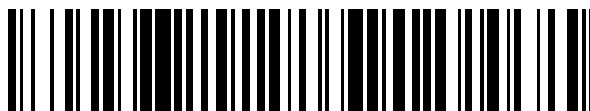


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 401**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01D 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2006 E 09153124 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 2072135**

54 Título: **Procedimiento de inmunoensayo**

30 Prioridad:

27.04.2006 US 795452 P

27.04.2006 US 795532 P

03.11.2005 US 732994 P

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

02.09.2013

73 Titular/es:

EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)

290 CONCORD ROAD

BILLERICA, MA 01821, US

72 Inventor/es:

MABUCHI, MASAHARU;

KIMURA, HIROKO;

EMERICK, MARK;

CLARK, PHILLIP y

GREENIZEN, KURT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 421 401 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

Procedimiento de inmunoensayo

5 La invención se refiere a un dispositivo y un procedimiento para la detección y la colocación de sustancias que están contenidas en una membrana de transferencia. Más particularmente, se refiere a una técnica para aplicar reactivos y soluciones de lavado a una membrana de transferencia para llevar a cabo rápidamente esta detección mediante el uso de vacío o presión positiva.

La presente invención es como se reivindica en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 La utilización de gel de electroforesis es actualmente la técnica omnipresente para la separación de materiales biológicos. Los materiales no biológicos también se pueden separar usando geles u otros soportes cromatográficos, pero el alcance del esfuerzo respecto de los productos biológicos es mayor. Las aplicaciones típicas incluyen la separación de fragmentos de ácido nucleico de diversas dimensiones, bien en el contexto de la determinación de secuencia, en la detección de polimorfismo, o bien en la verificación de dimensiones en otros contextos. También se
15 llevan a cabo frecuentemente separaciones de proteínas, glicoproteínas, fragmentos de proteínas y la aplicación de separaciones de gel como verificación de la homogeneidad o la pureza, la identificación de modificaciones de post-traducción y la confirmación del peso molecular.

20 En todos estos procedimientos, las muestras mezcladas de entidades biológicas se aplican a geles electroforéticos y los componentes se separan por la aplicación de un campo eléctrico a través del gel. Con independencia de la manera en que se desarrolla el gel, se debe detectar de alguna manera el modelo resultante de migración de las sustancias contenidas en la muestra.

25 Para llevar a cabo esta detección, típicamente el soporte de gel se pone en contacto con una membrana de transferencia, a la cual se han transferido las sustancias en el mismo modelo en el que aparecen sobre el gel. Se detectan entonces los "puntos", a un nivel mínimo, bloqueando la membrana con una proteína o una solución detergente para reducir la unión no-específica (que de otro modo conduce a un nivel elevado de ruido y un nivel bajo de detección). Los agentes de bloqueo típicos incluyen (generalmente aproximadamente el 1-5%) en solución salina con tampón tris con tensioactivo TWEEN® (solución TBS-T) o solución salina con tampón fosfato con tensioactivo TWEEN® (solución PBS-T). La entidad biológica se incuba entonces con un anticuerpo específico para el antígeno sobre la membrana. La membrana se lava entonces exhaustivamente para eliminar cualesquiera contaminantes, proteínas de bloqueo no unidas o anticuerpos no-unidos y similares. Entonces la membrana se trata e incuba con un anticuerpo secundario conjugado con enzima, radioisótopo, fluorófluor o biotina específico para el anticuerpo primario. A continuación la membrana se vuelve a lavar exhaustivamente para eliminar cualquier anticuerpo secundario no-unido. A continuación, se aplica un reactivo de detección, generalmente un material cromogénico, quimioluminiscente, fluorescente, radiológico o marcado con estreptavidina, lo cual se une a, o es un sustrato del conjugado de enzima. Finalmente, el dispositivo de detección apropiado se usa para determinar la presencia, ausencia, posición, cantidad, etc. de la entidad biológica. Las últimas seis etapas llevan generalmente de 3 a 6 horas a una noche dependiendo de la velocidad de la reacción entre los reactivos seleccionados, la membrana y la entidad biológica. El procedimiento requiere múltiples periodos de incubación de la membrana sobre una plataforma oscilante u otra plataforma de mezclado apropiada. Es un procedimiento largo que no gusta a la mayoría de los investigadores y que consume (gasta) un gran volumen de reactivos.

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

45 El documento US 5.155.049 menciona un sistema denominado cámara de hibridación Hybrid-Ease™ comercializado por Hoefer Scientific Instruments. Esta cámara está constituida por dos rejillas entre las cuales está cogida en sándwich la membrana. Las placas de rejilla se colocan en posición rodeando la membrana, y las jeringas se montan dentro del espacio creado por las rejillas. Se usa una jeringa para aplicar reactivos y lavar, y la otra para retirar el sobrante. El sistema requiere grandes volúmenes de líquido para funcionar, es incómodo de emplear y sigue consumiendo demasiado tiempo. También menciona que en algunos ensayos particulares, tales como ensayos ELISA, en pocillos de pequeño volumen (tales como placas de microtitulación 96), otros han usado vacío para extraer líquidos a través de una membrana en una etapa de lavado. Sin embargo descartan esta etapa, ya que solamente está disponible en aplicaciones de pequeño volumen y sigue siendo incontrolable. Sugieren en su lugar que el mejor procedimiento es usar una prensa manual que tiene la membrana en la parte superior de un filtro de papel y una capa de cobertura y a continuación prensar el emparedado de membrana entre dos placas para exprimir el líquido a través de la membrana y dentro del papel.

55 En el documento USSN 60/732.994, presentado al 3 de noviembre de 2005, se sugiere el uso de un dispositivo formado por diversas capas que incluyen una capa de soporte porosa por debajo de una o más capas de membrana de transferencia, un distribuidor de flujo por encima de la(s) membrana(s) de transferencia y un pocillo sobre el distribuidor de flujo para contener el líquido en el área deseada y permitir menores volúmenes de partida de tal líquido. Preferiblemente, el distribuidor de fluido es una membrana porosa de no-unión o de baja unión, tal como una membrana de 0,22 micrómetros. Las capas del dispositivo se ensamblan en orden y a continuación se someten a vacío o una filtración por presión para lavar y detectar las entidades biológicas sobre la membrana.

60 Es evidente que se requiere un procedimiento más eficaz para la detección de los materiales o entidades biológicas sobre membranas de transferencia. La presente invención permite una detección más efectiva y más eficaz de entidades biológicas en una membrana de transferencia.

El documento EP 0 312 394 describe inmunoensayos con soporte de membranas, que tienen una membrana y usan una submembrana y un prefiltro por debajo de la membrana.

Sumario de la invención

5 En una realización, la invención se refiere a un aparato útil para la realización del procedimiento de la invención. El dispositivo está constituido por un medio portador de membrana de transferencia formado por una capa de soporte poroso inferior y un distribuidor de flujo superior. Ambos se mantienen juntos mediante un procedimiento tal como por bisagra, pinzas, cintas elásticas, adhesivos, rótulas, husillos y recesos, o dispositivos de fijación cooperativa u otros medios de este tipo. El medio portador se abre y una o más membranas de transferencia se colocan entre las capas inferior y superior. El medio portador se sella entonces y se coloca bien sobre un colector o dentro de un aparato especial (descrito más adelante) para procesar las muestras sobre la membrana de transferencia. En una realización, el distribuidor de flujo tiene un perímetro exterior que se extiende hacia arriba desde el distribuidor de flujo para formar un pocillo para contener reactivos y fluidos de lavado.

10 En otra realización, el pocillo y el distribuidor de flujo están subdivididos en dos o más subpocillos para discurrir en paralelo a las membranas de transferencia o subpartes de una membrana de transferencia, cada membrana se procesa típicamente con al menos un reactivo diferente.

15 En otra realización, el distribuidor de flujo es una membrana porosa de no-uniión o baja uniión, tal como una membrana de 0,22 micrómetros.

20 En otra realización, una capa plegable porosa, tal como un filtro de papel o papel de vidrio, se coloca por debajo de la membrana de transferencia y por encima del soporte poroso para que, de este modo, cuando la membrana del distribuidor de flujo se fija contra la membrana de transferencia, la capa plegable se deforme para garantizar un acoplamiento completo y un flujo uniforme entre la membrana de transferencia y el distribuidor de flujo.

En otra realización, el medio portador tiene una pared solidaria formada por encima por encima del distribuidor de flujo para contener reactivos y/o fluidos de lavado durante el procesamiento de los mismos.

25 Otras realizaciones incluyen un colector de presión o de vacío destinado a retener el soporte y llevar a cabo las etapas de filtración. En una realización, se coloca un dispositivo de pocillo separado adyacente a la parte superior del distribuidor de flujo, bien directamente o a través de contacto cuando la tapa del colector está cerrada. En otra, el pocillo se forma solidariamente sobre la parte superior del distribuidor de flujo.

30 En otra realización, se proporciona un procedimiento rápido, eficiente y apropiado para detectar una o más entidades biológicas sobre una membrana de transferencia. La detección se puede relacionar con la posición, naturaleza o cantidad de sustancia biológica sobre una membrana. El procedimiento de la invención comprende un régimen asistido por presión, seleccionado a partir de presión positiva o vacío para el suministro o la eliminación de reactivos a y desde la membrana de transferencia, y permite el lavado de los contaminantes de las sustancias embebidas en la membrana que se han de detectar usando volúmenes muy bajos de líquido y reactivos. Este procedimiento permite llevar a cabo las etapas de bloqueo, lavado y unión de anticuerpos en aproximadamente 30-45 minutos sin comprometer la calidad de la transferencia. Se toma simplemente un medio portador, se abre y se coloca la(s) membrana(s) de transferencia sobre una de las superficies, de manera que la superficie inferior de la membrana de transferencia sea adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la membrana de transferencia sea adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo está cerrado alrededor de la (s) membrana(s). El dispositivo se coloca sobre o en un colector que tiene un suministro de presión o vacío y se empieza el procedimiento.

35 40 Un objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión o vacío, que comprende un medio portador para una o más membranas de transferencia formadas por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos.

45 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un aparato para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión o vacío, que comprende un medio portador para una o más membranas de transferencia formadas por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen amoviblemente juntos, teniendo el distribuidor de flujo una pared que se extiende hacia arriba desde su superficie superior, que forma uno o más pocillos de reactivos sobre la parte superior del distribuidor de flujo.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío de una o más membranas de transferencia, que comprende un colector de vacío y un medio portador para una o más membranas de transferencia formado por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos.

55 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un aparato para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión o vacío de una o más transferencias, que comprende un colector de vacío y un medio portador para procesar las transferencias y un medio para recoger uno o más anticuerpos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por presión positiva que comprende un colector, un medio portador para una o más membranas de transferencia, estando el medio portador formado por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos y un dispositivo de presión positiva montado amoviblemente sobre la parte superior del distribuidor de flujo.

60 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío sobre una o más membranas que comprende las etapas de:

- 5 a- proporcionar un colector de vacío, un medio portador para una o más membranas de transferencia formado por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos, una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas a ensayar, estando la(s) membrana(s) colocadas sobre el soporte poroso, estando un distribuidor de flujo sobre la parte superior de la membrana y uno o más pocillos colocados sobre la parte superior de la parte de distribuidor de flujo del medio portador;
- b- añadir uno o más reactivos al o los pocillos y aplicar vacío para extraer los reactivos de la membrana, y
- c- añadir uno o más agentes de lavado al o los pocillos y aplicar vacío para extraer los agentes de lavado y cualquier reactivo no-unido a través del distribuidor de flujo, la membrana y el soporte poroso y dentro del colector de vacío, y
- 10 d- repetir las etapas (c y c) una o más veces según se desee o se requiera.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para hacer pasar un líquido de lavado o que contiene reactivos a través de una o más membranas de transferencia que contienen una o más entidades biológicas, debiéndose detectar al menos una de las ellas en el que el procedimiento comprende:

- 15 a- proporcionar un colector de vacío, un medio portador para una o más membranas de transferencia formado por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos,
- b- colocar una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas a ensayar sobre el medio portador, de manera que la superficie inferior de la(s) membrana(s) esté adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la(s) membrana(s) de transferencia sea adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo esté cerrado alrededor de la(s) membrana(s),
- 20 c- cerrar de manera segura el medio portador; y
- d- añadir un líquido a la parte superior del distribuidor de flujo, y aplicar vacío para extraer el líquido a través del distribuidor de flujo, la(s) membrana(s) de transferencia y el soporte poroso dentro del colector.

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para hacer pasar un líquido de lavado o que contiene reactivos a través de una o más membranas de transferencia que contienen una o más entidades biológicas, debiéndose detectar al menos una de ellas, en el que el procedimiento comprende:

- a- proporcionar un colector, un medio portador para una o más membranas de transferencia, formado por un soporte poroso y un distribuidor de flujo que se mantienen juntos,
- 30 b- colocar una o más membranas que contienen una o más entidades biológicas dentro del medio portador, de manera que la superficie inferior de la(s) membrana(s) esté adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la(s) membrana(s) de transferencia sea adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo esté cerrado alrededor de la(s) membrana(s),
- c- cerrar de manera segura el medio portador; y
- 35 d- añadir un líquido a la parte superior del distribuidor de flujo, y aplicar presión positiva al distribuidor de flujo para desplazar el líquido a través del distribuidor de flujo, la(s) membrana(s) de transferencia y el soporte poroso dentro del colector.

En los dibujos

- La figura 1 muestra una primera realización de un dispositivo según la presente invención en una vista en perspectiva.
- 40 La figura 2 muestra una segunda realización de un dispositivo según la presente invención en una vista en perspectiva.
- La figura 3 muestra un dispositivo según la presente invención montado en un colector en una vista en sección transversal.
- La figura 4 muestra una realización del dispositivo en un colector según la presente invención en una vista en perspectiva.
- 45 La figura 5 muestra una tercera realización de un dispositivo según la presente invención en una vista en perspectiva.
- La figura 6 muestra una cuarta realización de un dispositivo según la presente invención en una vista en perspectiva.
- 50 La figura 7 muestra una realización de un dispositivo de recogida de reactivos según la presente invención en una vista en perspectiva.
- La figura 8 muestra una realización preferida de un dispositivo en un colector según la presente invención en una vista en perspectiva.
- Las figuras 9A y B muestran otra realización del dispositivo de la presente invención.

La figura 10 muestra una realización del soporte poroso en una vista en perspectiva.

La figura 11 muestra una realización alternativa del soporte poroso en una vista en perspectiva.

La figura 12 muestra una realización de la presente invención en una vista en perspectiva.

Descripción detallada de la invención

5 Como se muestra en la figura 1, el medio portador 2 está constituido por dos partes. La primera o parte inferior es un soporte poroso 4. Preferiblemente el soporte poroso está formado por un borde 6 o pieza de montaje que está destinado a montarse dentro o sobre un colector 8 (figura 3). Una o más capas de membrana de transferencia (no mostradas) se colocan sobre la parte superior del soporte poroso 4, de manera que la superficie inferior de la(s) membrana(s) está en contacto con la superficie superior del soporte poroso. La segunda parte del medio portador 2 es un distribuidor de flujo poroso 10 que se aplica contra la parte superior de la(s) membrana(s) de transferencia (no mostrado).

10 Las partes superior 10 e inferior 4 están fijadas preferiblemente la una a la otra al menos durante su uso, para mantener la o las membranas de manera segura en su sitio. Como se muestra en las figuras 1 y 2, las dos partes 4 y 10 del medio portador 2 se mantienen juntas mediante una bisagra 16. Como se muestra en esta realización, la bisagra es una bisagra "viva" que une las dos partes juntas. Alternativamente, la bisagra podría fabricarse por separado y unirse usando adhesivos, termouniones o dispositivos de fijación mecánicos. Otras realizaciones no utilizan bisagra (no mostrado) y usan pinzas, cintas elásticas o dispositivos de fijación cooperativa tales como ranura y retén, patilla de ajuste por fricción o similar sobre o en las partes inferior y superior respectivas para mantenerlas juntas durante su uso. Otros medios comparables serán evidentes para el experto en la técnica y se entiende que también los incluye.

15 De forma opcional y preferente, el distribuidor de flujo 10 puede tener uno o más pocillos 12 para contener fluidos de lavado y reactivos durante su uso. En la Figura 5 el medio portador 2 se muestra con dos pocillos 12. Los pocillos 12 pueden estar conformados como parte de la superficie superior 14 del distribuidor de flujo 10 (Figura 2) o como una pieza separada 12 (Figura 3) que sencillamente está unida o colocada sobre la parte superior del distribuidor de flujo 10.

20 En la figura 6 se representa otra realización del medio portador. Es un conjunto constituido por películas finas tales como de plástico o papel. Debería ser suficientemente grueso para ser autoportante y suficientemente fino para plegarse. El medio portador 2 es una película que tiene un espesor de 0,012 cm (0,005") a 0,152 cm (0,060"). La película tiene una línea de pliegue 20 que discurre a lo largo del ancho del medio portador 2. La película tiene dos aberturas que se alinean cuando el medio portador se pliega en posición cerrada. El recubrimiento de una abertura se hace con la membrana del distribuidor de flujo 10 y el recubrimiento de la otra abertura se hace con un soporte poroso 4. Exteriormente y circunscribiéndose a la abertura de soporte poroso hay un material de estanqueidad o unión 19, tal como un adhesivo resellable. El material de unión 19 mantiene el medio portador junto durante su manipulación y su uso. Sería evidente para el experto en la técnica que el medio portador 2 se pudiese construir con dos películas y que tuviese un material separado tal como una película posterior adhesiva que proporcione la función de la línea de pliegue 20.

25 Como se muestra en la figura 3, el colector 8 en esta realización es un colector de vacío que tiene un orificio 18 que se fija a una fuente de vacío 20. Alternativamente, se puede usar una presión positiva en lugar de vacío para llevar a cabo el procedimiento de filtración/lavado, colocando simplemente una campana de presión que tiene un suministro de aire presurizado u otro gas sobre la parte superior del medio portador 2 (En esta realización, el orificio 18 actúa simplemente como una salida para el aire/gas presurizado). El orificio 18 se sitúa por debajo del soporte poroso 32. Un dispositivo de recogida de desechos 22, en este caso, un receptáculo, se monta por debajo del colector o si se desea en el colector (no mostrado) para recoger el líquido extraído a través del dispositivo 2.

30 Alternativamente, el dispositivo de recogida de desechos 22 puede ser un sumidero de desechos u otro dispositivo similar que es conocido para el experto en la técnica. En este caso, el medio portador 2 se forma por una estructura de soporte porosa 32, tal como una rejilla de plástico o metálica o una lámina sinterizada porosa de plástico o metálica u otros dispositivos similares, igualmente bien conocidos en la técnica. La o las membranas de transferencia 34 se colocan de nuevo sobre la parte superior del soporte 32, sobre la cual está el distribuidor de flujo 36 y una estructura de pocillo 38 (si se desea), descrita anteriormente con relación a las realizaciones de la figura 2. La figura 8 muestra el medio portador de la figura 2 montado sobre un colector descrito más adelante con relación a la figura 4.

35 La figura 4 muestra una forma preferida de un colector 40. El colector tiene una base 42, que tiene un sumidero y una superficie de soporte 44 sobre la cual se coloca el medio portador 46 (formado por el soporte inferior 48 y el distribuidor de flujo superior 50). Como se muestra, el medio portador usa una bisagra 51 para mantener las partes superior e inferior la una respecto de la otra. Una o más membranas se insertan entre las partes inferior y superior del medio portador 46 que a continuación se cierra. Fijada a la base 42 se encuentra una tapa amovible 52. En esta realización la tapa 52 se fija a la base 42 mediante puntos de pivote 53 (se muestra uno), de manera que se puede abrir y cerrar hacia arriba y con rotación respecto de la base 42. Se puede montar un pocillo 54 separado en una abertura 55 en la tapa 52. Preferiblemente según se muestra, la parte inferior del pocillo 54 tiene una base de extensión exterior o labio 56 que mantiene el pocillo 54 en la abertura 55. Además, el pocillo 54 se puede dimensionar de tal manera que haya un ligero ajuste de fricción entre el pocillo 54 y la abertura 55 para mantenerlo también en posición. La tapa 52 también tiene un dispositivo tal como la pinza 58, que se acopla con un retén 60 sobre la base 42 para de este modo poder asegurar la tapa 52 a la base 42 cuando se gira la tapa 54 en una posición cerrada contra la base 42. Se muestran también los controles opcionales 62 para controlar y vigilar el colector 40 y el procedimiento. El dispositivo se puede usar con manipuladores automatizados de líquido y similares si se desea.

En una realización adicional, como se muestra en la figura 12, el colector 90 puede procesar más de un soporte 94. La base 93 se puede diseñar con múltiples estaciones 92 para posicionar múltiples medios de sujeción 94. Igualmente, como se muestra en esta realización, el medio portador 94 en cada estación 92 se puede subdividir en dos o más pocillos 98 si se desea. El colector 90 puede tener una fuente de presión común o cada estación 92 se puede controlar en presión individualmente, tal como con los mandos de control 96 mostrados. La tapa 100 puede cerrarse sobre todos los medios de sujeción o como en esta realización puede tener una tapa separada para cada estación 92. Este formato minimiza el espacio de banco de laboratorio usado para los de mayor producción.

El distribuidor de flujo 10 es una estructura porosa. El distribuidor de flujo no proporciona solamente distribución de líquido regular sino que actúa también como regulador de flujo. Proporciona una distribución completa y uniforme de los líquidos permitiendo también un tiempo de residencia suficiente en la membrana para una interacción adecuada entre las moléculas del líquido y la muestra. En una realización, toda la estructura es porosa. En otra realización, tal como se puede usar conjuntamente con la realización de la figura 2, el distribuidor de flujo 10 solamente es poroso en el área dentro del o los pocillos 12. El área 16 del distribuidor 10 que no es poroso se puede transformar así llenando los poros en el área 16 con un material no poroso, tal como plástico o cola, colapsando los poros en esa área 16 con calor y/o formando el distribuidor 10 para hacer coincidir el formato de la dimensión exterior de o los pocillos 12, y sellar de manera estanca el distribuidor 10 al fondo del o los pocillos 10 a lo largo de su dimensión exterior (como se muestra en la figura 2).

El distribuidor de flujo 10 puede ser cualquier estructura porosa que proporciona distribución regular del líquido a través de su cara y que es suficientemente porosa para permitir un movimiento fácil bajo la influencia de un vacío o una presión, y que también puede filtrar aglomerados, partículas u otros residuos del líquido.

El distribuidor de flujo puede ser de cualquier dimensión deseada. Los geles vienen en diversas dimensiones "estándar", desde aproximadamente 7 x 8 cm a 20 x 20 cm de área. El distribuidor de flujo debería cubrir toda la membrana de transferencia para asegurar el flujo completo de reactivos a través de toda la membrana de transferencia.

Tales materiales incluyen pero no se limitan a filtros porosos tejidos, no-tejidos y fibrosos tales como papel TYPVEK® o TYPAR®, materiales celulósicos tales como filtros MF disponibles en Millipore Corporation de Billerica Massachussets, membranas tales como DURAORE® y membranas microporosas MILLIPORE EXPRESS® disponibles en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets, membranas sinterizadas tales como filtros POREX® y similar. Las membranas preferidas son especialmente membranas microporosas de plástico.

Una dimensión de poro preferida de tales membranas se encuentra entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,65 micrómetro, preferiblemente entre 0,2 y aproximadamente 0,45 micrómetro y más preferiblemente aproximadamente 0,22 micrómetro.

Además, la estructura porosa preferida tiene características de baja unión para los reactivos usados con el fin de minimizar la cantidad usada. Más preferiblemente, como se usa generalmente con materiales biológicos, es hidrófila y tiene características de unión a proteína. Tal distribuidor es una membrana hidrófila DURAPORE® formada por PVDF, disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets. Otra es una membrana de PES hidrófila de MILLIPORE EXPRESS®, disponible en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets.

El soporte poroso 4 puede ser un tamiz simple, una rejilla (como se muestra en las figuras 1 y 2), una rejilla de direccionamiento de flujo o una estructura porosa sinterizada, tal como una membrana POREX® o un filtro microporoso de poros bastos o grandes, tal como papel tejido o no-tejido, un tejido de polipropileno o polietileno, una manta de fibra de vidrio o papel, o un filtro microporoso de 1-10 micrómetros. Tales soportes se pueden realizar en materiales poliméricos, de vidrio, cerámicos o metálicos incluyendo pero no limitándose a metales, tales como acero inoxidable o aleación de acero, aluminio y similar, y polímeros tales como polietileno, polipropileno, polisulfona, polietersulfonas, estirenos, nylonos y similares.

La figura 10 muestra un soporte poroso en forma de una rejilla de direccionamiento de flujo 70 constituida por una serie de ranuras 72 y aberturas 74. Las aberturas 74 se posicionan hacia dentro desde el perímetro del soporte poroso 70. Las aberturas 74 están en comunicación fluida con las ranuras 72 de manera que el fluido se recoge en las ranuras 72 y se direcciona a través de las aberturas 74. Las ranuras 72 recogen y suministran el fluido usado a las aberturas 74 que dirigen el fluido a una cámara de desechos o la bandeja de recogida en el medio portador (colector) (no mostrado). Si el investigador desea recoger uno o más de los fluidos, entonces se puede posicionar una bandeja de recogida en el interior del colector por debajo de las aberturas 74 para recoger los fluidos usados. La figura 11 es una realización adicional de la rejilla 80 para direccionar fluidos usados dentro de las ranuras 82 y fuera de las aberturas 84. Esta realización consiste en una serie de ranuras rectangulares 82, sería evidente usar otros diseños para las ranuras 72 o 82 y las aberturas 74 o 84. El resultado deseado es dirigir los fluidos usados a una abertura o una serie de aberturas que direccionan el fluido usado a una bandeja de recogida.

Los bordes exteriores del soporte 4 y el distribuidor de flujo 10 se pueden fabricar en los mismos materiales que el soporte 4. Cuando se usa una bisagra solidaria, se debe fabricar en un material flexible tal como polietileno, polipropileno, un elastómero o uno de los materiales modificados de impacto tales como ABS, resina K y similar. Cuando se usa una bisagra separada, pinzas, cintas elásticas, película adhesiva u otros medios de fijación, se pueden fabricar en metal, plástico o elastómeros si se desea.

Las figuras 9A y 9B muestran otra realización de la presente invención en la que el distribuidor de flujo 110 está en forma de un único (mostrado) o preferiblemente múltiples formatos 101 de pocillo. El soporte 112 se forma en forma de una pieza 111 separada que se fija a la o las paredes del o los pocillos 114 del distribuidor 110. Esto puede ser un ajuste por fricción o preferiblemente un ajuste a presión para retener amoviblemente la estructura unida durante su uso. Alternativamente se pueden montar adhesivos tales como almohadillas adhesivas 114 (no mostradas) en el lado inferior del distribuidor 110 o la superficie superior de la pieza 111, que contiene el soporte 112, para

mantenerlos juntos. Una rejilla con una tobera 116 se sitúa en el fondo de la pieza 111 que contiene el soporte 112. Una membrana 118 descansa sobre la parte superior del soporte 112 que a continuación se fija al distribuidor de flujo 110. El dispositivo de pocillos 101 se coloca entonces sobre o en un colector de presión o vacío 120 con un dispositivo de recogida, tal como una bandeja de desechos o una placa multipocillos o una serie de uno o más tubos (mostrado) para recoger el fluido que se desplaza a través del sistema.

Se pueden usar diversos procedimientos en la presente invención. Siendo el factor clave el hecho de que dependen de una filtración llevada a cabo por vacío o presión positiva de los líquidos para acceder a la gran superficie interior de la membrana, que permite una interacción en 3D de todas las moléculas por toda la profundidad en lugar de solamente una interacción en 2D en la superficie como ocurría en el pasado.

El procedimiento más sencillo es usar la presente invención para llevar a cabo uno o más 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 el líquido necesita desplazarse a través de la membrana de transferencia tal como después de la incubación de los anticuerpos o en las etapas de lavado.

En todos estos procedimientos, se puede usar cualquier presión apropiada para desplazar el o los líquidos a través del dispositivo y dentro del colector. Esto puede variar en función de las membranas seleccionadas para la transferencia y el distribuidor de flujo, el colector usado, la velocidad deseada de filtración y el suministro de vacío o presión positiva disponible por el investigador.

En general, el vacío disponible puede variar entre 100 y 760 mm Hg (133 milibares y 1.013 milibares). También se pueden usar válvulas, limitadores de presión y similar para mantener el vacío dentro de los intervalos permitidos para las membranas usadas. Un colector de vacío preferido de una realización de la presente invención utiliza un vacío de aproximadamente 100 mm Hg (133 milibares). Otros colectores de vacío apropiados incluyen pero no se limitan a los colectores de vacío MULTISCREEN™ y MULTISCREEN™, disponibles en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets.

Generalmente la presión positiva se suministra mediante un conducto de aire a presiones que van de aproximadamente 2 psi (0,137 bares) a aproximadamente 15 psi (1,027 bares). También se pueden usar válvulas, limitadores de presión y similar para mantener la presión dentro de los intervalos permitidos para las membranas usadas. Tales sistemas de presión incluyen pero no se limitan a dispositivos de células agitadas Amicon® disponibles en Millipore Corporation de Billerica, Massachussets y unidades de filtración por presión positiva disponibles en Caliper Life Sciences de Hopkinton, Massachussets.

Para usar un dispositivo según la invención se coge simplemente el medio portador, se abre y se coloca la o las membranas de transferencia sobre una de las superficies, de manera que la superficie inferior de la membrana de transferencia sea adyacente al soporte poroso y la superficie superior de la membrana de transferencia sea adyacente al distribuidor de flujo cuando el dispositivo se cierra alrededor de la o las membranas, para de este modo no tener ninguna burbuja de aire entre la transferencia y el distribuidor de flujo. Las burbujas entre estas dos superficies pueden producir áreas de sin flujo. El dispositivo se coloca sobre o en un colector que tiene un suministro de presión (vacío o presión positiva). Preferiblemente la o las membranas de transferencia se ha(n) prehumedecido. La presión (vacío o presión positiva) se activa y un líquido, tal como un líquido de lavado o un reactivo, se coloca en la parte superior del distribuidor de flujo o dentro del o los pocillos si se usan. La presión sigue hasta que el líquido se ha desplazado a través del dispositivo y la o las membranas. A continuación se desactiva la presión.

Cuando se usa más de una membrana de transferencia, se pueden disponer en serie sobre la parte superior de cada una y se puede desplazar suficiente líquido, que contiene los mismos reactivos deseados, a través de las múltiples capas en una etapa del procedimiento. Generalmente, cuando se usa más de una capa, se prefiere usar entre 2 y 10 capas, preferiblemente entre 2 y 5 capas a la vez. Alternativamente, se puede usar un distribuidor de flujo que tiene múltiples subpocillos y se usa más de una membrana de transferencia en paralelo la una a la otra, cada una con su propio pocillo en el distribuidor de flujo, y cada una con su propio juego de reactivos, como se requiere para su fin específico. Igualmente se pueden montar dos o más medios de sujeción separados, cada uno con uno o más subpocillos. Se pueden incluso usar múltiples capas en pocillos adyacentes, si se desea. Con dos o más medios de sujeción separados, pueden, si se desea, funcionar independientemente el uno del otro o juntos.

El líquido se puede añadir bien con el suministro de presión desactivado o con el suministro solamente activado brevemente, para de este modo conseguir el líquido dentro de la o las membranas, y se deja incubar (tal como se puede requerir con los anticuerpos primarios o secundarios). La presión se activa entonces para eliminar el líquido y/o sustituirla con otra usada secuencialmente. Preferiblemente durante los lavados, el vacío se deja activo y se añaden los lavados restantes secuencialmente.

Opcionalmente, si se desea, se puede colocar un recipiente de recogida 70 por debajo del dispositivo, preferiblemente en el propio colector o corriente abajo. Entonces se puede usar para recoger uno o más reactivos no-unidos que pueden ser caros y que se puede recoger y reciclar para su uso en futuros ensayos. El recipiente se puede también subdividir en múltiples cámaras que están alineadas y en comunicación fluida con la parte respectiva de la membrana de transferencia. Tal recipiente de recogida 70 se muestra en la figura 7, con un punto de recogida central 72 y una nervadura de soporte 74 para acoplarse con la superficie corriente abajo del soporte 4. También se pueden usar otras realizaciones.

Además, o alternativamente, se puede colocar en el recorrido de flujo corriente abajo por debajo del medio portador una matriz absorbente, que es capaz de unir reversiblemente uno o más reactivos no-unidos que son caros. La matriz se prefiere en forma de monolito, tal como una almohadilla, un tapón o una hoja de papel, que se posiciona para que todo el líquido pase a través de la membrana de transferencia y el medio portador pase a través de la

matriz. Entonces se puede o bien retirar y el reactivo eluirse o, si se desea, se pueden unir los reactivos eluidos in situ después de terminar el ensayo de la membrana de transferencia.

Se pueden usar también otros procedimientos con el dispositivo de la presente invención.

5 La membrana contiene, en sus intersticios, una o más sustancias a detectar. Generalmente, estas sustancias están presentes en los intersticios bien gracias a haber sido transferidas desde un soporte sólido por electroforesis o cromatografía o por aplicación directa, normalmente para detectar la presencia, ausencia, o la cantidad de un tipo particular de material tal como un anticuerpo o una proteína específica, es decir, un ensayo de tipo transferencia puntual descrito anteriormente. La definición de la membrana no se limita, sin embargo, a estos casos, sino que se aplica a cualquier caso en el que una membrana contiene en sus intersticios una o más sustancias a detectar.

10 Incluidas en los tipos de membranas previstas para su uso en la presente invención se encuentran las membranas comúnmente usadas para geles de electroforesis de transferencia, tales como nitrocelulosa; nylon; o diversas otras membranas poliméricas, tales como fluoruro de polivinilideno (PVDF), vendido como membranas IMMOBILON™ por la Millipore Corporation de Billerica, Massachussets.

15 Se pueden usar diversos materiales para replicar los resultados de geles de electroforesis llevados a cabo sobre diversas muestras como se entiende en la técnica. Más comúnmente, las muestras contienen sustancias biológicas tales como proteínas individuales, anticuerpos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, carbohidratos complejos y similar, pero la aplicación de la técnica no se limita a estas sustancias. La técnica de la invención se puede aplicar a cualquier membrana que contenga en su seno una sustancia a detectar sin tener en cuenta la composición química de la membrana o las sustancias diana.

20 Cuando se emplean membranas que representan réplicas de resultados electroforéticos, la transferencia de las sustancias a detectar desde el gel a la membrana se puede llevar a cabo utilizando membranas que contienen tampón de transferencia, por electroelusión, o por transferencia de los geles. Las técnicas para estas transferencias se entienden bien en la técnica, y no forman parte de la presente invención.

25 El líquido a suministrar puede contener reactivos de detección o puede simplemente ser proporcionado como líquido de lavado. La naturaleza del reactivo de detección depende, por supuesto, de la sustancia a detectar. Típicamente, las proteínas son detectadas por reacciones inmunológicas entre antígeno y anticuerpo o partes inmunoreactivas de los mismos; típicamente, la presencia de fragmentos de ácido nucleico se detecta por sondas de oligonucleótidos apropiada. Las sustancias de detección responsable de la reacción inmediata o específica con la sustancia a detectar se puede, además, suplementar, si fuese necesario, con una etiqueta y puede ser necesaria una multiplicidad de aplicaciones de los reactivos de detección, por ejemplo, un protocolo puede incluir la detección de un antígeno suministrando un antígeno marcado con una enzima, por ejemplo, comúnmente peroxidasa de rábano, y a continuación se detecta esta unión mediante el suministro de sustrato para esta enzima.: En la aplicación de reactivo, es posible, aunque no preferible, usar solamente una matriz donante prensada positivamente para exponer este componente de la membrana durante un periodo definido.

30

35 Es más apropiado llevar a cabo el procedimiento de la invención a temperatura ambiente, pero se pueden usar también temperaturas elevadas y más bajas. Esto se puede efectuar calentando el dispositivo, su entorno circundante (como en una caja de calor o caja de enfriamiento) o los líquidos usados en el sistema.

40 Las transferencias se pueden analizar secuencialmente con múltiples anticuerpos o sondas en el presente dispositivo y el presente procedimiento eliminando los anticuerpos previamente unidos de la transferencia seguido de las posteriores incubaciones con anticuerpos u otras sondas específicas distintas de las proteínas diana. El procedimiento de eliminación de anticuerpos interrumpe las uniones de antígeno-anticuerpo y disuelve los anticuerpos en el tampón circundante. Se lleva a cabo usualmente mediante una combinación de detergente y calor o por exposición a pH alto o bajo. El dispositivo, en combinación con el distribuidor de flujo, permite la eliminación de transferencias usando el procedimiento de pH alto o bajo. La posterior redetección de membranas de transferencia bien directamente (por ejemplo usando el mismo distribuidor de flujo usado para la eliminación) o posteriormente después del almacenamiento, usaría el mismo protocolo que el sondeo inicial. Los kits apropiados para transferencias de bandas están disponibles en Chemicon International, Inc con los nombres comerciales de ReBlot™ Plut Kit (catálogo # 2502), ReBlot Plus-Mild solution (catálogo # 2502) y ReBlot Plus-strong solution (catálogo # 2504).

45

50 En la transferencia de western estándar, el antígeno o diana se transfiere a un soporte de membrana y se detecta con una sonda, tal como un anticuerpo, proteína (por ejemplo Proteína A) o lectina (proteínas o glicoproteínas que se unen a residuos de carbohidrato). En algunas aplicaciones se usa un formato inverso (por ejemplo sistema inverso), en el que el anticuerpo u otras sondas se manchan sobre una membrana u otro soporte (típicamente en un formato de sistema) y el antígeno o diana se presenta a los anticuerpos inmovilizados sobre el sistema. La visualización de un evento de unión diana-sonda se puede llevar a cabo marcando los antígenos o dianas, o usando un anticuerpo secundario específico para la diana. Los sistemas inversos emplean a menudo mezclas de dianas, por ejemplo lisatos marcados con diferentes colores fluorescentes para permitir el procesamiento paralelo. Los ensayos inversos se pueden llevar a cabo también con la presente invención.

55

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para llevar a cabo inmunoensayos asistidos por vacío sobre una o más membranas que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar un colector de vacío, un medio portador (2) para una membrana de transferencia formado por un soporte poroso (4) que soporta una o más capa de membrana de transferencia y un distribuidor de flujo (10) para proporcionar una distribución de líquido regular sobre dichas una o más capas de membrana de transferencia, que mantienen juntos, conteniendo dichas una o más membranas una o más entidades biológicas a ensayar, estando un regulador de flujo sobre la parte superior de la membrana y uno o más pocillos (12) colocados sobre la parte superior de la parte de distribuidor de flujo del medio portador;
- 10 b) añadir uno o más reactivos al uno o más pocillos y aplicar un vacío para extraer los reactivos en la membrana, y
- c) añadir uno o más agentes de lavado al uno o más pocillos y aplicar un vacío para extraer los agentes de lavado y cualquier reactivo no-unido a través del distribuidor de flujo, la membrana y el soporte poroso y dentro del colector de vacío, y
- 15 d) repetir las etapas b) y c) una o más veces adicionales.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que las etapas b) y c) se repiten de 2 a 5 veces.
- 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que vacío está entre 133 milibares y 1.013 milibares.
- 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que
- 20 i) el medio portador tiene un medio (16) para asegurar de forma desprendible el soporte y el distribuidor entre sí seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en bisagras, pinzas, cintas elásticas, adhesivos, rótulas, husillos y recesos, o dispositivos de fijación cooperativa, o
- ii) el distribuidor de flujo tiene una superficie inferior y una superficie superior y la superficie superior tiene uno o más pocillos montados sobre la superficie superior del distribuidor de flujo, o
- 25 iii) el distribuidor de flujo tiene una superficie inferior y una superficie superior y la superficie superior (14) tiene uno o más pocillos montados sobre la superficie superior del distribuidor de flujo, en el que el o los pocillos son una parte formada solidariamente de la superficie superior del distribuidor de flujo, o
- iv) el distribuidor de flujo tiene una superficie inferior y una superficie superior (14) y la superficie superior tiene uno o más pocillos montados sobre la superficie superior del distribuidor de flujo, en el que el o los pocillos son una parte formada solidariamente de la superficie superior del distribuidor de flujo, o
- 30 v) el medio portador está fabricado en un material seleccionado entre el grupo que consiste en plástico, papel, metal, cerámica y las combinaciones de los mismos, o
- vi) el distribuidor de flujo es una membrana, o
- vii) el distribuidor de flujo tiene una superficie inferior y una superficie superior y la superficie superior (14) tiene un pocillo montado sobre la superficie superior del distribuidor de flujo, o
- 35 viii) el medio portador tiene más de un distribuidor de flujo y cada distribuidor de flujo tiene una superficie inferior y una superficie superior y tiene un pocillo montado sobre la superficie superior de cada uno de entre uno o más distribuidores de flujo.
- 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que una bandeja de recogida (22) está provista por debajo del medio portador para la recuperación de reactivos, y opcionalmente en el que la bandeja está subdividida en dos o más sub-bandejas separadas.
- 40

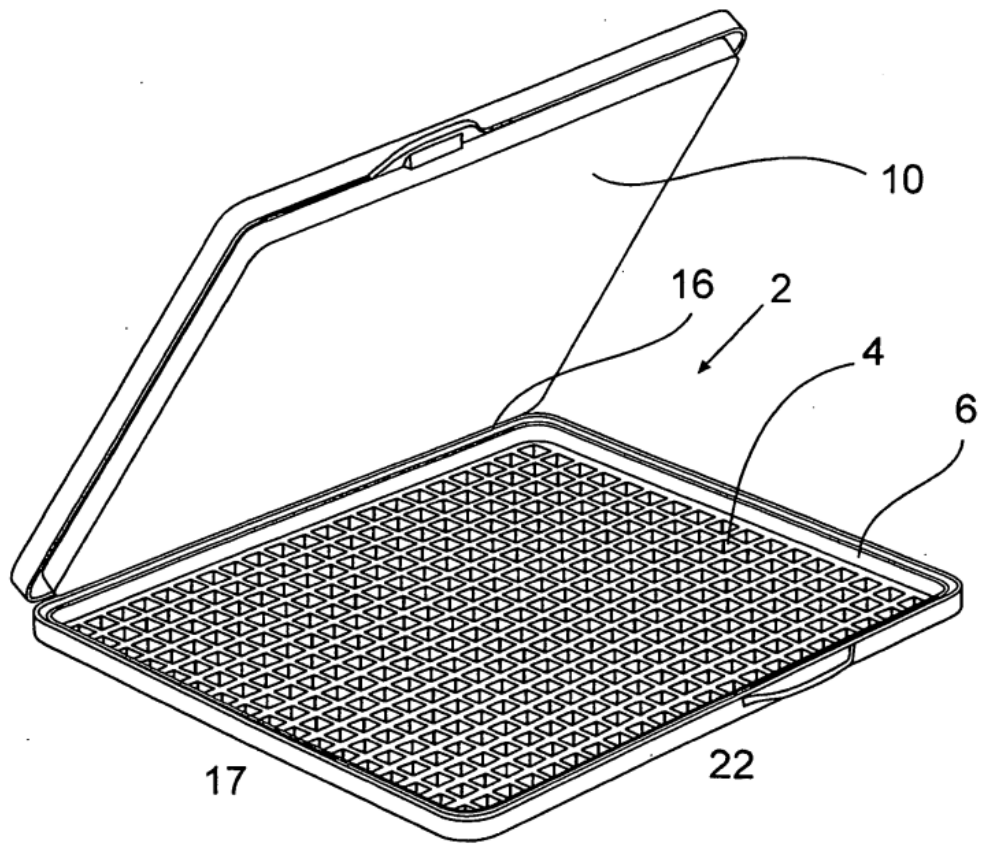


Figura 1

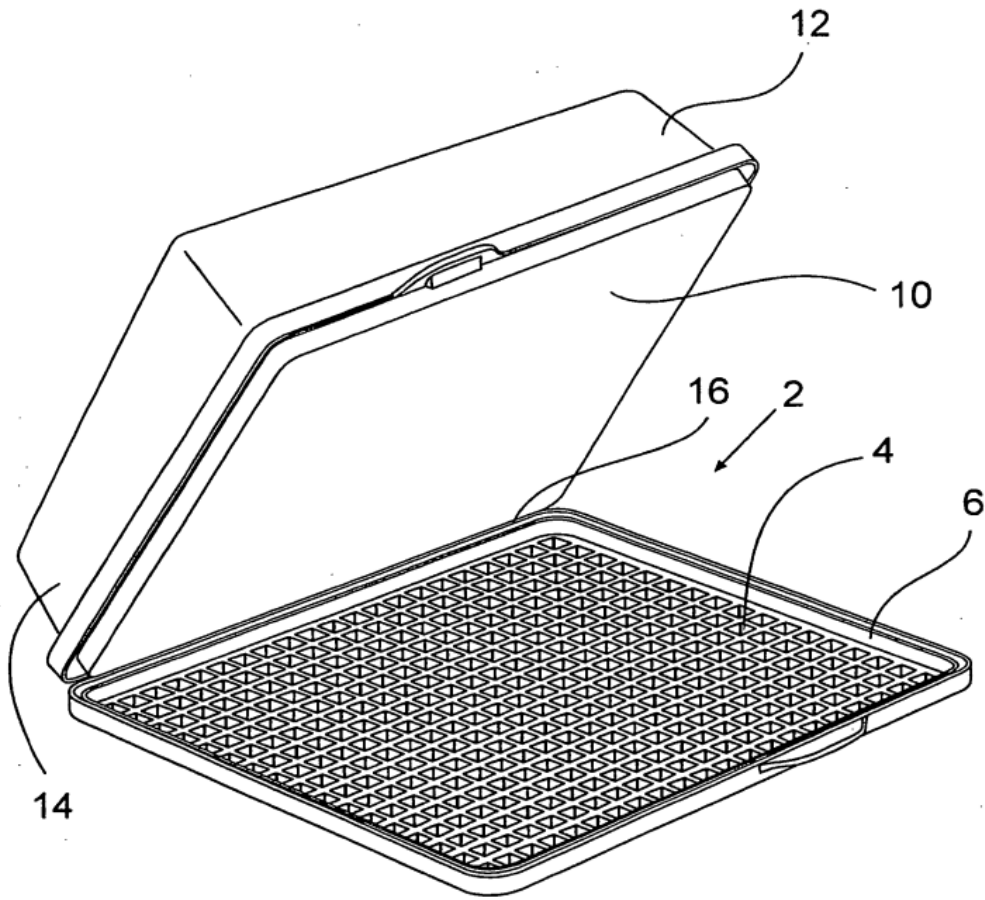


Figura 2

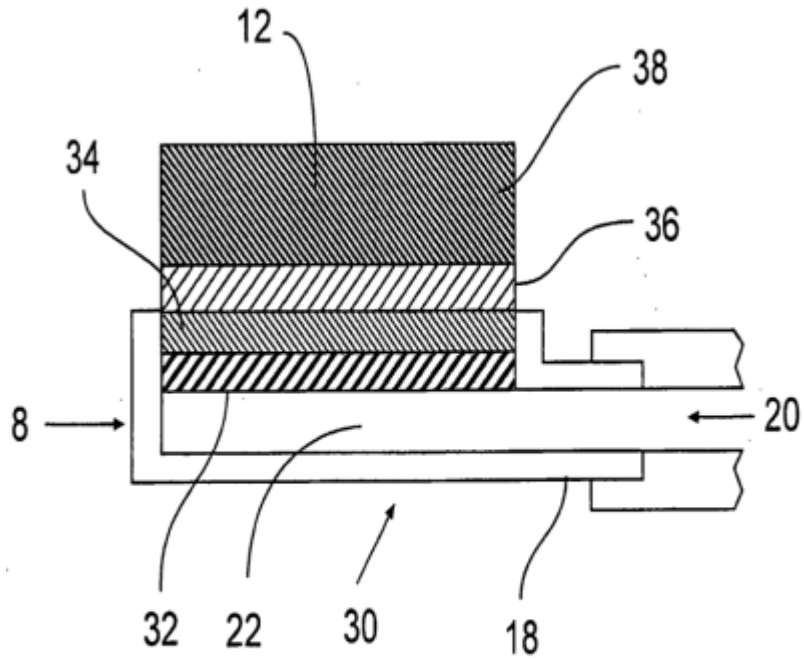


Figura 3

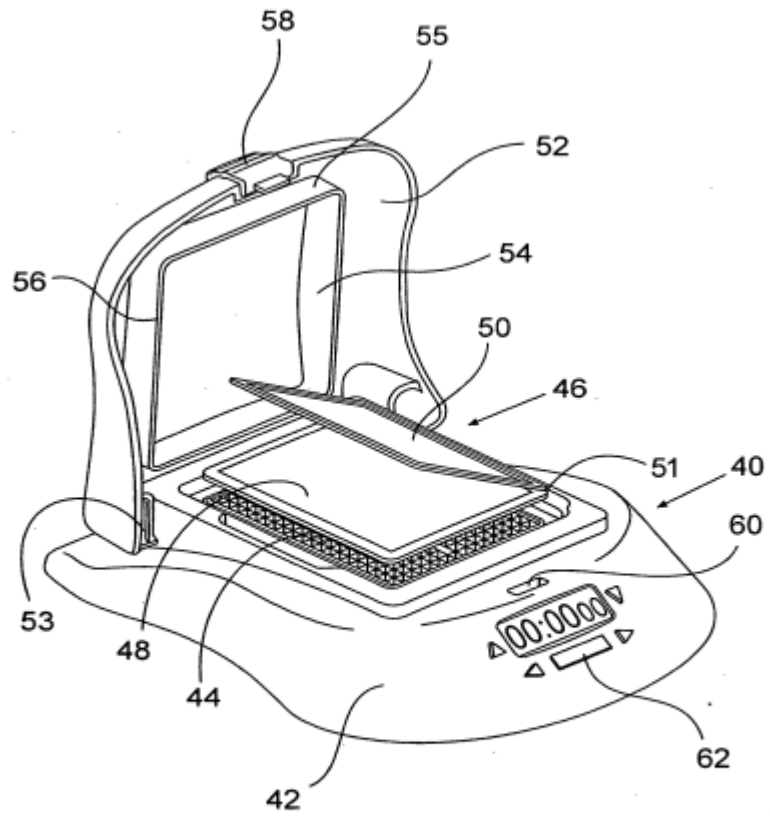


Figura 4

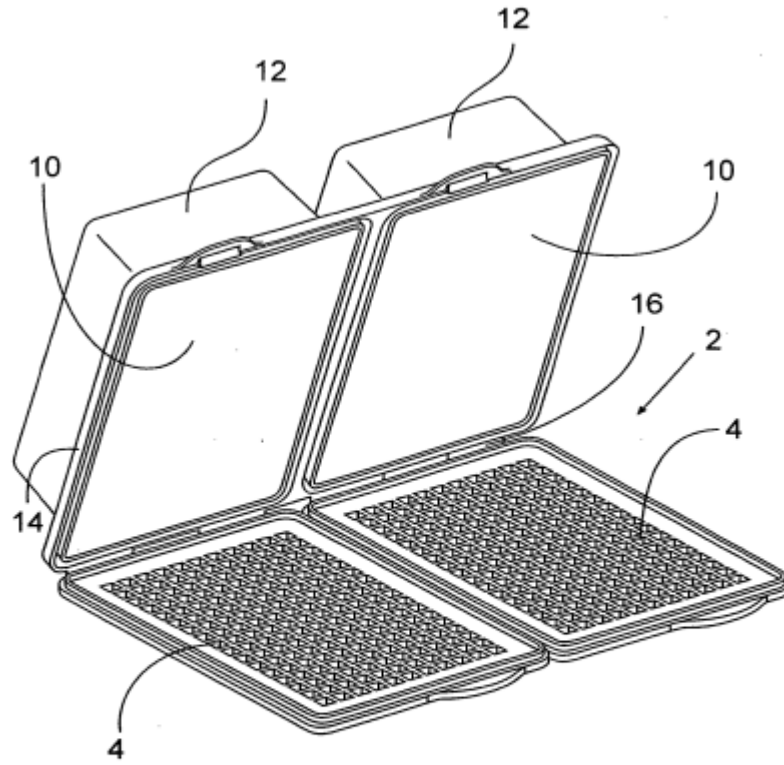


Figura 5

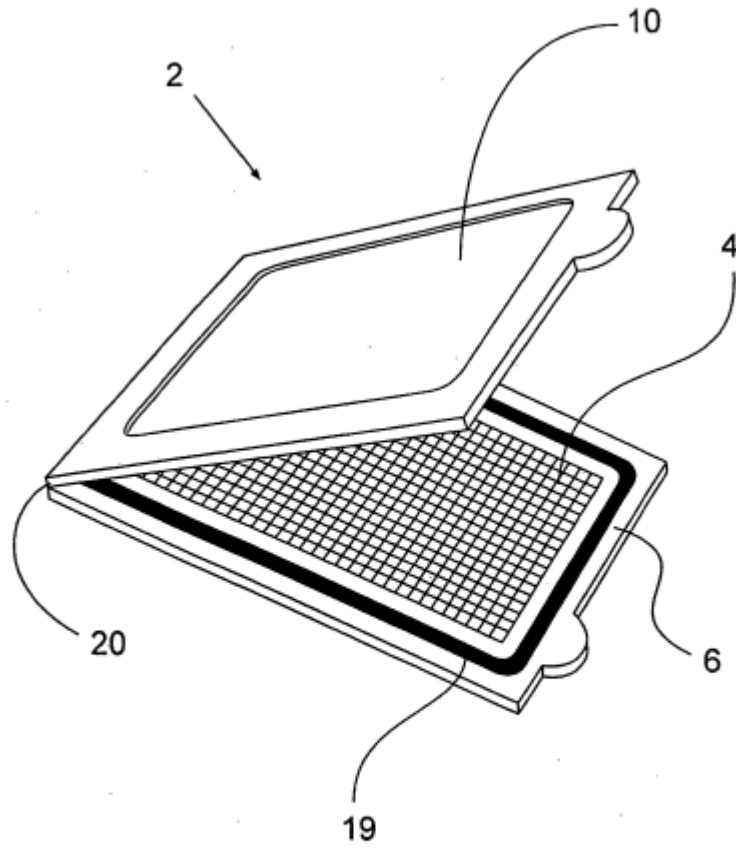


Figura 6

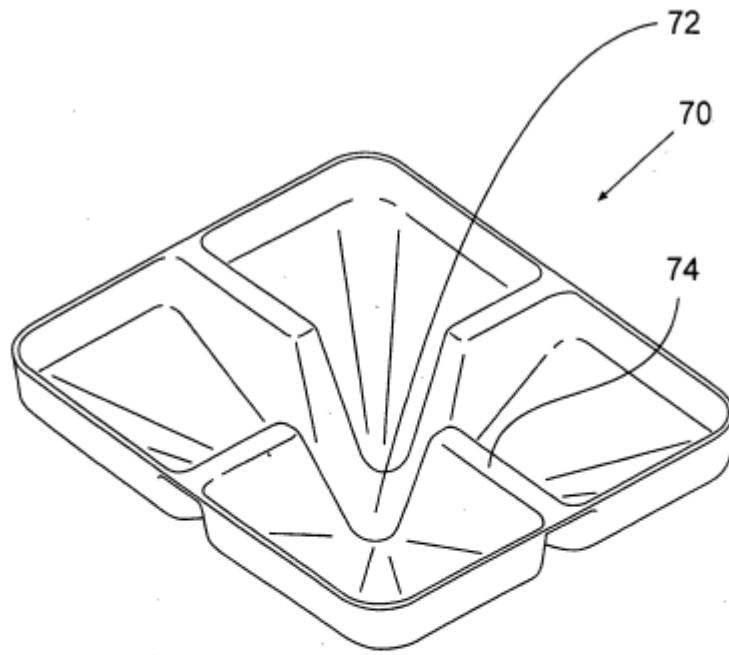


Figura 7

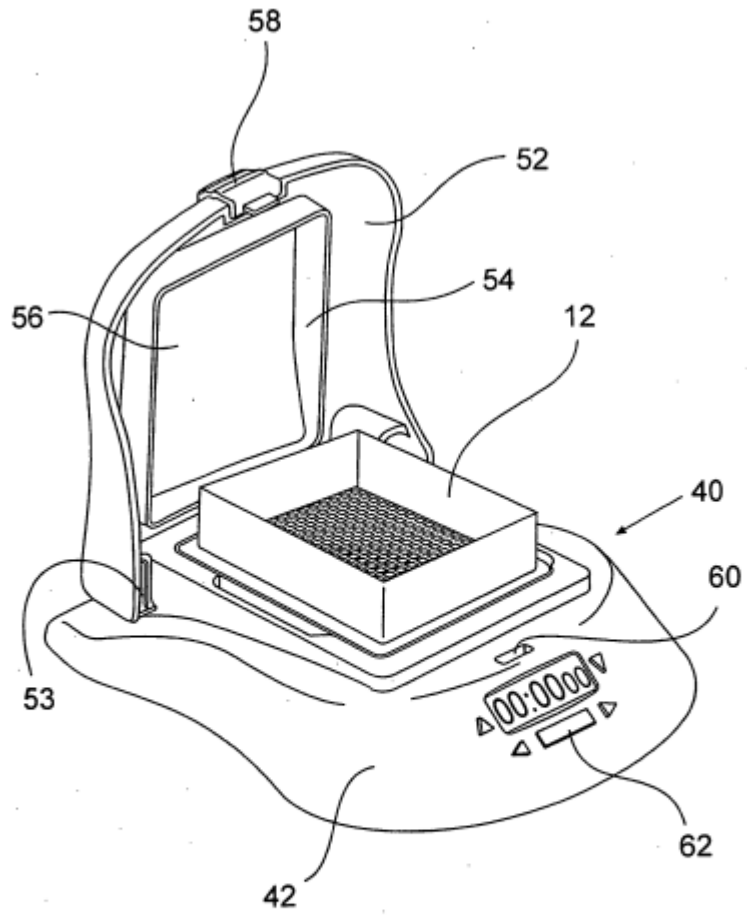


Figura 8

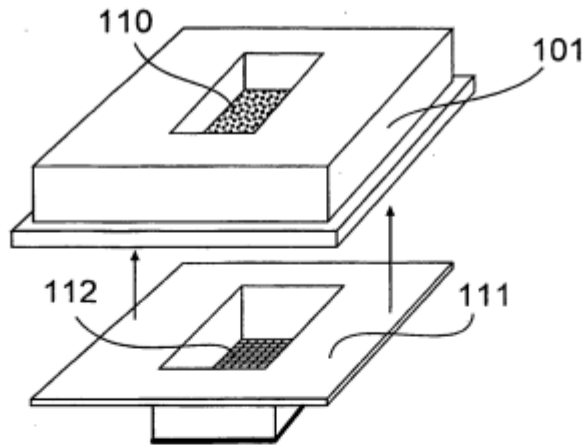


Figure 9A

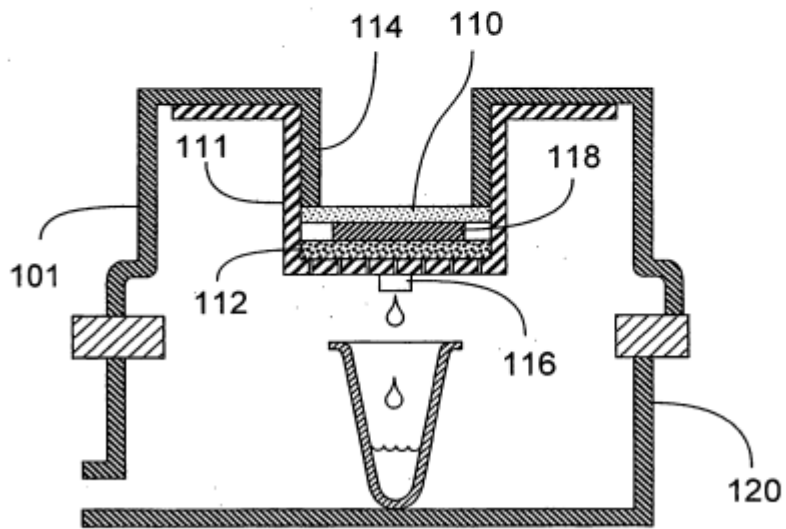


Figura 9B

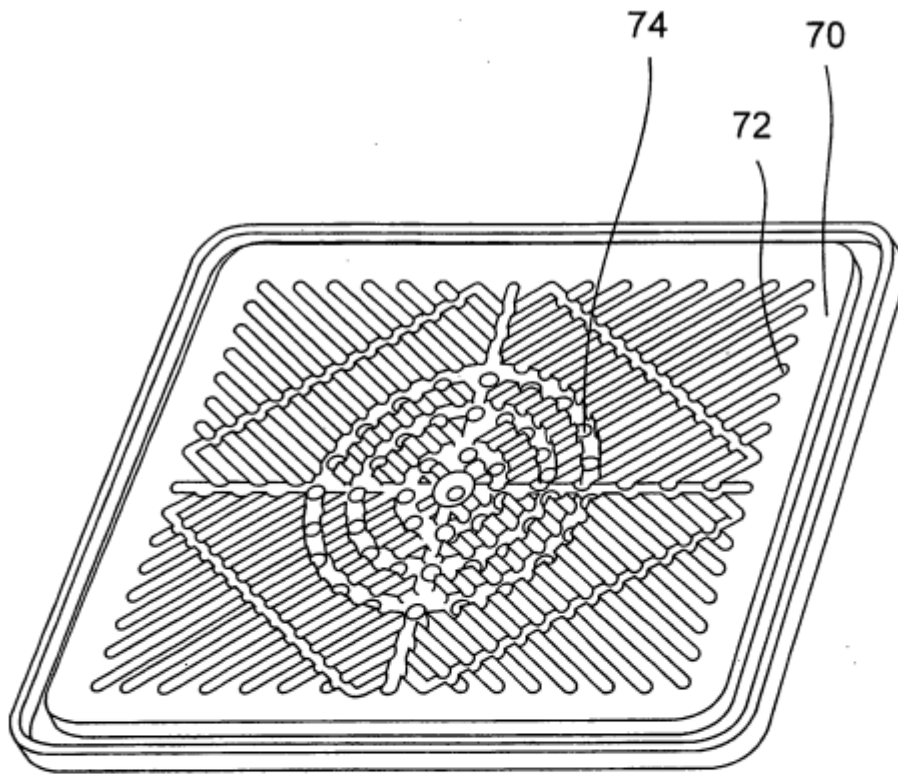


Figura 10

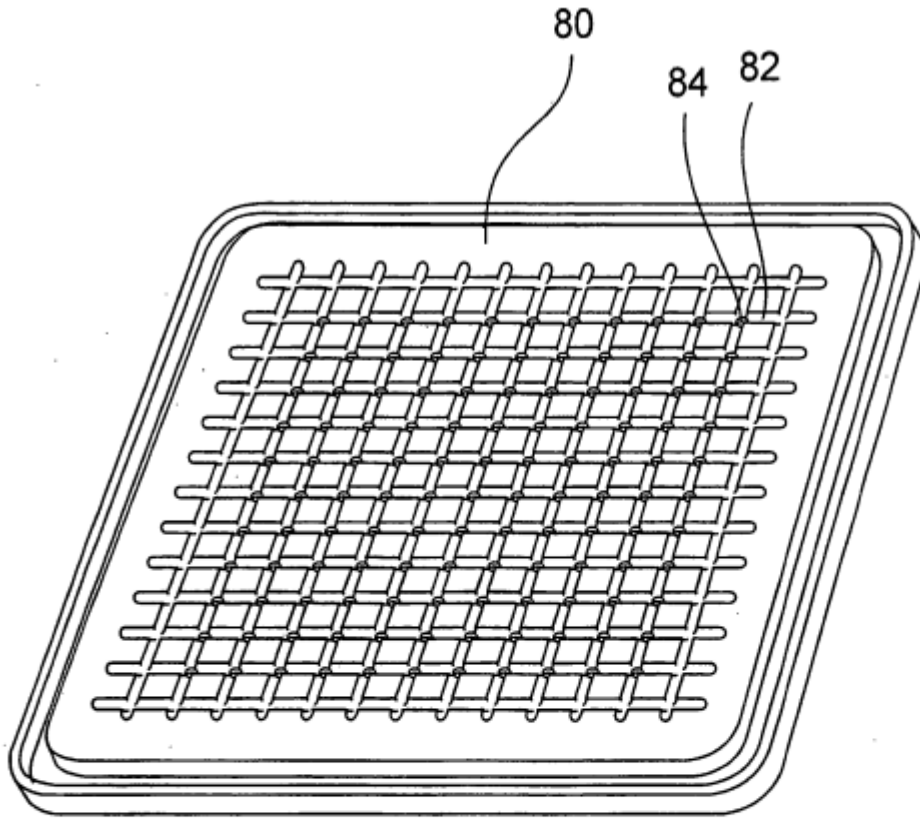


Figura 11

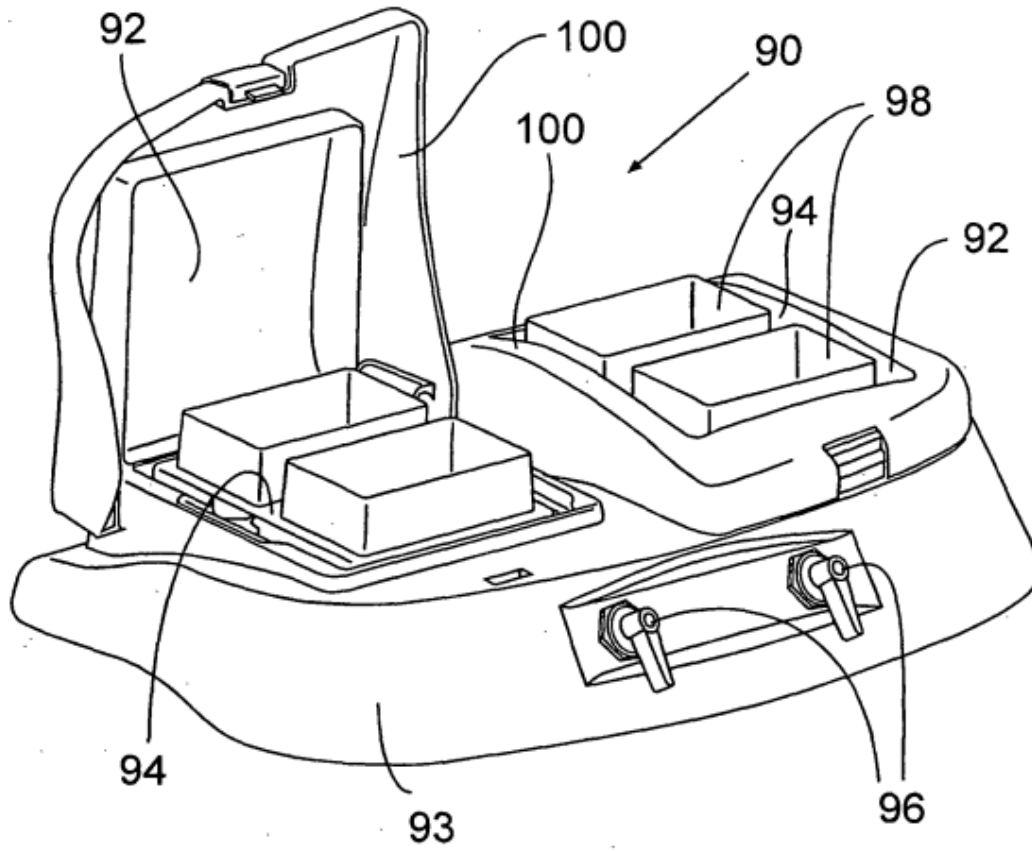


Figura 12