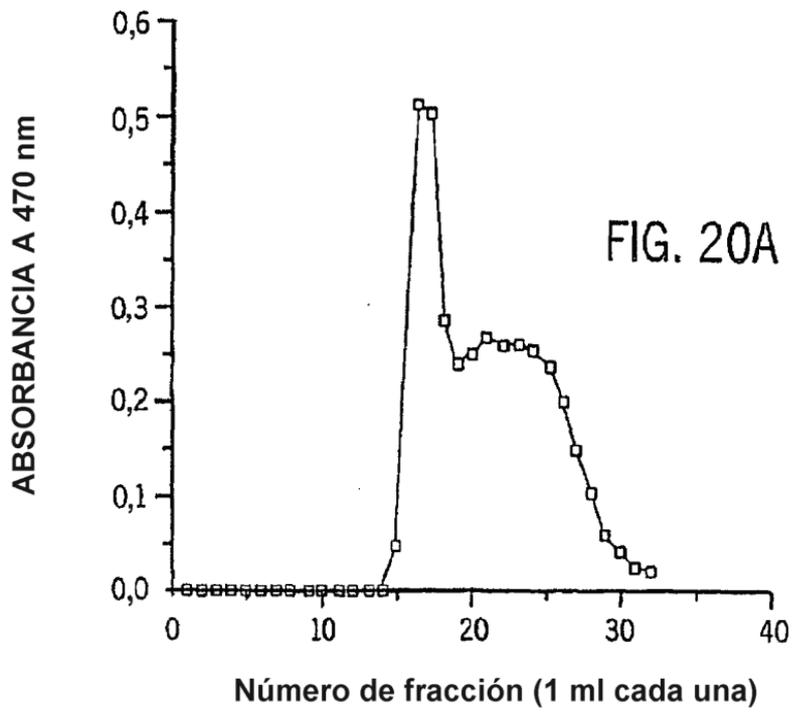
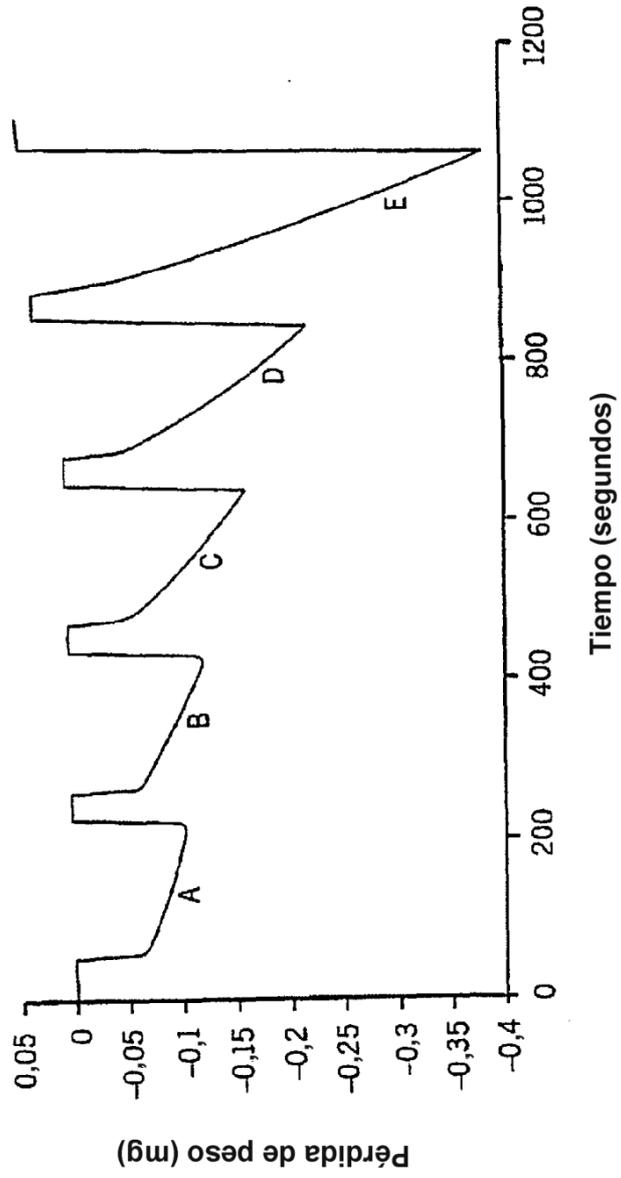


FIG. 21



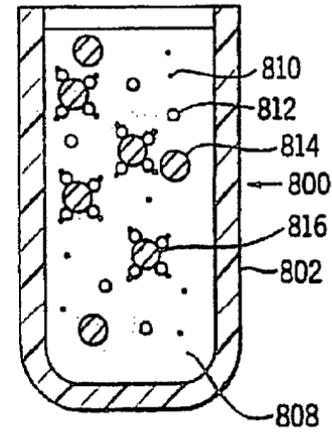


FIG. 22A

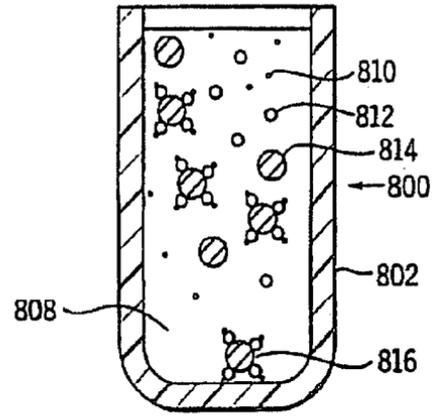


FIG. 22B

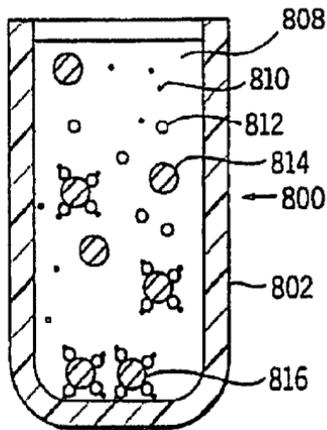


FIG. 22C

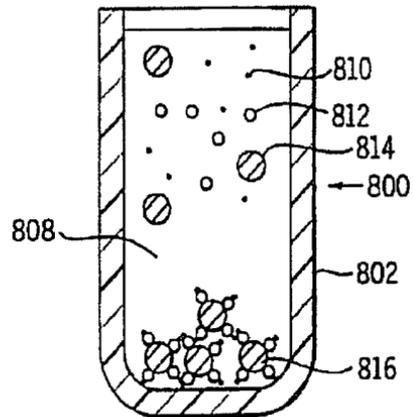
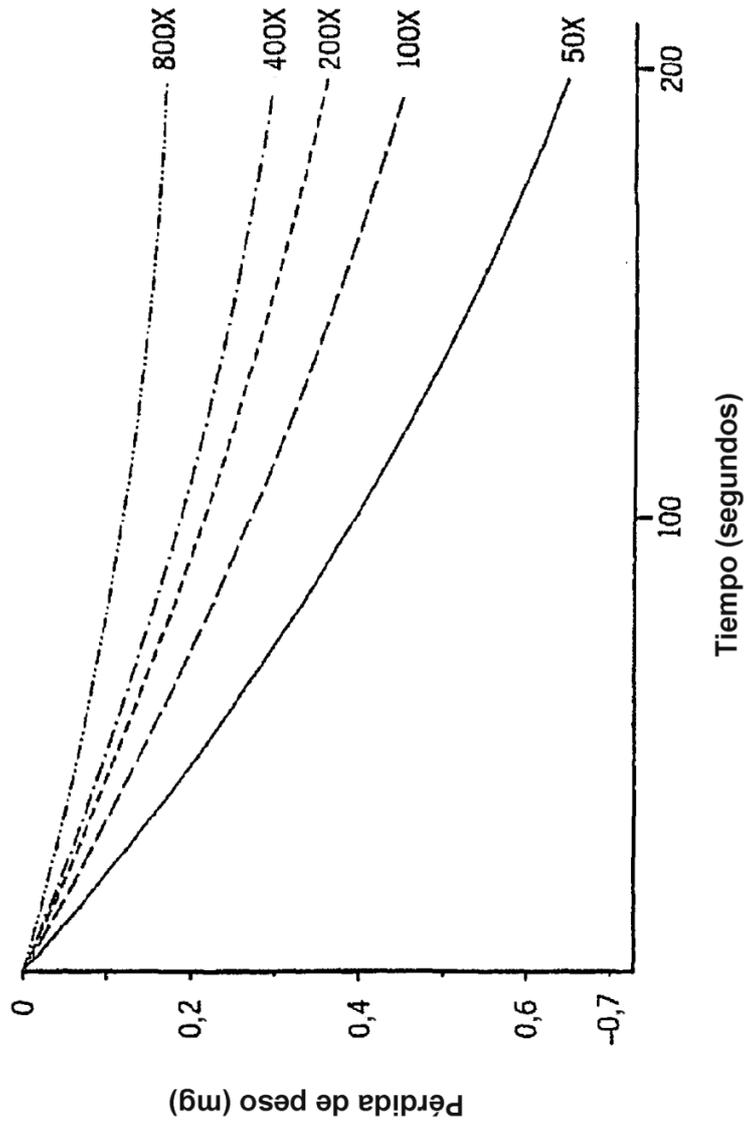


FIG. 22D

FIG. 23



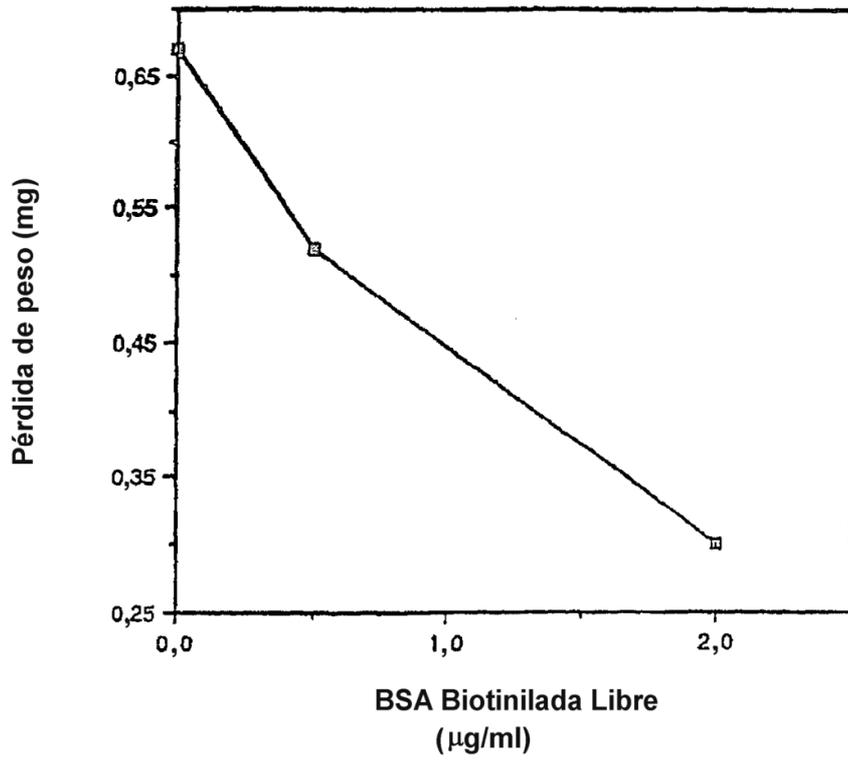
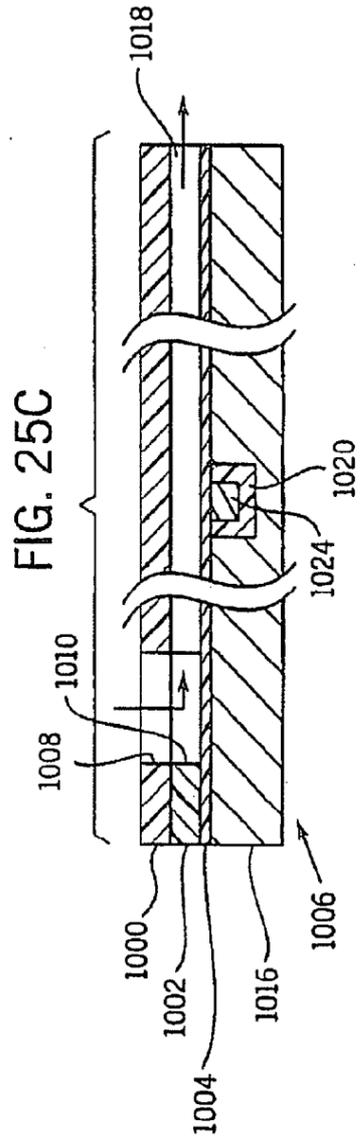
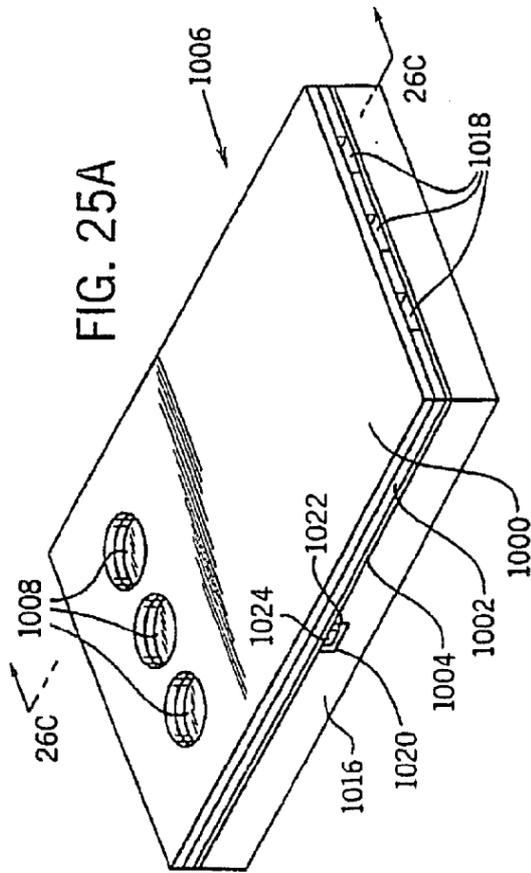


FIG. 24



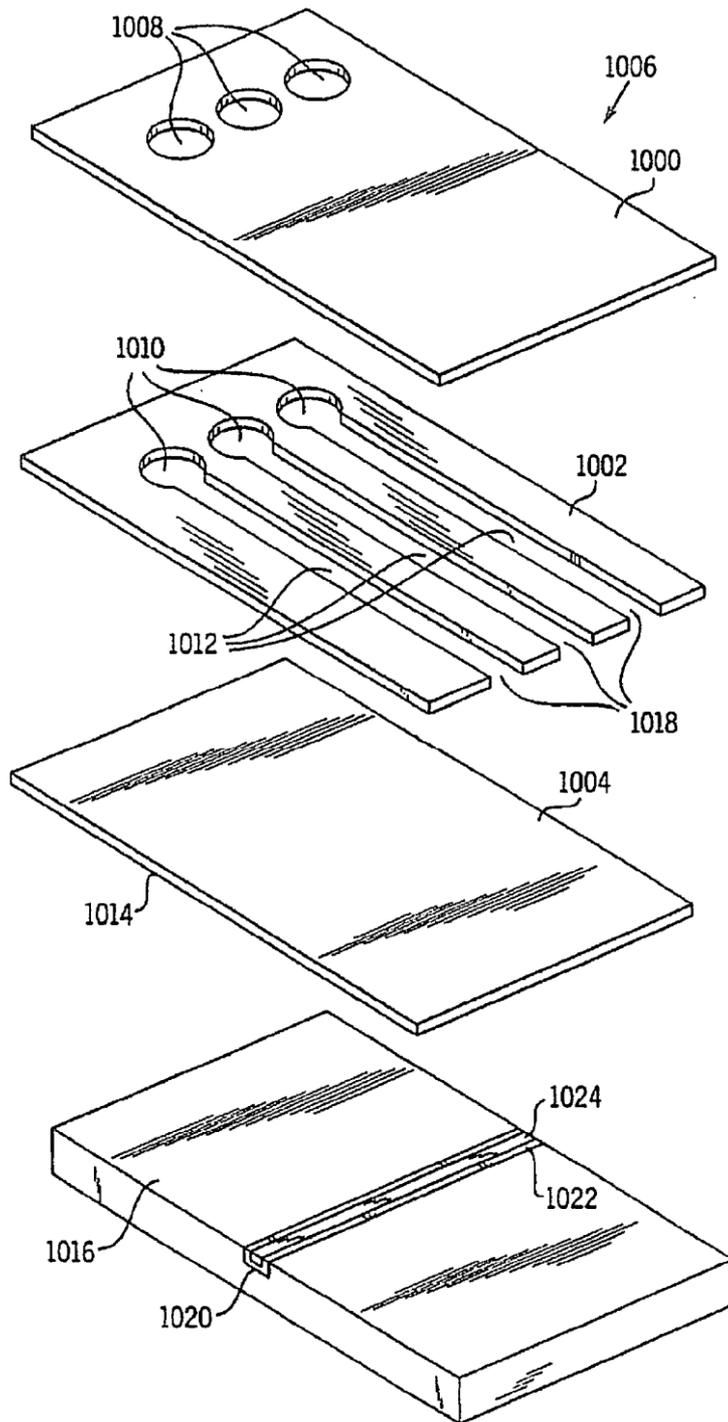


FIG. 25B

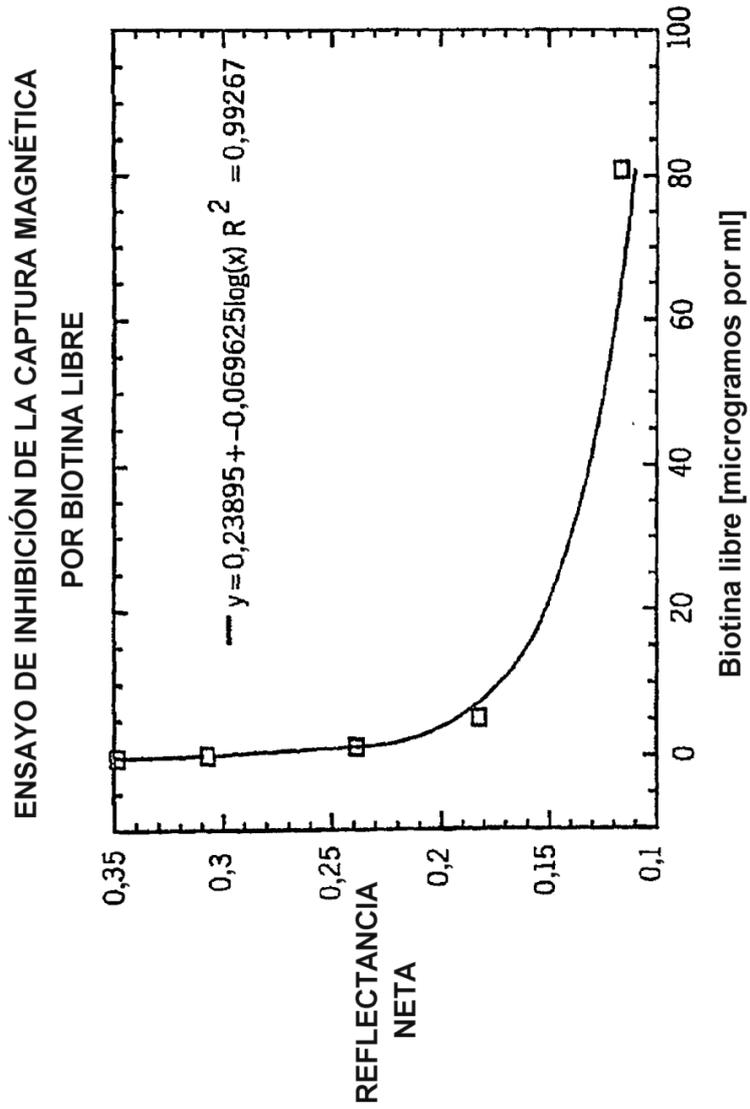


FIG. 26

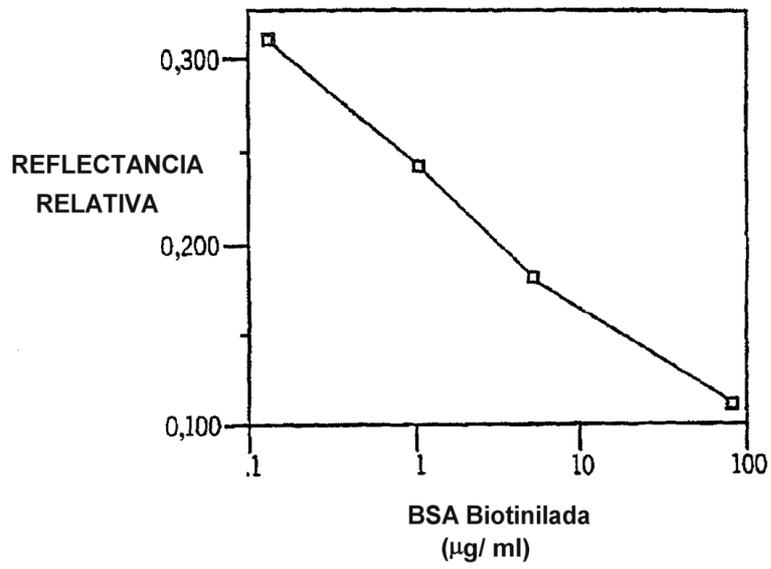


FIG. 27