

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 912**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 06255512 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **09.05.2007 EP 1783494**

54 Título: **Producto y procedimiento de inmunoensayo**

30 Prioridad:

27.04.2006 US 795452 P
03.11.2005 US 732994 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.02.2013

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821 , US

72 Inventor/es:

MABUSHI, MASAHARU;
KIMURA, HIROKO;
EMERICK, MARC;
CLARK, PHILLIP y
GREENIZEN, KURT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 912 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

Producto y procedimiento de inmunoensayo

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/795.452, presentada el 27 de abril de 2006 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/732.994, presentada el 3 de noviembre de 2005.

10 La invención se refiere a un dispositivo de laboratorio y a un procedimiento de uso del dispositivo para detectar la posición de o presencia/ausencia de sustancias que están contenidas en una membrana de transferencia. Más particularmente, la presente invención se refiere a una técnica para aplicar reactivos y soluciones de lavado a una membrana de transferencia para conseguir esta detección rápidamente mediante el uso de un vacío o una presión positiva.

Antecedentes de la invención

15 El uso de electroforesis en gel es actualmente la técnica más extendida para la separación de materiales biológicos. (Los materiales no biológicos también pueden separarse usando geles u otros soportes cromáticos también, pero el alcance de esfuerzo con respecto a los biológicos es mayor.) Las aplicaciones típicas incluyen la separación de fragmentos de ácido nucleico de diversos tamaños en el contexto de determinación de la secuencia; en la detección de polimorfismos; o verificación de tamaños en otros contextos. También se realizan frecuentemente separaciones de proteínas y glucoproteínas y la aplicación de separaciones en gel como verificación de homogeneidad o pureza.

20 En todos estos procedimientos, se aplican muestras mixtas de entidades biológicas a geles electroforéticos y los componentes se separan mediante la aplicación de un campo eléctrico a través del gel. Independientemente de la manera en la que se desarrolla el gel, el patrón de migración resultante de las sustancias contenidas en la muestra debe ser detectado de alguna manera.

25 Para realizar esta detección, típicamente el soporte de gel se pone en contacto con una membrana de transferencia a la que son transferidas las sustancias en el mismo patrón en el que aparecen en el gel. Las "manchas" son detectadas a continuación, a un mínimo, bloqueando la membrana con una solución de proteína o detergente para reducir la unión no específica (que, en caso contrario, conduce a un alto nivel de ruido y un bajo nivel de detección). Los agentes de bloqueo típicos incluyen caseína, albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo desnatada (generalmente a aproximadamente al 1%) en una solución de TBS-T o PBS-T. La entidad biológica es incubada a continuación con un anticuerpo específico para el antígeno en la membrana. La membrana se lava a continuación exhaustivamente para retirar cualquier contaminante (tal como restos de gel), proteínas de bloqueo o anticuerpos no unidos y similares. La membrana es tratada e incubada a continuación con un anticuerpo secundario conjugado a una enzima, un radioisótopo, flúor-flúor o biotina, específico para el anticuerpo primario. La membrana se lava de nuevo exhaustivamente para retirar cualquier anticuerpo secundario no unido. A continuación, se aplica un reactivo detector, generalmente un material cromógeno, quimioluminiscente, fluorescente, radiológico o marcado con estreptavidina, que se une a, o es un sustrato de, la enzima-conjugado. Finalmente, se usa el dispositivo de detección apropiado para determinar la presencia, ausencia, posición, cantidad, etc., de la entidad biológica. Las últimas seis etapas generalmente requieren de 3-6 horas a una noche dependiendo de la velocidad de la reacción entre los reactivos seleccionados, la membrana y la entidad biológica y el procedimiento requiere múltiples periodos de incubación de la membrana en una plataforma con agitación. Es un procedimiento tedioso que desagrada a la mayoría de los investigadores y que consume (malgasta) un gran volumen de reactivos.

30
35
40

El documento WO 2004013607 describe apilamientos de membranas que absorben biomoléculas. El documento WO 20050033346 desvela una distribución de flujo por debajo de las membranas.

45 Algunos investigadores han sugerido el uso de la acción de capilaridad de un material absorbente tal como papel de filtro colocado debajo de la membrana para arrastrar a los fluidos restantes a través de la membrana y mejorar la velocidad del procedimiento, especialmente las etapas de lavado.

50 El documento US 5.155.049 menciona un sistema llamado la cámara de hibridación Hybrid-Ease™ comercializado por Hoefer Scientific Instruments. Esta cámara comprende dos rejillas entre las cuales está intercalada la membrana. Las placas de la rejilla se encajan en posición rodeando a la membrana, y se instalan jeringas en el espacio abierto creado por las rejillas. Una jeringa se usa para aplicar reactivos y lavar, y la otra para retirar el exceso. El sistema requiere grandes volúmenes de líquido para funcionar, es engorroso de emplear y sigue requiriendo bastante tiempo. El documento también menciona que, en algunos ensayos particulares, tales como ensayos ELISA, en pocillos de pequeño volumen (tal como una placa de microvaloración de 96 pocillos), otros han usado vacío para arrastrar líquidos a través de una o más membranas en una etapa de lavado. Sin embargo, no tienen en cuenta este esfuerzo, ya que solamente está disponible en aplicaciones de pequeño volumen y sigue siendo incontrolable. En su lugar, sugieren que el mejor procedimiento es usar una prensa manual que tiene la membrana encima de un papel de filtro y una capa de cubierta y a continuación prensar la membrana intercalada entre dos placas para exprimir el líquido a través de la membrana y al papel.

55

Queda claro que se requiere un procedimiento más eficiente para la detección de los materiales o entidades biológicas en membranas de transferencia. La presente invención permite una detección más efectiva y eficiente de entidades biológicas en una membrana de transferencia.

Resumen de la invención

5 La presente invención solamente está limitada por sus reivindicaciones.

Se proporciona un procedimiento rápido, eficiente y conveniente para detectar una o más entidades biológicas en una membrana de transferencia. La detección puede referirse a la posición, naturaleza o cantidad de la sustancia biológica en una o más membranas. El procedimiento de la invención implica un régimen asistido por presión, seleccionado entre un régimen asistido por presión positiva o vacío para el suministro y la retirada de reactivos y permite el lavado de los contaminantes de sustancias incluidas en la membrana a detectar usando volúmenes muy bajos de líquido. Este procedimiento permite completar las etapas de bloqueo, lavado y unión al anticuerpo en aproximadamente 30-45 minutos sin comprometer la calidad de la transferencia.

De este modo, en un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para hacer pasar líquido, tal como una solución de anticuerpo, reactivo de detección o lavado, a través de una o más membranas en las que están embebidas una o más sustancias biológicas a detectar. La membrana puede corresponder, por ejemplo, al patrón de migración de una muestra sometida a separación en un gel de electroforesis. La membrana también puede ser un soporte sólido de un ensayo de unión específica.

Este procedimiento es particularmente útil para membranas que se obtienen mediante transferencia de un soporte de gel que ha sido usado para separación electroforética de materiales contenidos en una muestra o verificación de pureza.

En otro aspecto, la invención se refiere a un aparato útil para llevar a cabo el procedimiento de la invención. El dispositivo está constituido por varias capas que incluyen una capa de soporte porosa por debajo de las una o más capas de membrana de transferencia, un distribuidor de flujo por encima de la membrana o membranas de transferencia y un pocillo en el distribuidor de flujo para contener el líquido en el área deseada y para permitir volúmenes de partida más bajos de dicho líquido. Preferiblemente, el distribuidor de flujo es una membrana porosa no de unión o de baja unión, tal como una membrana de 0,22 micrómetros.

El dispositivo tiene una o más membranas de transferencia montadas entre el distribuidor de flujo y el soporte y se coloca a continuación sobre o en el interior de un colector de vacío de dimensiones adecuadas o una cámara de presión está instalada sobre la parte superior del distribuidor de flujo. El procedimiento se realiza a continuación con el uso de vacío o presión positiva entre las etapas necesarias para mover el líquido a través de la membrana.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío que comprende un soporte poroso, un distribuidor de flujo colocado encima del soporte poroso y uno o más pocillos de reactivo montados encima del distribuidor de flujo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión positiva que comprenden un soporte poroso, un distribuidor de flujo colocado encima del soporte poroso y uno o más pocillos de reactivo montados encima del distribuidor de flujo.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío que comprende un colector de vacío, un soporte poroso montado sobre el colector de vacío, un distribuidor de flujo colocado encima del soporte poroso y uno o más pocillos de reactivo montados encima del distribuidor de flujo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión positiva que comprende un colector, un soporte poroso montado sobre el colector, una o más membranas de transferencia colocadas sobre el soporte poroso, un distribuidor de flujo colocado encima de las una o más membranas porosas, uno o más pocillos de reactivo montados encima del distribuidor de flujo y un dispositivo de presión positiva montado de forma que pueda desmontarse encima del distribuidor de flujo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un colector de vacío, un soporte poroso colocado sobre el colector de vacío, una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando la membrana colocada sobre el soporte poroso, un distribuidor de flujo colocado encima de la membrana y uno o más pocillos colocados encima del distribuidor de flujo,
- b. añadir uno o más reactivos a los uno o más pocillos y aplicar un vacío para arrastrar a los reactivos al interior de la membrana, y

- c. añadir uno o más agentes de lavado a los uno o más pocillos y aplicar un vacío para arrastrar a los agentes de lavado y cualesquiera reactivos no unidos a través del distribuidor de flujo, la membrana y el soporte poroso y al interior del colector de vacío.
- d. repetir las etapas (b y c) una o más veces adicionales, según se desee o se requiera.

5 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un colector de vacío, un soporte poroso colocado sobre el colector de vacío, una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando la membrana colocada sobre el soporte poroso, un distribuidor de flujo colocado encima de la membrana y uno o más pocillos colocados encima del distribuidor de flujo,
- 10 b. añadir uno o más reactivos a los uno o más pocillos y aplicar un vacío para arrastrar a los reactivos al interior de la membrana,
- c. añadir uno o más agentes de lavado a los uno o más pocillos y aplicar un vacío para arrastrar a los agentes de lavado y cualesquiera reactivos no unidos a través del distribuidor de flujo, la membrana y el soporte poroso y al interior del colector de vacío, y
- 15 d. repetir las etapas (b y c) una o más veces adicionales.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de hacer pasar a un líquido de lavado o que contiene un reactivo a través de una membrana de transferencia que contiene una o más entidades biológicas, de las cuales al menos una debe ser detectada, en el que el procedimiento comprende:

- a. proporcionar un colector de vacío, un soporte poroso colocado sobre el colector de vacío, un distribuidor de flujo y uno o más pocillos colocados encima del distribuidor de flujo,
- b. colocar las una o más membranas de transferencia que contienen las una o más entidades biológicas sobre el soporte poroso,
- c. colocar el distribuidor de flujo encima de la membrana o membranas de transferencia,
- 25 d. añadir un líquido al pocillo del distribuidor de flujo, y aplicar un vacío para arrastrar al líquido a través del distribuidor de flujo, la membrana o membranas de transferencia y el soporte poroso al interior del colector.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de hacer pasar a un líquido de lavado o que contiene un reactivo a través de una o más membranas de transferencia que contienen una o más entidades biológicas, de las cuales al menos una debe ser detectada, en el que el procedimiento comprende:

- a. proporcionar un colector, un soporte poroso colocado sobre el colector, un distribuidor de flujo y uno o más pocillos colocados encima del distribuidor de flujo,
- b. colocar las una o más membranas de transferencia que contienen las una o más entidades biológicas sobre el soporte poroso,
- c. colocar el distribuidor de flujo encima de la membrana o membranas de transferencia,
- 35 d. añadir un líquido al pocillo del distribuidor de flujo, y aplicar una presión positiva al distribuidor de flujo para mover el líquido a través del distribuidor de flujo, la membrana o membranas de transferencia y el soporte poroso al colector.

En los dibujos

- La figura 1 muestra una primera realización de un dispositivo de acuerdo con la presente invención en vista de sección transversal.
- La figura 2 muestra una segunda realización de un dispositivo de acuerdo con la presente invención en vista de sección transversal.
- La figura 3 muestra una tercera realización de un dispositivo de acuerdo con la presente invención en vista de sección transversal.
- La figura 4 muestra una cuarta realización de un dispositivo de acuerdo con la presente invención en vista de sección transversal.
- Las figuras 5A-5C muestran las realizaciones del procedimiento de acuerdo con la presente invención en forma de diagrama de bloques.
- La figura 6 muestra los resultados de un ejemplo de una transferencia procesada de acuerdo con la técnica anterior y la presente invención.
- 50

Descripción detallada de la invención

- Para conseguir la presente invención, se usa un dispositivo de acuerdo con la presente invención. Tal como se muestra en la figura 1, el dispositivo 2 está constituido por un soporte poroso 4. Preferiblemente el soporte está formado con un borde 6 o pieza de montaje que está diseñada para encajar dentro de o sobre un colector 8 (descrito a continuación). Una o más capas de una membrana de transferencia 10 se colocan encima del soporte 4. Un distribuidor de flujo 12 se coloca o se monta a continuación encima de la membrana de transferencia 10. El distribuidor de flujo puede, si se desea, tener uno o más pocillos 14 (en esta realización se muestra uno) unidos a la
- 55

superficie superior 16 del distribuidor de flujo 12 o puede ser una pieza diferente (no se muestra) que simplemente se une o se coloca encima del distribuidor de flujo 12.

Tal como se muestra en la figura 1, el colector 8 es, en esta realización, un colector de vacío que tiene un orificio 18 que está unido a una fuente de vacío 20. Como alternativa, puede usarse presión positiva (que se describirá adicionalmente a continuación) en lugar de un vacío para impulsar el procedimiento de filtración/lavado. El orificio 18 está ubicado por debajo del soporte poroso 4. Un dispositivo de recogida de residuos 22, en este caso, un receptáculo, está montado por debajo del colector o, si se desea, en el colector (no se muestra) para recoger el líquido arrastrado a través del dispositivo 2. Como alternativa, el dispositivo de recogida de residuos puede ser un desagüe para residuos u otro dispositivo similar, tal como conoce un especialista en la técnica.

El distribuidor de flujo 12 es una estructura porosa. En una realización (mostrada) toda la estructura es porosa. En otra realización mostrada en la figura 2, el distribuidor de flujo 12A solamente es poroso en el área 24 dentro del pocillo o los pocillos 14. El área 17 del distribuidor 12 que no es porosa puede hacerse no porosa rellenando los poros en ese área 17 con un material no poroso tal como un plástico o un pegamento, cerrando los poros en ese área 17 con calor y/o presión y/o disolventes tal como se conoce bien en la técnica o formando el distribuidor 12 para coincidir con el tamaño de la dimensión externa del pocillo o los pocillos 14 y sellar de forma hermética a líquidos el distribuidor 12 con el fondo del pocillo o los pocillos 14 a lo largo de su dimensión externa.

El distribuidor de flujo 12 puede ser cualquier estructura porosa que posibilite la distribución uniforme del líquido en su cara y que sea lo suficientemente poroso para permitir el movimiento fácil bajo la influencia de un vacío y que también sea capaz de eliminar por filtración aglomerados, partículas y otros desechos del líquido.

El distribuidor de flujo puede ser de cualquier tamaño deseado. Los geles están disponibles en diversos tamaños "convencionales" de aproximadamente 7 cm por 8 cm a un área de 20 cm por 20 cm.

Dichos materiales incluyen, aunque sin limitarse a, filtros porosos tejidos, no tejidos y fibrosos tales como papel TYVEK® o TYPAR®, materiales celulósicos tales como filtros MILLISTAK+® disponibles de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts, membranas tales como membranas microporosas, membranas sinterizadas tales como filtros POREX® y similares. Se prefieren membranas, especialmente membranas microporosas de plástico.

Un tamaño de poro preferido de dichas membranas está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,65 micrómetros, preferiblemente entre 0,2 y aproximadamente 0,45 micrómetros y más preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetros.

Adicionalmente, el filtro o membrana preferida tiene bajas características de unión para los reactivos usados para minimizar la cantidad usada. Más específicamente, tal como se usa generalmente con materiales biológicos, es hidrófilo y tiene bajas características de unión a proteínas. Uno de dichos distribuidores es una membrana hidrófila DURAPORE® formada por PVDF disponible de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts. Otro es una membrana de PES hidrófila Millipore EXPRESS® disponible de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

El soporte poroso 4 puede ser una simple malla, una rejilla o una estructura porosa sinterizada tal como una membrana POREX® o un filtro microporoso de poros gruesos o grandes, tal como una tela de papel de polipropileno o polietileno no tejido o un filtro microporoso de 1-10 micrómetros. Dichos soportes pueden estar hechos de materiales de polímero, cerámicos o metálicos que incluyen, aunque no se limitan a, metales, tales como acero inoxidable, acero, una aleación de acero, aluminio y similares, y polímeros tales como polietileno, polipropileno, polisulfonas, estirenos, nylons y similares.

La figura 3 muestra una realización que usa un colector de vacío convencional 30. En este caso, el colector tiene una estructura de soporte porosa 32, tal como una rejilla de plástico o metal o una lámina sinterizada porosa de plástico o metal u otros dispositivos similares tal como se conocen bien en la técnica del vacío. La membrana de transferencia 34 se coloca de nuevo encima del soporte 32, cubierta por el distribuidor de flujo 36 y una estructura de pocillo 38 tal como se ha descrito anteriormente en relación con las realizaciones de las figuras 1 y 2.

La figura 4 muestra un sistema de presión positiva que puede usarse en la presente invención. En la medida en que los elementos son los mismos que los de las figuras 1-3, se han usado los mismos números de referencia.

Tal como se muestra en la figura 4, el dispositivo 2A está constituido por un soporte poroso 4. Preferiblemente, el soporte está formado con un borde 6 o pieza de montaje que está diseñada para encajar dentro de o sobre un colector 8. Una o más capas de una membrana de transferencia 10 (se muestra una) se colocan encima del soporte 4. Un distribuidor de flujo 12 se coloca o se monta a continuación encima de la membrana de transferencia 10. El distribuidor de flujo puede tener uno o más pocillos 14 (en esta realización se muestra uno) unidos a la superficie superior 16 del distribuidor de flujo 12 o puede ser una pieza diferente (no se muestra) que simplemente se une o se coloca encima del distribuidor de flujo 12. Un colector de presión positiva o cubierta 13 se coloca sobre y preferiblemente se fija de forma que pueda desmontarse a los pocillos 14 y/o el distribuidor de flujo 12. El colector de presión positiva 13 tiene un orificio 15 conectado a una fuente de presión positiva mediante el tubo 17. La presión positiva puede proceder de una bomba, un suministro de gas presurizado (tanque, bombona o similares) y otras dichas fuentes bien conocidas usadas en el laboratorio o en la industria.

- Tal como se muestra en la figura 4, el colector 8 es simplemente un colector 8 de recogida que tiene un orificio 18 que puede usarse para purgar el exceso de presión. Puede contener, si se desea un filtro de aire para impedir la entrada de contaminantes. El orificio 18 está ubicado por debajo del soporte poroso 4. Un dispositivo de recogida de residuos 22, en este caso, un receptáculo, está montado por debajo del colector o, si se desea, en el colector (no se muestra) para recoger el líquido arrastrado a través del dispositivo 2. Como alternativa, el dispositivo de recogida de residuos puede ser un desagüe de residuos u otro dispositivo similar, tal como conoce un especialista en la técnica.
- 5 Pueden usarse diversos procedimientos en la presente invención. Siendo el factor clave que todos dependan de una filtración impulsada por vacío o presión positiva de los líquidos en lugar de difusión estática tal como se ha producido en el pasado.
- 10 El procedimiento más sencillo es usar simplemente la presente invención para llevar a cabo uno o más de los ciclos de lavado. Típicamente, cada ciclo de lavado está constituido por una o más etapas de lavado. Generalmente, se usan 2-5 etapas por ciclo.
- Otro procedimiento es usar la presente invención en cada etapa en la que es necesario retirar líquido de la membrana de transferencia, tal como después de la incubación de los anticuerpos o en las etapas de lavado.
- 15 En todos estos procedimientos, puede usarse cualquier presión adecuada para mover el líquido o los líquidos a través del dispositivo y al interior del colector. Ésta puede variar dependiendo de las membranas seleccionadas para la transferencia y el distribuidor de flujo, el colector usado, la velocidad deseada de la filtración y el suministro de vacío o presión positiva disponible para el investigador.
- 20 Generalmente, el vacío disponible puede variar entre 100 y 760 mm de Hg (133 milibares y 1013 milibares). El uso de válvulas, limitadores de presión y similares también puede usarse para mantener al vacío dentro de los intervalos permitidos para las membranas usadas. Un colector de vacío preferido de una realización de la presente invención es un dispositivo STERICUP® a base de vacío y el uso de un vacío de aproximadamente 100 mm de Hg. Otros colectores de vacío adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, los colectores de vacío MULTISCREEN™ y MULTISCREEN_{HTS} disponibles de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.
- 25 En general, la presión positiva se suministra mediante una tubería de aire a presiones que varían entre aproximadamente 2 psi y aproximadamente 15 psi. El uso de válvulas, limitadores de presión y similares también puede usarse para mantener a la presión dentro de los intervalos permitidos para las membranas usadas. Dichos sistemas de presión incluyen, aunque sin limitarse a, dispositivos de celdas agitadas Amicon® disponibles de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts y unidades de filtración por presión positiva disponibles de Caliper
- 30 Life Sciences de Hopkinton, Massachusetts.
- En las figuras 5A-C, en diagrama de bloques, se muestran procedimientos típicos.
- En la figura 5A, se proporciona un dispositivo de acuerdo con la invención y unido a un colector de vacío y una fuente de vacío 50. La membrana o membranas de transferencia se colocan en el dispositivo en la posición apropiada 52. Preferiblemente, la membrana o membranas de transferencia en la etapa 52 se ha humedecido
- 35 previamente (no se muestra). El vacío se pone en marcha y un líquido, tal como un líquido de lavado, se coloca en el pocillo o los pocillos 54. El vacío continúa hasta que el líquido ha sido arrastrado a través del dispositivo y a continuación el vacío se apaga 56. Cuando se usa más de una membrana de transferencia, éstas pueden disponerse en serie una encima de otra y suficiente líquido que contiene los mismos reactivos deseados puede moverse fácilmente a través de las múltiples capas en una etapa del procedimiento. Generalmente, cuando se usa
- 40 más de una capa, se prefiere que se usen entre 2 y 10 capas, preferiblemente entre 2 y 5 capas de una vez. Como alternativa, puede usarse un distribuidor de flujo que tiene múltiples pocillos y usar más de una membrana de transferencia en paralelo entre sí, cada una con su propio pocillo en el distribuidor de flujo y cada una con su propio conjunto de reactivos, según se requiera para su propósito específico. Pueden usarse incluso múltiples capas en pocillos adyacentes, si se desea.
- 45 En la figura 5B, la etapa 54 se elimina y el líquido se añade con el vacío apagado 58 y se le permite incubar, tal como puede requerirse con los anticuerpos primario o secundario. El vacío se pone en marcha a continuación en la etapa 60.
- En la figura 55C, las etapas de 55A y 55B se combinan como etapas secuenciales. Cualquiera o ambas etapas pueden repetirse, según sea necesario, o disponerse en diferentes secuencias, según se desee, para llevar a cabo
- 50 el procedimiento apropiado.
- Opcionalmente, si se desea, puede colocarse una cazoleta ó dispositivo de único pocillo por debajo del soporte de la membrana, preferiblemente en el propio colector. Éste puede usarse entonces para recoger un único reactivo no unido que puede ser caro y que puede reutilizarse en futuros ensayos. Opcionalmente, puede subdividirse en dos o más sub-bandejas.
- 55 También pueden usarse otros procedimientos con el dispositivo de la presente invención.

Aunque las concentraciones de anticuerpo usadas varían dependiendo del diseño experimental, 10 - 1.000 ng/ml es un intervalo típico para un procedimiento convencional. Los volúmenes de solución requeridos son típicamente de 0,1 ml/cm², 0,03 ml/cm² y 1,0 ml/cm² para bloqueo, reacciones con anticuerpo y lavado, respectivamente.

5 La membrana contiene, en sus intersticios, una o más sustancias a detectar. Generalmente estas sustancias están presentes en los intersticios debido a que han sido transferidas desde un soporte sólido para electroforesis o cromatografía o mediante aplicación directa, habitualmente para detectar la presencia, ausencia o cantidad de un tipo particular de material tal como un anticuerpo o proteína específica - es decir un ensayo de tipo *Dot-Blot* tal como se ha descrito anteriormente. La definición de la membrana no está limitada, sin embargo, a estos casos, sino que se aplica a cualquier caso en el que una o más membranas contienen en sus intersticios una o más sustancias a 10 detectar. En los tipos de membranas previstas para su uso en la presente invención se incluyen membranas usadas habitualmente para transferir geles de electroforesis tales como nitrocelulosa; nylon; o diversas otras membranas poliméricas, tales como fluoruro de polivinilideno (PVDF), comercializado como membranas Immobilon™ de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts.

15 Pueden usarse diversos materiales para replicar los resultados de geles de electroforesis realizados en diversas muestras, tal como se entiende en la técnica. De la forma más habitual, las muestras contienen sustancias biológicas tales como proteínas individuales, anticuerpos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, carbohidratos complejos y similares, pero la aplicación de la técnica no está limitada a estas sustancias. La técnica de la invención es aplicable a cualquier membrana que contenga dentro de ella una sustancia a detectar independientemente de la composición química de la membrana o de las sustancias diana.

20 Cuando se emplean membranas que representan replicas de resultados electroforéticos, la transferencia de las sustancias a detectar desde el gel a la membrana puede llevarse a cabo utilizando membranas que contienen tampón de transferencia, mediante electroelución, electrotransferencia o mediante transferencia semiseca de los geles. Las técnicas para estas transferencias se entienden bien en la técnica, y no constituyen parte de la invención en este documento.

25 El líquido a suministrar puede contener reactivo de detección o puede proporcionarse simplemente como un lavado. La naturaleza del reactivo de detección depende, por supuesto, de la sustancia a detectar. Típicamente, las proteínas se detectan mediante reacciones inmunológicas entre antígeno y anticuerpo o partes inmunorreactivas del mismo; típicamente la presencia de fragmentos de ácido nucleico se detecta mediante sondas oligonucleotídicas adecuadas. Las sustancias de detección responsables de la reacción inmediata o específica con la sustancia a 30 detectar pueden suplementarse adicionalmente, si fuera necesario, con una marca y pueden ser necesarias múltiples aplicaciones de los reactivos de detección por ejemplo, un protocolo puede incluir la detección de un antígeno suministrando un anticuerpo marcado con una enzima, por ejemplo, habitualmente, peroxidasa de rábano rusticano, y a continuación esta unión se detecta por medio del suministro de sustrato para esta enzima. En la aplicación del reactivo, es posible, aunque no se prefiere, usar solamente una matriz donante prensada 35 positivamente para exponer a este componente de la membrana durante un periodo definido.

Lo más conveniente es llevar a cabo el procedimiento de la invención a temperatura ambiente, pero también pueden usarse temperaturas elevadas y más bajas. Esto puede conseguirse calentando el dispositivo o su entorno circundante (tal como en un módulo de calentamiento o módulo de refrigeración).

40 Las transferencias pueden analizarse secuencialmente con múltiples anticuerpos o sondas en el presente dispositivo y procesarse separando los anticuerpos unidos previamente de la transferencia, seguido por posteriores incubaciones con anticuerpos u otras sondas específicas de otras proteínas diana. El procedimiento de separación altera las uniones antígeno-anticuerpo y disuelve los anticuerpos en el tampón circundante. Esto se consigue habitualmente mediante una combinación de detergente y calor o mediante exposición a un pH alto o bajo. El dispositivo, en combinación con el distribuidor de flujo, permite la separación de transferencias usando el 45 procedimiento de pH alto o bajo. El posterior sondeo de nuevo de las transferencias directa (*por ejemplo*, usando el mismo distribuidor de flujo usado para la separación) o posteriormente después del almacenamiento, usaría el mismo protocolo que el sondeo inicial. Están disponibles kits adecuados de Chemicon International Inc con las marcas comerciales de kit ReBlot Plus (nº de catálogo 2500), solución Re-Blot Plus-Mild (nº de catálogo 2502) y solución Re-Blot Plus-Strong (nº de catálogo 2504).

50 En la transferencia de Western convencional, el antígeno o diana es transferido a uno o más soportes de membrana y se sondea con una sonda adecuada tal como un anticuerpo, proteína (*por ejemplo*, Proteína A) o lectina (proteínas o glucoproteínas que se unen a restos de carbohidrato). En algunas aplicaciones, se usa un formato inverso (*por ejemplo*, matriz inversa), en el que el anticuerpo u otras sondas se localizan en una o más membranas u otro soporte (típicamente en un formato de matriz) y el antígeno o diana se presenta a los anticuerpos inmovilizados en la 55 matriz. La visualización de un suceso de unión diana-sonda puede conseguirse mediante el marcado de los antígenos o dianas o usando un anticuerpo secundario específicos para la diana. Las matrices inversas a menudo emplean mezclas de dianas, por ejemplo lisados marcados con colores fluorescentes diferentes para permitir un procesamiento paralelo. Las matrices inversas también pueden realizarse con la presente invención.

Ejemplo

El dispositivo de la figura 1 se preparó usando la base de un dispositivo STERICUP® (disponible de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts) como colector de vacío, una pieza de plástico poroso Porex® como soporte poroso, una membrana hidrófila Durapore® (GVPP), de 0,22 micrómetros de tamaño de poro, como distribuidor de flujo y una tira de poliestireno (típicamente 4 mm más grande que el tamaño de la membrana. Por ejemplo, 76 mm (Largo) X 86 mm (Ancho) X 25 mm (Alto) para 72 mm X 82 mm) formada como un pocillo doblando la tira a 90° para formar cuatro esquinas y sellando los extremos de la tira entre sí usando (adhesivo 3211 de curado por luz, disponible de Loctite). El pocillo se pegó a la superficie de la membrana usando loctite 3211 de curado por luz.

La base estaba conectada a una tubería de vacío con válvulas mediante su orificio de vacío.

Una membrana de transferencia humedecida previamente (humedecida previamente en metanol al 100%, y a continuación en agua) (membrana de transferencia de Western IMMOBILION™ disponible de Millipore Corporation de Billerica, Massachusetts) que contenía una muestra de lisado de hígado bovino se colocó en la base y todas las burbujas de aire entre la base y la membrana se eliminaron. El distribuidor de flujo se colocó encima de la membrana de transferencia. Todas las burbujas de aire entre la base y la membrana se eliminaron. Se aplicó un vacío de 100 mm de Hg y a continuación se añadieron 10 ml de una solución de bloqueo (caseína al 1% en TBS-T (solución salina tamponada con Tris y tensioactivo Tween®-20: Tris-Cl 20 mM, pH 7,6, cloruro sódico al 0,8%, tensioactivo Tween®-20 al 0,1%) al pocillo. A continuación, se apagó el vacío. Se añadió 1 ml de un anticuerpo primario anti-ERK de conejo diluido (diluido a 1:2.000 con caseína al 1% en TBS-T) al pocillo y se le permitió incubar durante 10 minutos sin ningún vacío. Se aplicó un vacío de 100 mm de Hg para filtrar el líquido de anticuerpo restante. Se añadieron 30 ml de una solución de lavado TBS-T y se filtraron al vacío (hasta sequedad). Tres lavados adicionales, cada uno de 30 ml de una solución de lavado TBS-T, se añadieron secuencialmente y se filtraron al vacío. El vacío se apagó a continuación y se añadió 1 ml de un anticuerpo secundario diluido (anticuerpo IgG de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina) (diluido a 1:1.000 con caseína al 1% en TBS-T) al pocillo y se le permitió incubar durante 10 minutos sin vacío. El vacío se aplicó a continuación a 100 mm de Hg para filtrar la solución de anticuerpo secundario restante a través del distribuidor de flujo. Cuatro lavados secuenciales, cada uno de 30 ml de una solución de lavado TBS-T, se añadieron y se filtraron al vacío y a continuación el vacío se apagó. Se añadió un sustrato (reactivo Immobilon™ Western AP) al pocillo. La membrana se expuso a una película de rayos X durante 1 minuto y la película se procesó mediante un revelador de película y una detección estaba completa.

Un ejemplo comparativo usando la metodología tradicional y el mismo tipo de membrana, proteína (ERK) y reactivos se realizó en un periodo de 3 horas.

1. Bloquear la membrana en caseína al 1%/TBS-T durante 1 h (0,1 ml/cm² de membrana)
2. Añadir anticuerpo Anti-ERK (dilución 1:10.000 con caseína al 1% en TBS-T) durante 1 h (0,1 ml/cm² de membrana)
3. Lavar cuatro veces durante 5 minutos en TBS-T (1,0 ml/cm² de membrana)
4. Añadir anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina a una dilución 1:5.000 con caseína al 1% en TBS-T) durante 1 h (0,1 ml/cm² de membrana)
5. Lavar cuatro veces durante 5 minutos en TBS-T (1,0 ml/cm² de membrana)
6. Añadir reactivo Immobilon™ Western AP e incubar durante 5 minutos (0,05 ml/cm² de membrana)
7. Exponer a una película de rayos X durante un 1 minuto y a continuación proceder al revelado de la película

La figura 6 muestra el ejemplo comparativo y el ejemplo de acuerdo con el dispositivo y procedimiento de la presente invención. La figura demuestra la detección de alta calidad que puede conseguirse en solamente 30 minutos. Además, la cantidad de anticuerpos usada en comparación con el procedimiento tradicional se redujo a la mitad en el procedimiento de la presente invención a pesar del aumento de 5 veces de la concentración en 1/10^o de volumen del ejemplo tradicional. Esto no solamente permite a los investigadores realizar más experimentos, sino hacerlo con menos reactivos y resultados de mayor calidad. Además, el ruido de fondo se redujo significativamente en comparación con el procedimiento tradicional.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos que comprende un soporte poroso (4) para soportar una o más capas de membrana de transferencia y, un distribuidor de flujo poroso (12) que es hidrófilo y tiene bajas características de unión a proteínas para posibilitar una distribución uniforme de líquido a través de su cara colocada encima del soporte poroso, y dichas membranas de transferencia **caracterizadas por** uno o más pocillos de reactivo (14) montados encima del distribuidor de flujo.
2. El dispositivo de la reivindicación 1:
- 10 i) en el que el distribuidor de flujo y los uno o más pocillos de reactivo son una unidad integral, o
 ii) en el que el distribuidor de flujo es una membrana y el distribuidor de flujo y uno o más pocillos de reactivo son una unidad integral, o
 iii) que comprende, además, una bandeja de recogida debajo del soporte para la recuperación de reactivos, o
 iv) que comprende, además, una bandeja de recogida debajo del soporte para la recuperación de reactivos y en el que la bandeja se subdivide en dos o más sub-bandejas diferentes.
- 15 3. El dispositivo de la reivindicación 1, para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío, comprendiendo, además, el dispositivo un colector de vacío (8).
4. El dispositivo de la reivindicación 1, adaptado para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío, que comprende, además, una o más membranas (10) que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando las una o más membranas montadas encima del soporte poroso, estando el distribuidor de flujo encima de las una o más membranas.
- 20 5. El dispositivo de la reivindicación 1, adaptado para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión que comprende, además, un colector de recogida (22), una o más membranas (10) que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando las una o más membranas ubicadas encima del soporte poroso, estando el distribuidor de flujo colocado encima de las una o más membranas, y un tapón de presión (13) sellado de forma que pueda desmontarse encima de los uno o más pocillos de reactivo, teniendo el tapón una entrada (15) a su interior, estando la entrada conectada a una fuente de presión gaseosa positiva.
- 25 6. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende una pluralidad de dichos pocillos de reactivo, en el que cada pocillo tiene su propio distribuidor de flujo.
7. Un procedimiento para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío, que comprende las etapas de:
- 30 a) proporcionar un colector de vacío (8), un soporte poroso (4) colocado sobre el colector de vacío, una o más membranas (10) que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando las una o más membranas colocadas sobre el soporte poroso, y un distribuidor de flujo poroso (12) que es hidrófilo y tiene bajas características de unión a proteínas de acuerdo con la reivindicación 1 para posibilitar una distribución uniforme de líquido a través de su cara colocada de las una o más membranas, **caracterizado por que** uno o más pocillos (14) están colocados encima del distribuidor de flujo,
 35 b) uno o más reactivos se añaden a los uno o más pocillos y se aplica un vacío para arrastrar a los reactivos al interior de las una o más membranas, y
 c) uno o más agentes de lavado se añaden a los uno o más pocillos y se aplica un vacío para arrastrar a los agentes de lavado y cualesquiera reactivos no unidos a través del distribuidor de flujo, una o más membranas y soporte poroso y al interior del colector de vacío.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 7:
- i) en el que las etapas (b) y (c) se repiten una o más veces, o
 ii) que comprende, además, una etapa (d) de detectar las una o más entidades biológicas, o
 45 iii) que comprende, además, una etapa (d) de detectar las una o más entidades biológicas mediante un mecanismo de detección seleccionado entre el grupo constituido por entidades radiológicas y entidades colorimétricas, o
 iv) en el que, en la etapa (b), el reactivo es un anticuerpo y se le permite incubar sobre/en las una o más membranas de transferencia sin aplicar el vacío durante un periodo de tiempo establecido.
9. Un procedimiento de hacer pasar a un líquido de lavado o que contiene un reactivo a través de una o más membranas de transferencia que contienen una o más entidades biológicas, de las cuales al menos una debe ser detectada, en el que el procedimiento comprende:
- 50 a) proporcionar un colector de vacío (8), un soporte poroso (4) colocado sobre el colector de vacío y, un distribuidor de flujo poroso (12) que es hidrófilo y tiene bajas características de unión a proteínas para posibilitar una distribución uniforme de líquido a través de su cara **caracterizado por que** uno o más pocillos (14) están colocados encima del distribuidor de flujo,

b) las una o más membranas de transferencia (10) que contienen las una o más entidades biológicas están colocadas sobre el soporte poroso,

c) el distribuidor de flujo está colocado encima de las una o más membranas de transferencia, se añade un líquido al pocillo del distribuidor de flujo, y

5 d) se aplica un vacío para arrastrar al líquido a través de las una o más membranas de transferencia.

10. Un procedimiento de hacer pasar a un líquido de lavado o que contiene un reactivo a través de una membrana de transferencia que contiene una o más entidades biológicas, de las cuales al menos una debe ser detectada, en el que el procedimiento comprende:

10 a) proporcionar un dispositivo constituido por un colector de recogida (22), un soporte poroso (4), un distribuidor de flujo poroso (12) que es hidrófilo y tiene bajas características de unión a proteínas de acuerdo con la reivindicación 1 para posibilitar la distribución uniforme de líquido a través de su cara colocada encima del soporte, **caracterizado por que** uno o más pocillos (14) están colocados encima del distribuidor de flujo y un tapón de presión (13) está unido de forma que pueda desmontarse a la parte superior de los uno o más pocillos, teniendo el tapón una entrada (15) a su interior, entrada que está conectada a un suministro de presión gaseosa positiva,

15 b) una o más capas de membrana de transferencia (10) que contienen las una o más entidades biológicas están colocadas sobre el soporte poroso,

c) el distribuidor de flujo está colocado encima de las una o más capas de membrana de transferencia, se añade un líquido a los uno o más pocillos del distribuidor de flujo, y

20 d) se aplica una presión positiva a través de la entrada al tapón para mover el líquido desde los pocillos a través de las una o más capas de membrana de transferencia y al interior del colector.

11. El procedimiento de la reivindicación 7, 9 ó 10, en el que se proporciona una pluralidad de dichos pocillos de reactivo, teniendo cada pocillo su propio distribuidor de flujo.

25

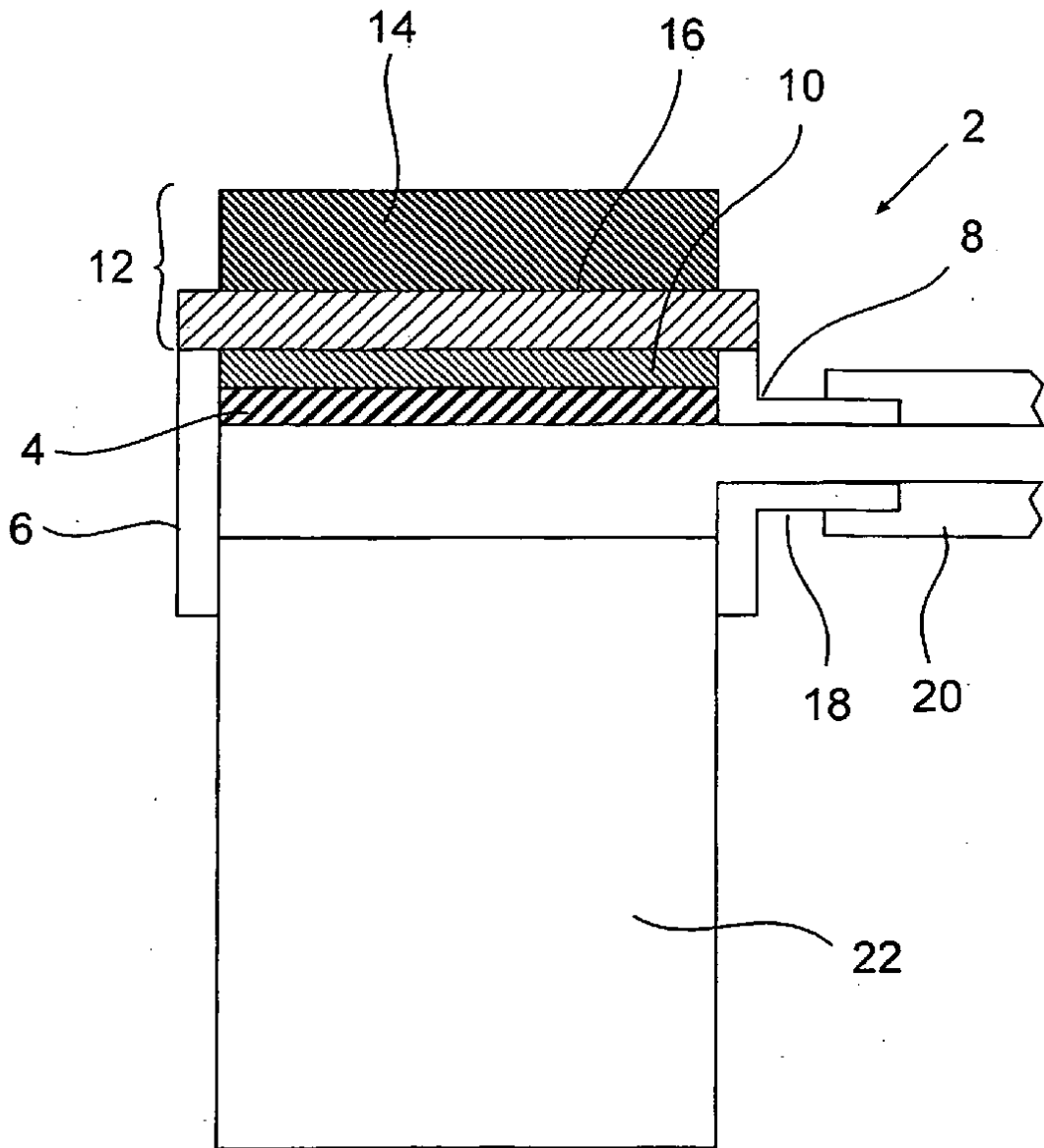


Figura 1

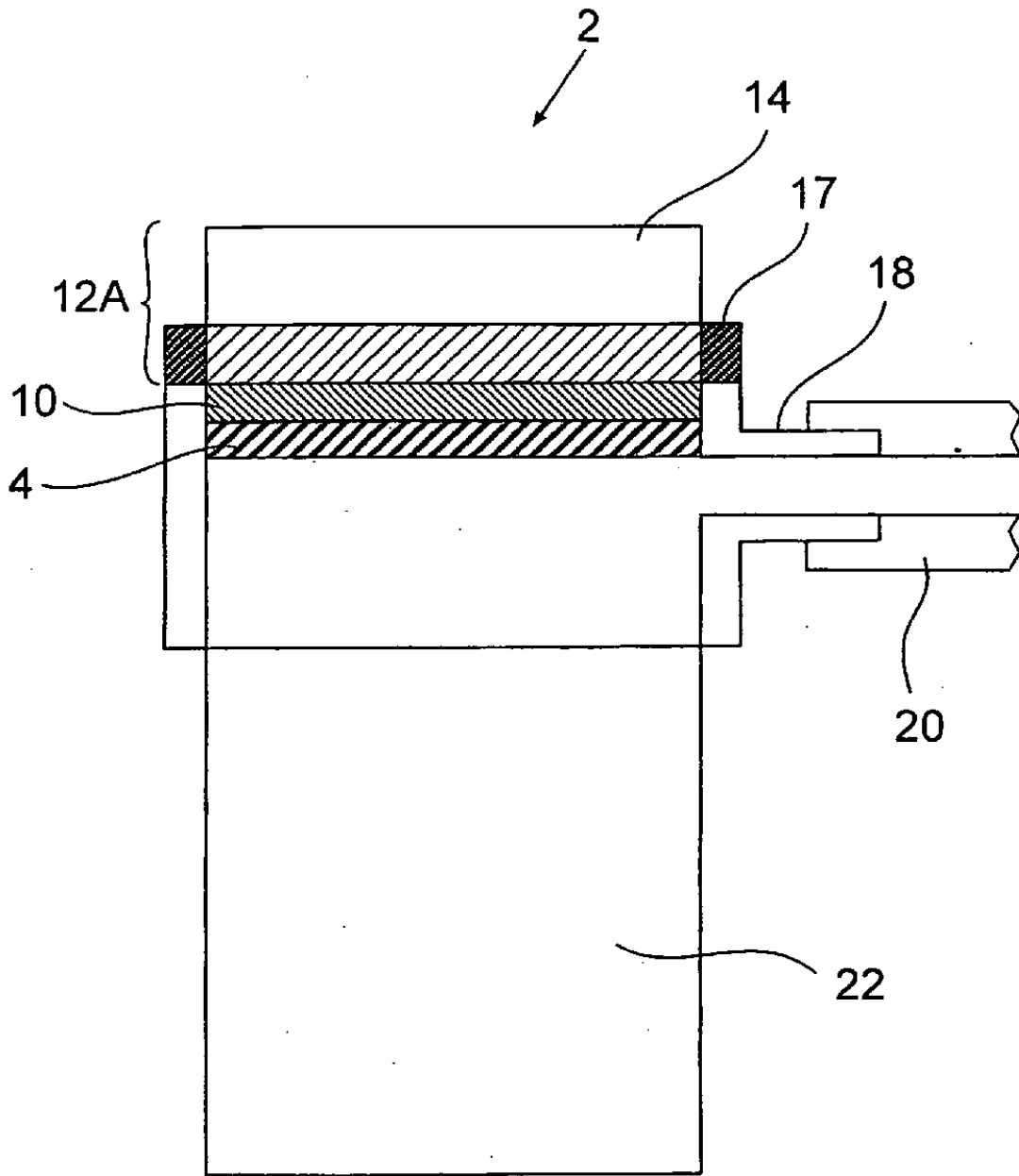


Figura 2

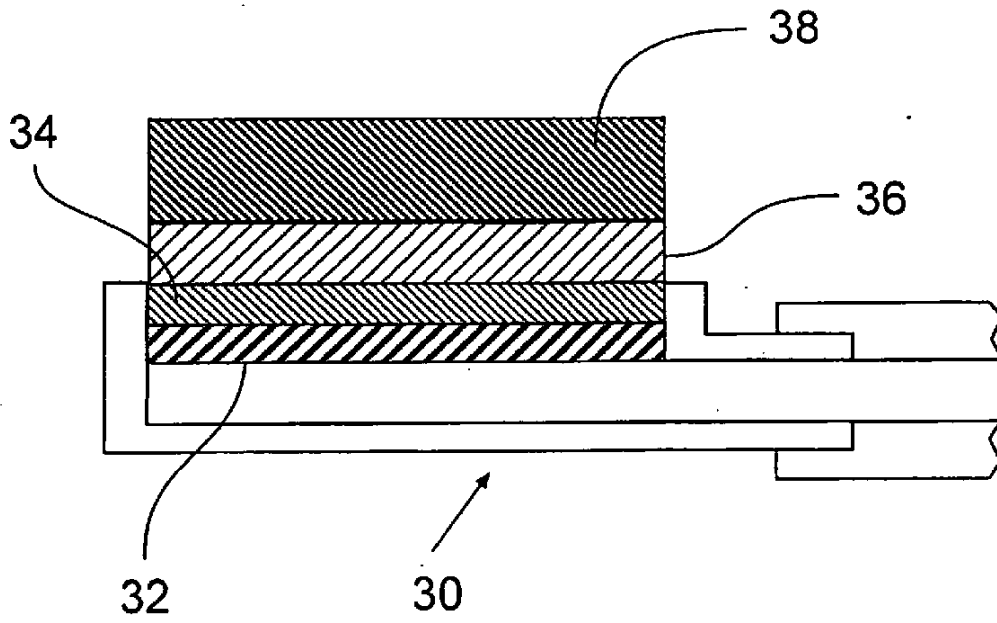


Figura 3

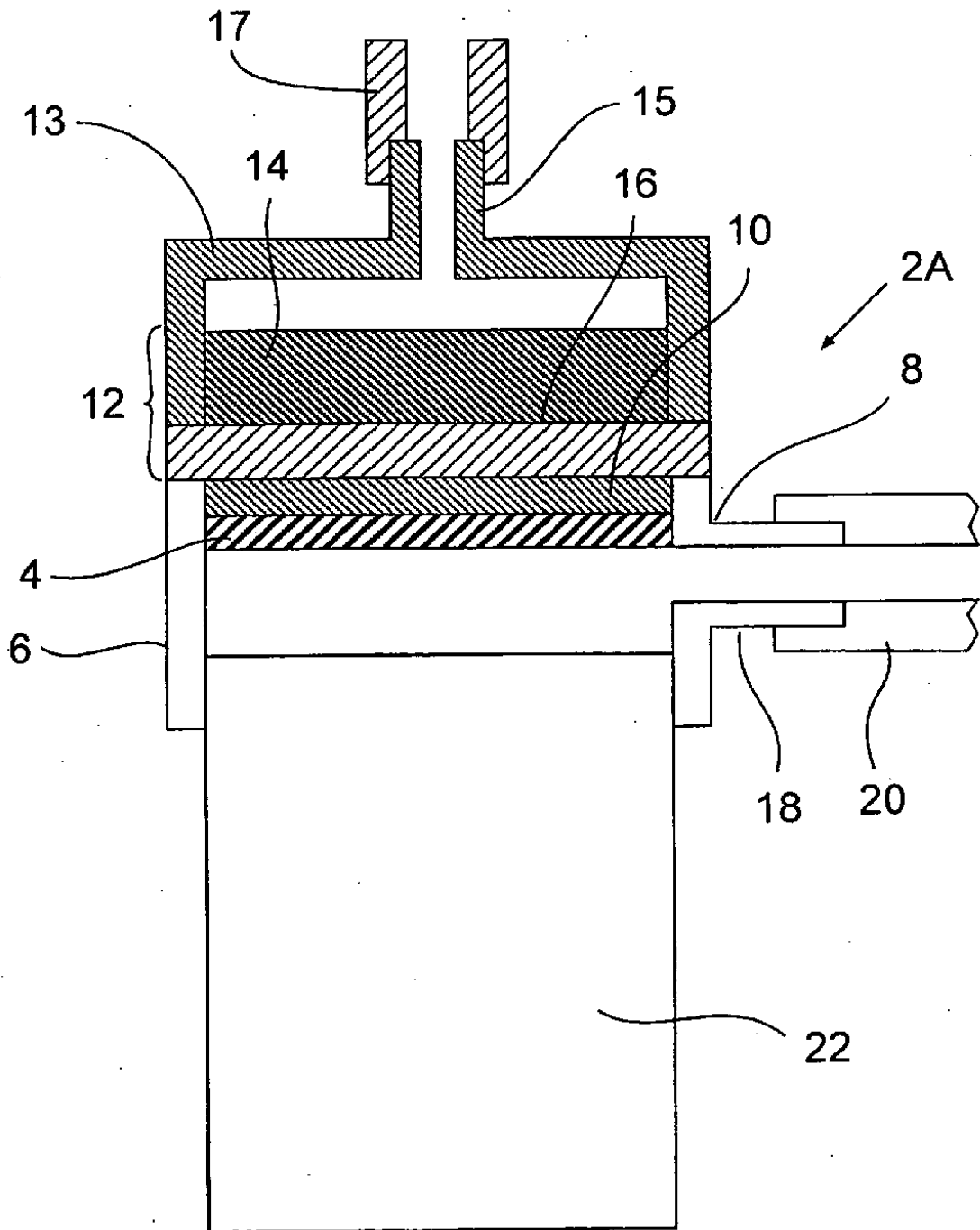


Figura 4

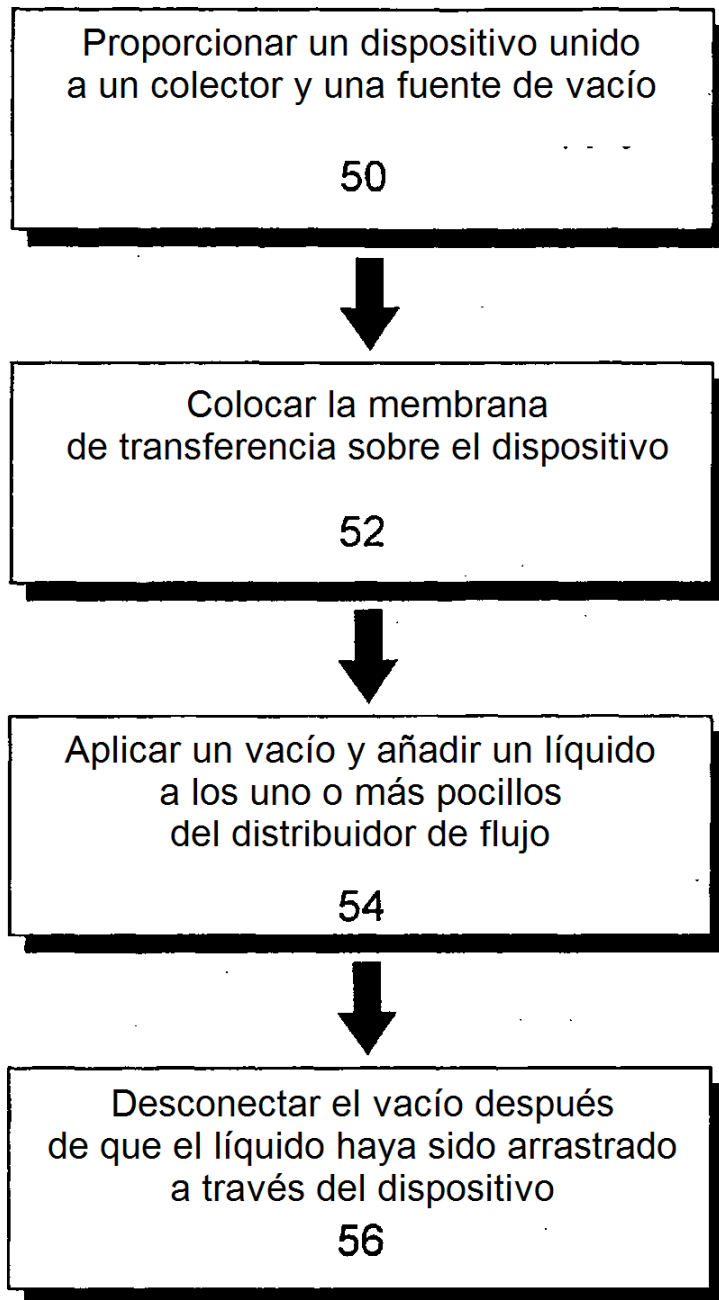


Figura 5A

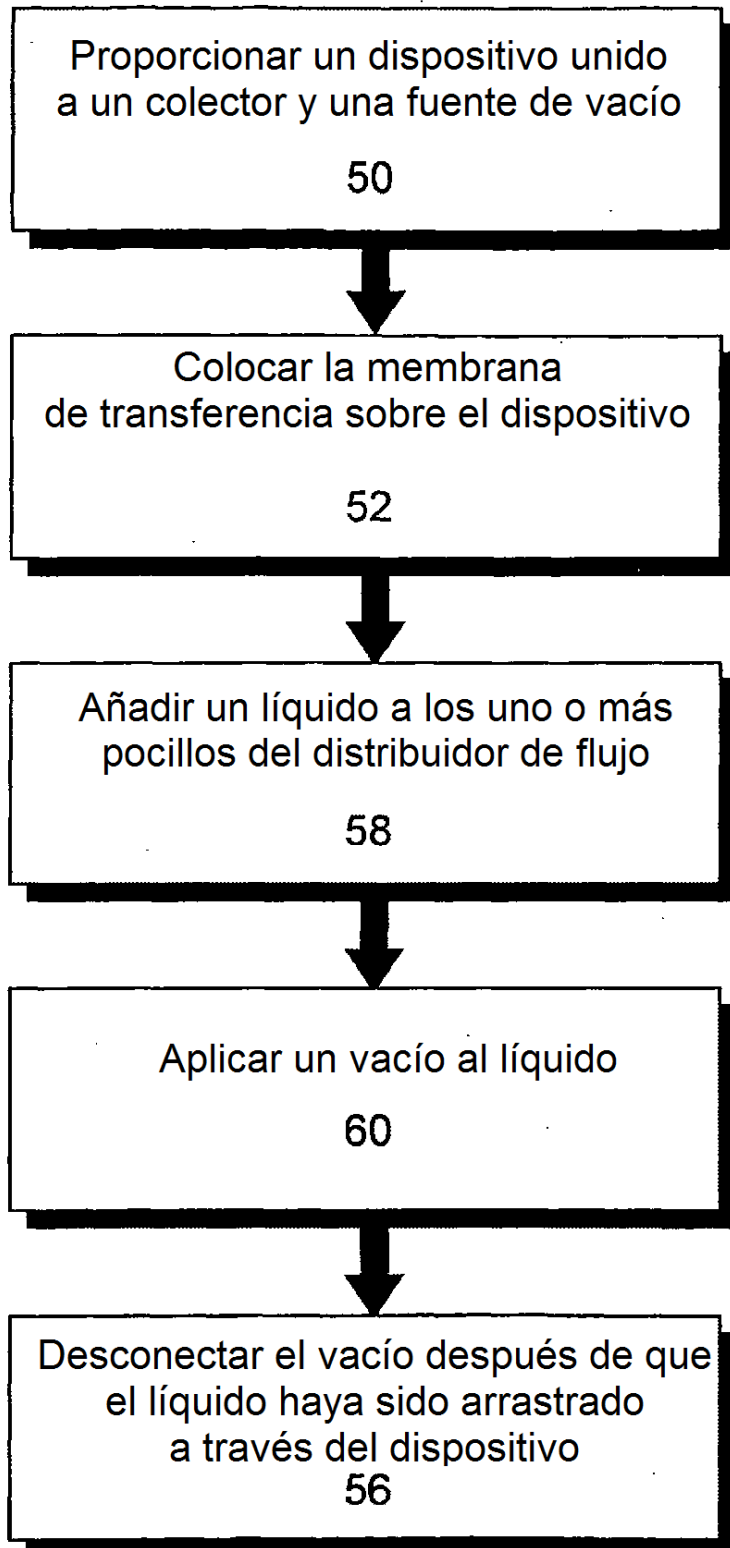


Figura 5B

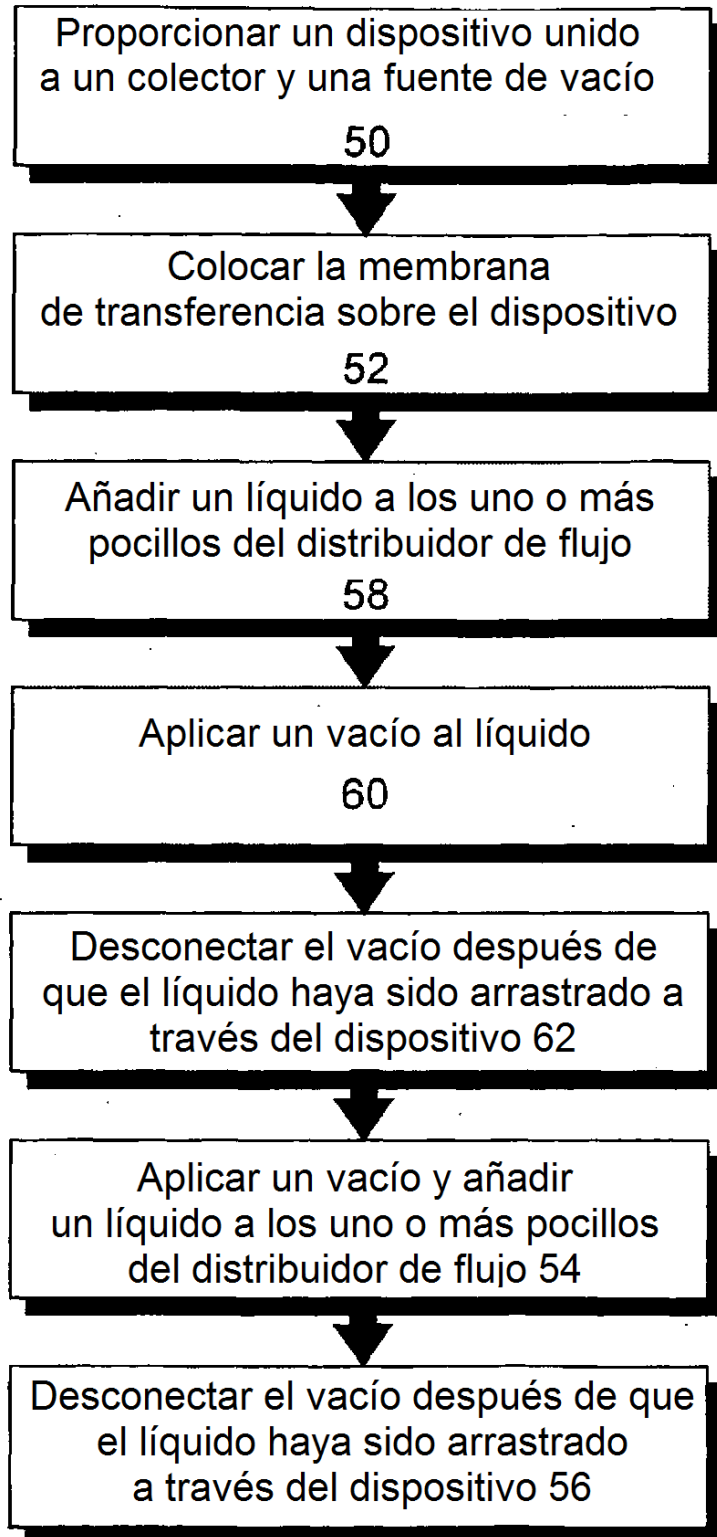
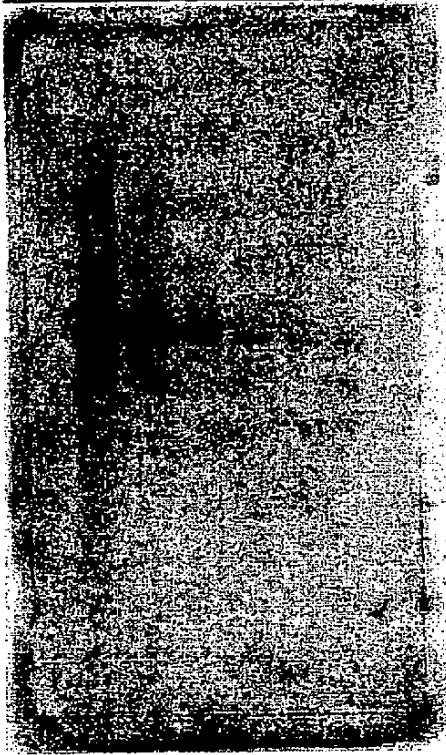


Figura 5C



Ejemplo



Ejemplo Comparativo

Figura 6