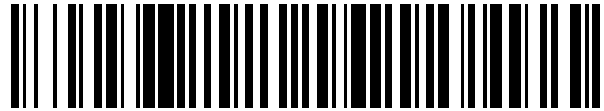


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 226**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2002 E 02778164 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1451582**

54 Título: **Dispositivo y método de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) en microchip**

30 Prioridad:

07.11.2001 SE 0103688

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

02.12.2013

73 Titular/es:

**PROLIGHT DIAGNOSTICS AB (100.0%)
Ideon Ole Römers v. 12
223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

KHAYYAMI, MASOUD

74 Agente/Representante:

ES 2 432 226 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) en microchip

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método de ensayo de una concentración de una sustancia en una muestra. Más precisamente, la invención se refiere a un método para determinar la concentración de una sustancia biológica activa en una muestra por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) realizado en un tubo flexible detectando y cuantificando la radiación emitida a partir del mismo, siendo la radiación proporcional a la cantidad de la sustancia biológica activa que va a someterse a ensayo.
- 10 La presente invención también se refiere a un dispositivo para determinar la concentración de una sustancia biológica activa de este tipo en una muestra por medio de dicho ELISA.

Estado de la técnica

- Se han usado las reacciones que emiten luz en algunos inmunoensayos basándose en sistemas de fase sólida. Estos ensayos se refieren a información tanto cuantitativa como cualitativa sobre determinadas especies inmunogénicas en una muestra fisiológica, tal como sangre u orina, y emplean una o más moléculas de reconocimiento específicas. Al menos una de las especies reactivas se une a la fase sólida, mientras que la otra está en contacto con el medio líquido que contiene la muestra. El complejo inmunológico resultante puede usarse como método para la determinación de la extensión de la reacción. La extensión de reacción es una indicación de la cantidad de analito en muestras desconocidas y puede emplearse de diversos modos.
- 15 Por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas utiliza un inmunorreactante marcado con enzima (antígeno o anticuerpo) y un inmunosorbente (antígeno o anticuerpo unido a un soporte sólido). En esta técnica analítica sensible, se compleja una enzima con un antígeno o un anticuerpo. Se eliminan mediante lavado las sustancias en exceso que participan en la formación del complejo, y entonces se añade un sustrato que genera una actividad que es directamente proporcional a la cantidad de unión y por tanto a la concentración.
- 20 Esta técnica puede llevarse a cabo en varias combinaciones, siendo el procedimiento más usado recubrir los pocillos de una placa de microtitulación con el antígeno y hacerlo reaccionar con un anticuerpo conjugado con una enzima adecuada, por ejemplo peroxidasa del rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, se recubren los pocillos con un anticuerpo monoclonal seguido por una reacción con el antígeno. El antígeno se hace reaccionar posteriormente con otro anticuerpo monoclonal que está conjugado con una enzima adecuada. El primer caso se denomina técnica de ELISA mientras que este último se denomina ELISA de tipo sándwich. Aún en otro formato, se recubren los pocillos con el antígeno seguido por una reacción con un anticuerpo monoclonal que se permite además que reaccione con otro conjugado anticuerpo-enzima específico para el primer anticuerpo. En tales ensayos, la enzima actúa como etiqueta para la medición de la extensión de la reacción. Por ejemplo, el número de moléculas de enzima unidas a los pocillos es una indicación de la cantidad de antígeno presente en los pocillos.
- 25 En el documento JP-A-62179054, se muestra un inmunoensayo de fase sólida, en el que se determinan pequeñas cantidades de disolución de antígeno mediante la adsorción del antígeno sobre la pared interna de un tubo de polímero y llevando a cabo una reacción antígeno-anticuerpo en la disolución de muestra.
- El documento US-A-5 624 850 representa inmunoensayos en tubos capilares translúcidos, especialmente para detectar antibióticos en leche. Se usa un conjugado de proteína que es un hapteno unido covalentemente a una proteína. Se logra la detección irradiando un miembro de par de unión específico conjugado a un marcador fluorescente.
- 30 De manera similar, se ha determinado un herbicida en un inmunoensayo competitivo (Dzgoev *et al.*, *Analytica Chimica Acta* 347 (2097) 87-93). Tubos capilares de vidrio recubiertos con oro sirvieron como soporte en un ELISA de obtención de imágenes, determinándose el conjugado unido de herbicida/albúmina sérica bovina mediante la cuantificación de la emisión de quimioluminiscencia procedente de la descomposición enzimática de un sustrato luminógeno. La luz emitida a lo largo de toda la longitud de los tubos capilares complicó la interpretación de los datos obtenidos.
- 35 Aunque el ELISA es un método inmunoquímico analítico con alta sensibilidad para medir la concentración de todas las proteínas anteriores, existe todavía la demanda de un método más sensible. Se han medido previamente sustancias importantes fisiológicamente, tales como proteínas de fase aguda, dentro de un intervalo de tan sólo aproximadamente 10^{-7} M, y se han detectado pesticidas en concentraciones de tan sólo 10^{-10} M.
- 40 Sin embargo, también existen métodos altamente sensibles para determinar la concentración de sustancias, tales como proteínas de fase aguda, usando un sistema de ELISA descrito en la técnica anterior. El documento WO 9920998 da a conocer un método sensible de este tipo, en el que se realiza ELISA dentro de un tubo capilar desde el que se emite luz. Se detecta y se cuantifica la luz, y la detección tiene lugar desde sustancialmente la dirección longitudinal del tubo capilar.
- 45

El documento WO 0161041 se refiere a un microchip en el que se realiza un ensayo ELISA en un canal principal de una disposición de canales laterales. También se describen otros ensayos en un canal en serpentina o espiral.

5 Un problema de los métodos y dispositivos de la técnica anterior es que llevan mucho tiempo y son caros. Por tanto, se requiere un ensayo más económico y más rápido, en el que se simplifique el procedimiento de lavado, por ejemplo, de muestras fisiológicas. También se desea lograr un sistema de ensayo que sea robusto y que también pueda usarse en el campo.

Un inconveniente de los métodos y dispositivos según la técnica anterior es que requieren grandes volúmenes de fluido. Posteriormente, esto da como resultado una escasa difusión de los fluidos en los tubos capilares.

10 Otro problema de los métodos y dispositivos de la técnica anterior es la reproducibilidad insuficiente, que afecta a la precisión del ensayo. Por ejemplo, los resultados de ensayo de métodos que usan un tubo capilar, desde el que se emite luz y la detección de la misma tiene lugar desde la dirección longitudinal del tubo capilar, dependen de la distancia entre la superficie de fluido dentro del tubo capilar y el detector. Así, cada tubo capilar debe llenarse hasta exactamente el mismo nivel para obtener reproducibilidad.

Todavía otro problema de los métodos y dispositivos de la técnica anterior es que el flujo de fluido es difícil de manejar.

15 Un inconveniente adicional de los métodos y dispositivos según la técnica anterior es que sólo pueden someterse a ensayo procedimientos estáticos.

Sumario de la invención

20 Un objeto de la presente invención es eliminar los inconvenientes y problemas mencionados anteriormente de los métodos y dispositivos de la técnica anterior para someter a ensayo una concentración de una sustancia biológica activa en una muestra por medio de un ELISA. La presente invención proporciona un método y dispositivo eficaces para realizar tales ensayos en el plazo de un corto periodo de tiempo.

25 El método y el dispositivo según la invención se han desarrollado para el ensayo de una concentración desconocida de una sustancia en una muestra, sometiéndose a ensayo la sustancia en un sistema de ensayo dentro de un tubo flexible detectando y cuantificando la radiación, tal como luz, emitida desde el sistema de ensayo. También pueden usarse otros tipos de radiación, tales como radiación radiactiva o similar, lo que resulta evidente para un experto en la técnica. Sin embargo, se usa preferiblemente luz.

30 La sustancia que va a someterse a ensayo puede ser una sustancia proteica natural, o una molécula que se une espontáneamente a dicha sustancia. Por ejemplo, la sustancia es una sustancia biológica activa, tal como proteínas, proteínas de fase aguda, virus, bacterias, etc. Un ejemplo de proteínas de fase aguda son marcadores de infarto de miocardio, tales como FABP (proteínas de unión a ácidos grasos), CK-MB, triponina-T o triponina-I, mioglobina y GPBB (isoenzima BB de la glucógeno fosforilasa). Un ejemplo de proteínas es cistatina C, que puede usarse como marcador para daños renales. Naturalmente, pueden someterse a ensayo otras sustancias, lo que resulta evidente para un experto en la técnica.

35 La presente invención comprende un soporte sólido en forma de tubo flexible que sirve como celda de reacción para el ELISA. El tubo flexible está dispuesto en un microchip, siendo al menos una sección del mismo permeable a la radiación o la luz. El microchip se extiende sustancialmente en un plano. Por tanto, el microchip puede ser una placa delgada con una superficie plana. El microchip puede estar dotado del tubo flexible a lo largo del plano del microchip, conduciendo el tubo flexible fluidos a través del plano del microchip.

40 El microchip puede formarse de un material tal como vidrio, materiales de plástico, un polímero, silicio o compuestos de silicio. Preferiblemente, el microchip está formado de poliestireno. El microchip puede diseñarse transparente o permeable a la luz en un sentido hacia un detector. El microchip puede diseñarse impermeable a la luz en un sentido opuesto al detector, en el que la dispersión de luz se reduce y la luz se concentra o se refleja hacia el detector. Alternativamente, una placa o capa de reflexión de luz puede disponerse mediante el microchip para reflejar la luz emitida en un sentido
45 hacia el detector. Por ejemplo, el microchip se sitúa entre el detector y la capa de reflexión de luz. El microchip puede ser un artículo moldeado por inyección o un artículo moldeado por compresión. Por tanto, el microchip dotado del tubo flexible puede formarse de maneras convencionales. Además, el tubo flexible puede formarse mediante el fresado de ranuras adecuadas en una placa base del microchip y luego dotando la placa base de una placa de cubierta, formando, la placa base y la placa de cubierta el microchip. Sin embargo, este método se usa preferiblemente en la fabricación a
50 pequeña escala de los microchips debido al esfuerzo de trabajo bastante extenso requerido.

El microchip comprende al menos una entrada para introducir fluidos en el tubo flexible y al menos una salida para los fluidos. El microchip puede comprender una pluralidad de entradas para evitar la contaminación. Por ejemplo, el microchip comprende una primera entrada para proteínas, una segunda entrada para un medio de lavado y entradas adicionales, por ejemplo para un sustrato, etc. Así, el microchip puede comprender múltiples entradas para introducir múltiples
55 fluidos en el tubo flexible. Los fluidos pueden introducirse en el tubo flexible del microchip de manera convencional. Los fluidos también pueden conducirse a través del tubo flexible de manera convencional, tal como por medio de presión o

fuerzas capilares. En una realización de la invención, los fluidos pueden conducirse por medio de una bomba peristáltica. La salida puede disponerse para conducir fluidos hasta los desechos.

5 En una realización alternativa de la invención, el microchip puede comprender depósitos dispuestos dentro del microchip. Los depósitos pueden conectarse con el tubo flexible o la celda de reacción mediante tubos para conducir fluidos desde los depósitos hasta la celda de reacción. Los depósitos pueden precargarse con fluidos adecuados para realizar el ensayo, pudiendo conducirse los fluidos hasta la celda de reacción en un orden predeterminado cuando se inicia el ensayo.

10 La superficie del tubo flexible puede tratarse físicamente, tal como con plasma, o químicamente para mejorar la adsorción o unión covalente a la superficie. Por ejemplo, la superficie se trata con Maxisorp™ (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) o similar. Maxisorp™ es una superficie modificada a base de poliestireno con una alta afinidad por grupos polares y se usa comúnmente en relación con ELISA. Alternativamente, pueden tratarse las superficies del tubo flexible con un tipo sol-gel de recubrimiento. El tipo sol-gel de recubrimiento puede usarse para un microchip compuesto por vidrio.

15 El microchip puede situarse hacia un detector para la detección de la luz emitida desde el tubo flexible. Por tanto, el plano del microchip puede ser sustancialmente perpendicular en relación con el detector, en el que también el flujo de fluido es sustancialmente perpendicular al mismo. Por tanto, la luz procedente del sistema de ensayo se detecta sustancialmente desde la dirección perpendicular del plano del microchip según la invención. El detector puede ser un detector fotosensible, tal como una fotocelda, un fotodiodo, una fibra óptica, un sensor de estado sólido (que comprende una red de celdas sensibles a la luz) o un tubo fotomultiplicador situado a una distancia adecuada del microchip. El detector puede conectarse a una pantalla de visualización, un ordenador y un registrador de manera convencional para procesar y presentar visualmente los resultados obtenidos.

20 El tubo flexible proporciona un área superficial grande activa y está dispuesto dentro del microchip en una configuración que obtiene una celda de reacción que tiene una gran área de detección así como buenas propiedades de flujo de fluido. La celda de reacción corresponde sustancialmente a una parte del tubo flexible en la que tiene lugar la reacción y está detectando el detector. En una realización de la invención, el tubo flexible es curvo, en el que la celda de reacción está dispuesto con una pluralidad de curvas en el área de detección. Por tanto, cada segunda curva del tubo flexible de la celda de reacción está sustancialmente a 180° de la curva a la derecha y las curvas restantes están sustancialmente a 180° de las curvas a la izquierda. Además, la distancia entre cada curva aumenta en el sentido desde la entrada o entradas hasta una posición central de la celda de reacción, y disminuye desde la posición central de la celda de reacción hacia la salida. Un microchip también puede comprender una pluralidad de tubos flexibles y una pluralidad de celdas de reacción, lo que hace posible someter a ensayo y detectar una sustancia en varias muestras simultáneamente. Un detector puede disponerse para detectar la luz emitida desde cada celda de reacción individualmente o desde una pluralidad de celdas de reacción en combinación. Por tanto, el microchip puede proporcionar un sistema de ensayo multianalítico para someter a ensayo una pluralidad de proteínas simultáneamente. Por ejemplo el microchip puede comprender 3 o más celdas de reacción independientes, en el que se detecta la luz emitida desde cada celda de reacción.

35 La sección transversal del tubo flexible puede ser rectangular, triangular, circular, semicircular o de cualquier otra forma adecuada. Además, el tubo flexible puede tener una profundidad de aproximadamente 0,2 mm y una anchura de aproximadamente 0,2 mm.

40 Así, la presente invención proporciona una celda de reacción que tiene buenas propiedades de difusión y una gran área de detección que requiere pequeños volúmenes de fluidos. Esto da como resultado un ensayo más económico y más rápido, que es fácil de usar y en el que el flujo de fluido es fácil de manejar, que son características favorables para instrumentos en el punto de atención. El dispositivo y el método según la invención también dan como resultado una reproducibilidad del ensayo excelente, lo que afecta a la precisión del ensayo de manera positiva. Además, la presente invención hace posible someter a ensayo procedimientos dinámicos debido al flujo de fluido continuo y la buena difusión. Otra ventaja de la presente invención son las posibilidades de ensayos multianalíticos para someter a ensayo una pluralidad de sustancias simultáneamente.

45 En otras aplicaciones, la invención también puede usarse en el ensayo y la detección de sustancias patógenas y anti-oxidantes en alimentos, etc.

Breve descripción de los dibujos

50 La invención se describirá ahora con más detalle, con la ayuda de realizaciones a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

la figura 1 es un diagrama de principio que ilustra una disposición de dispositivo según la invención,

la figura 2 es una vista esquemática que muestra el microchip perpendicular al plano del microchip según una realización de la invención,

55 la figura 3 es una vista esquemática que muestra el microchip perpendicular al plano del microchip según una realización alternativa de la invención,

la figura 4 es una vista esquemática que muestra el microchip perpendicular al plano del microchip según una realización alternativa adicional de la invención,

la figura 5 es una vista esquemática que muestra el microchip perpendicular al plano del microchip según una realización alternativa adicional de la invención,

5 la figura 6 es una vista esquemática que muestra el microchip perpendicular al plano del microchip según una realización alternativa adicional de la invención,

la figura 7 es una vista en sección transversal esquemática del tubo flexible según una realización de la invención,

la figura 8 es una vista en sección transversal esquemática del tubo flexible según una realización alternativa de la invención,

10 la figura 9 es una vista en sección transversal esquemática del tubo flexible según otra realización alternativa de la invención,

la figura 10 es una vista en sección transversal esquemática del tubo flexible según una realización alternativa adicional de la invención,

15 la figura 11 es una vista en perspectiva esquemática del microchip y el detector según una realización adicional de la invención, y

la figura 12 es una vista en sección transversal esquemática del microchip según la realización de la figura 11.

Descripción

20 El diagrama de principio de la figura 1 muestra una disposición de dispositivo de ensayo para un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) según la invención. La presente invención comprende un soporte sólido para el ELISA dentro de un microchip 10 permeable a la radiación, o la luz. El microchip 10 está diseñado como placa delgada con una superficie sustancialmente plana. Por tanto, el microchip 10 se extiende sustancialmente en un plano. El microchip 10 está diseñado para conducir fluidos a través del plano del microchip 10. Por ejemplo, los fluidos se conducen hasta el microchip 10 desde al menos un recipiente 11, que comprende el fluido que va a introducirse en el microchip 10, a través de al menos un tubo 12 de entrada. El flujo de fluido se lleva a través del microchip 10 y adicionalmente hacia fuera hasta los desechos 13 a través de un tubo 14 de desechos. El sentido principal del flujo de fluido a través del microchip 10 se indica mediante la flecha A. La disposición de ensayo puede comprender una pluralidad de recipientes 11 y tubos 12 de entrada para introducir fluidos en el microchip 10.

30 El microchip 10 se sitúa hacia un detector 15 para la detección de la luz emitida desde el microchip debido a una reacción relacionada con ELISA. Por tanto, el plano del microchip 10 es sustancialmente perpendicular en relación con el detector 15, en el que también el flujo de fluido es sustancialmente perpendicular al mismo. Por tanto, la luz procedente del sistema de ensayo se detecta según la invención sustancialmente desde la dirección perpendicular del plano del microchip 10. Por ejemplo, el detector 15 es un detector fotosensible, tal como una fotocelda, un fotodiodo o una fibra óptica, situado a una distancia adecuada del microchip 10.

35 En la realización mostrada en la figura 1, el detector 15 se conecta a un dispositivo de procesamiento y una pantalla de visualización en forma de un ordenador 16 de manera convencional para procesar y presentar visualmente los resultados obtenidos. Adicionalmente, el sistema de ensayo también puede conectarse con amplificadores, controladores y registradores convencionales, que no se muestran en las figuras, para facilitar adicionalmente el procesamiento y la presentación visual de los resultados obtenidos.

40 Con referencia a la figura 2 y la figura 3, se muestra el microchip 10 según la invención. El microchip 10 comprende un tubo 17 flexible dispuesto en el interior del microchip 10 para conducir fluidos en el mismo. Una superficie del tubo 17 flexible forma el soporte sólido para el procedimiento de ELISA. El microchip 10 comprende al menos una entrada para introducir fluidos en el tubo 17 flexible y al menos una salida para los fluidos. El microchip 10 puede comprender una pluralidad de entradas para diferentes fluidos para evitar la contaminación. En la realización de la figura 2, el microchip 10 comprende una primera entrada 18 para introducir un primer fluido en el tubo 17 flexible dentro del microchip 10, una segunda entrada 19 para introducir un segundo fluido en el tubo 17 flexible y una salida 20 para los fluidos que salen del tubo 17 flexible a los desechos 13. En la realización de la figura 3, el microchip 10 también comprende múltiples entradas 21 para introducir fluidos adicionales, por ejemplo un fluido de lavado, en el tubo 17 flexible. Por tanto, el microchip 10 comprende múltiples entradas 21 para introducir múltiples fluidos en el tubo 17 flexible. En las realizaciones mostradas, las entradas 18, 19, 21 y la salida 20 están dispuestas en perpendicular al plano del microchip 10, en el que se introducen los fluidos en el microchip 10 en un sentido opuesto al detector 15. Por ejemplo, se introducen los fluidos en y se conducen a través del tubo 17 flexible por medio de presión o fuerzas capilares. Por ejemplo, se introducen los fluidos en y se conducen a través del tubo 17 flexible por medio de una bomba peristáltica.

El tubo 17 flexible está dispuesto dentro del microchip 10 en una configuración que obtiene una celda de reacción que proporciona un área superficial grande y que tiene un área 22 de detección grande así como buenas propiedades de flujo de fluido. El área 22 de detección se indica mediante las líneas discontinuas en las figuras. La celda de reacción corresponde sustancialmente a una parte del tubo 17 flexible en la que tienen lugar las reacciones relacionadas con ELISA. El tubo 17 flexible comprende una pluralidad de secciones curvas que forman una celda de reacción que tiene un área 22 de detección grande. Preferiblemente, el detector 15 se sitúa para la detección de la luz emitida desde la celda de reacción.

En las realizaciones mostradas en la figura 2 y la figura 3 el tubo flexible es curvo, en el que la celda de reacción está dispuesta con una pluralidad de curvas en el área 22 de detección. Por tanto, cada segunda curva del tubo 17 flexible de la celda de reacción está sustancialmente a 180° de la curva a la derecha y las curvas restantes están sustancialmente a 180° de las curvas a la izquierda. Además, la distancia entre cada curva aumenta en el sentido desde la primera entrada 18 y la segunda entrada 19 hasta una posición central de la celda de reacción, y disminuye desde la posición central de la celda de reacción hacia la salida 20 para obtener una celda de reacción con buenas propiedades de flujo de fluido y un área de emisión de luz grande. Las curvas del tubo 17 flexible se extienden en el plano del microchip 10.

Con referencia a la figura 4 y la figura 5, un microchip 10 también puede comprender una pluralidad de tubos 17 flexibles y una pluralidad de celdas de reacción, lo que hace posible someter a ensayo y detectar sustancias en varias muestras simultáneamente. Por tanto, el microchip 10 puede proporcionar un sistema de ensayo multianalítico para someter a ensayo una pluralidad de proteínas simultáneamente. En la realización de la figura 4, el microchip 10 comprende tres tubos 17 flexibles independientes, en los que las entradas 18, 19 y las salidas 20 se especifican para cada tubo 17 flexible. Por tanto, el microchip 10 está dispuesto con una pluralidad de tubos 17 flexibles que proporcionan una pluralidad de celdas de reacción, en el que se detecta la luz emitida desde cada celda de reacción. Con referencia a la figura 4, puede detectarse la luz emitida desde cada celda de reacción por separado, correspondiendo cada celda de reacción a un área 22 de detección separada. Con referencia a la figura 5, puede detectarse la luz emitida desde una pluralidad de celdas de reacción en combinación, incluyendo el área 22 de detección una pluralidad de celdas de reacción. Por tanto, el detector 15 cubre una pluralidad de celdas de reacción simultáneamente. Sin embargo, otras configuraciones y números de los tubos 17 flexibles resultan evidentes para un experto en la técnica y están dentro del alcance de la invención.

Con referencia a la figura 6, el microchip 10 comprende depósitos 22-24 dispuestos dentro del microchip 10. Los depósitos 22-24 se conectan al tubo 17 flexible, o la celda de reacción, para conducir fluidos desde los depósitos 22-24 hasta la celda de reacción. En la realización de la figura 6, el microchip 10 comprende un primer depósito 22 para contener un primer fluido, un segundo depósito 23 para contener un segundo fluido y un depósito 24 de desechos para fluidos de desecho. Por ejemplo, los depósitos 22, 23 se precargan con fluidos adecuados para realizar el ensayo, pudiéndose conducir los fluidos hasta la celda de reacción en un orden predeterminado cuando se inicia el ensayo. Ejemplos de tales fluidos son tampón, fluidos de lavado, sustrato, plasma etc. Los depósitos 22-24 pueden sustituir los recipientes 11 y los desechos 13. Otras configuraciones y números de los depósitos 22-24 resultan evidentes para un experto en la técnica y están dentro del alcance de la invención.

Con referencia a las figuras 7-10, que muestran vistas en sección transversal del tubo 17 flexible que se extiende en el plano del microchip 10, la sección transversal del tubo 17 flexible puede ser rectangular, triangular, circular o semicircular. En la realización de la figura 7, el tubo 17 flexible está diseñado con una sección transversal rectangular que tiene un lado dirigido hacia el detector 15. Usando secciones transversales triangulares o semicirculares, el tubo 17 flexible está diseñado para reflejar la luz hacia el detector 15. Por tanto, una superficie plana del tubo 17 flexible está dispuesta en un sentido hacia el detector 15. En la realización de la figura 8, el tubo 17 flexible está diseñado con una sección transversal triangular regular que tiene un lado que se extiende hacia el detector 15 y un ápice que se extiende perpendicular al plano del microchip 10 en un sentido opuesto. En la realización de la figura 9, el tubo 17 flexible está diseñado con una sección transversal semicircular que tiene un lado plano que se extiende hacia el detector 15 y un arco que se extiende perpendicular al plano del microchip 10 en el sentido opuesto. En la realización de la figura 10, el tubo 17 flexible está diseñado con una sección transversal circular. El tubo 17 flexible se dimensiona para una buena difusión de los fluidos en el mismo. Preferiblemente, el tubo 17 flexible está dispuesto con una profundidad de aproximadamente 0,2 mm y una anchura hacia el detector 15 de aproximadamente 0,2 mm. Otras configuraciones de la sección transversal del tubo 17 flexible y las dimensiones del tubo 17 flexible resultan evidentes para un experto en la técnica y están dentro del alcance de la invención.

Con referencia a la figura 11 y la figura 12, se muestra el microchip 10 según una realización adicional. El microchip 10 comprende una placa 23 base y una placa 24 de cubierta. La placa 23 base está dispuesta con una ranura. La placa 24 de cubierta está dispuesta en la placa 23 base en un sentido hacia el detector 15 para cubrir la ranura, en la que se forma el tubo 17 flexible. Por ejemplo, la placa 23 base está formada de un material impermeable a la luz o un material de reflexión de luz y la placa 24 de cubierta está formada de un material permeable a la luz, en la que la luz emitida desde la celda de reacción se dirige hacia el detector 15. Alternativamente, se proporciona una capa 25 de reflexión de luz por el microchip 10 en un sentido opuesto al detector 15. Por tanto, la capa 25 de reflexión de luz está dispuesta por debajo del microchip 10 en las figuras, en la que el microchip 10 se sitúa entre la capa 25 de reflexión de luz y el detector 15. La capa 25 de reflexión de luz está diseñada para reflejar la luz emitida desde la celda de reacción, en la que la dispersión de luz se reduce y la luz se dirige hacia el detector 15.

Pueden usarse microchips de diferentes materiales en el método según la invención. Por ejemplo, los microchips están compuestos por vidrio, materiales de plástico, polímeros, silicio, compuestos de silicio o materiales similares. Preferiblemente, los microchips están compuestos por poliestireno. Preferiblemente, el material, o materiales, que cubre el microchip hacia el detector es permeable a los fotones producidos por el sistema de ensayo dentro del tubo flexible. Alternativamente, el área de la celda de reacción se cubre con material transparente o un material permeable a la luz, en el que la luz emitida a partir del mismo puede detectarse por el detector. Puede usarse un material impermeable a la luz para el resto del microchip, es decir partes del microchip dirigidas en un sentido opuesto al detector, para reducir la dispersión de luz. Alternativamente, el microchip está dotado de un material permeable a la luz sólo entre la celda de reacción y el detector, obteniéndose una "ventana" hacia el detector. Por tanto, el microchip puede disponerse para concentrar la luz hacia el detector. Por ejemplo, el microchip puede ser un artículo moldeado por inyección o un artículo moldeado por compresión. Por tanto, el microchip dotado del tubo flexible puede formarse de maneras convencionales. Alternativamente, el tubo flexible puede formarse mediante el fresado de ranuras adecuadas en una placa base del microchip y luego dotando la placa base de una placa de cubierta, formando la placa base y la placa de cubierta el microchip.

La superficie del tubo flexible puede tratarse para aumentar la capacidad de la misma, es decir aumentar el número de moléculas o partículas fijadas o unidas a la superficie. Por ejemplo, la superficie se trata mediante métodos de tratamiento de superficie físicos o químicos. La superficie del tubo flexible puede tratarse con Maxisorp™ (NUNC AVS, Roskilde, Dinamarca), o similar, antes de la inmovilización. Maxisorp™ es una superficie modificada a base de poliestireno con una alta afinidad por grupos polares y se usa comúnmente en relación con ELISA. Otros ejemplos de tratamiento de superficie son tratamiento con plasma, tratamiento para un aumento de la unión covalente a la superficie del tubo flexible, etc. Por ejemplo, el tubo flexible dentro de un microchip de vidrio se trata con un tipo sol-gel de recubrimiento. En el tratamiento con tal sol-gel, puede pretratarse la fase sólida en forma del tubo flexible dentro del microchip, con reactivos específicos para la eliminación de moléculas interferentes seguido por la silanización de la superficie con compuestos a base de silano. Especialmente, la naturaleza del silano es de interés específico debido a los efectos sobre la unión de los reactivos al soporte de fase sólida. Pueden emplearse dos enfoques independientes. En primer lugar, el tratamiento puede restringirse a una forma de silano que forma preferiblemente un tipo sol-gel de recubrimiento en el tubo flexible, y en segundo lugar, se usan silanos mixtos de tiempos de preparación más cortos para formar una matriz uniforme en la superficie de la fase sólida. Por ejemplo, puede introducirse un flujo continuo de disolución de silano adecuada para la silanización uniforme del soporte sólido, en el microchip de vidrio por medio de una bomba peristáltica o similar.

Se prepara un ejemplo de la disolución de silano para el recubrimiento de sol-gel mezclando 5 ml de tetrametoxisilano (TMOS), 5 ml de 3-glicidilpropoxitrimetoxisilano (GPTMOS), 90 ml de agua desionizada y 100 µl de HCl 0,1 M. Se ajustó el pH de la disolución de silano a 4,0 con una disolución de ácido acético al 10%, y se agitó la disolución durante la noche a 4°C y 200 rpm en un recipiente hermético para la hidrólisis del silano, para producir la disolución de tipo sol. Se usó la disolución transparente obtenida para el procedimiento de recubrimiento de sol-gel.

Otro ejemplo incluye material de soporte activado para el acoplamiento covalente de una molécula bioactiva a través de un grupo de extremo terminal de la misma, siendo las partes funcionales en el material de soporte (material silíceo, por ejemplo partículas de vidrio, sílice coloidal, CPG, hidrogel, etc.) cuando no están activadas para grupos hidroxilo o sulfhidrilo, en el que se sustituyen átomos de cloro por los grupos hidroxilo o sulfhidrilo para el acoplamiento covalente de la molécula bioactiva a través de grupo amino terminal de la misma.

Entonces se selecciona ópticamente la luz emitida usando el detector para la detección fotosensible que se sitúa a una distancia adecuada del microchip, detectándose la luz emitida desde el microchip según la invención sustancialmente desde la dirección perpendicular de la misma. Por ejemplo, un detector de luz de este tipo comprende un fotodiodo, una fotocelda, una fibra óptica, un tubo fotomultiplicador o un fotodiodo de avalancha (APD).

Mediante esta disposición y situación del microchip, se obtiene una captación de luz excelente, y la eficacia del ensayo aumenta espectacularmente en comparación con métodos de ensayo según el estado de la técnica.

El método de ensayo según la invención es adecuado para la luz emitida desde sistemas colorimétricos, fluorescentes así como quimioluminiscentes. Por tanto, pueden realizarse ensayos cuantitativos que generan una señal emitida, por ejemplo a partir de una reacción de quimioluminiscencia, que se monitoriza numéricamente, por ejemplo por medio de un mecanismo de barrido óptico que tiene una capacidad multianalítica.

Pueden obtenerse, por ejemplo, resultados de ensayo cuantitativos usando un sistema que genera una señal a partir de luminiscencia, confinándose el reactivo de unión específico a una fase sólida en vez de distribuirse dentro del medio de ensayo. Esto puede lograrse si la señal generada desde la fase sólida en el microchip se registra por medio de un dispositivo sensible a la luz. Por tanto, pueden evitarse sistemas de monitorización ópticos costosos, y la señal generada puede almacenarse directamente como un perfil de tiempo frente a intensidad. Los resultados analíticos son especialmente útiles en esta forma cuando se selecciona un gran número de muestras. Mediante esta disposición, puede someterse a ensayo una sustancia en una muestra según el método de la invención en concentraciones de tan sólo 10^{-19} M.

Usando el método según la invención, se proporcionan ensayos robustos y sencillos que pueden usarse para determinar la concentración de un analito fisiológico en un inmunoensayo. Más precisamente, se proporciona un ensayo para una sustancia biológica activa en una muestra, registrándose la señal usada en la determinación del analito directamen-

te en un ordenador personal usando una interfaz adecuada. La luz registrada se deriva de una fuente de luz dentro del microchip, cuya intensidad es una medida de la concentración del analito.

5 Además, usando el método de la invención, se proporcionan ensayos para determinar en una muestra la presencia de una proteína natural o una molécula que se une espontáneamente a la misma. Un inmutosorbente unido a la fase sólida en una inmunoensayo de enzimas puede ser, por ejemplo, una proteína antigénica o un anticuerpo contra la misma.

10 Ejemplos de proteínas de fase aguda de interés son FABP, CK-MB, troponina-T, troponina-I, mioglobina, GPBB y cistatina. Otros ejemplos clásicos de proteínas de fase aguda son ceruloplasmina, C3 y C4 del complemento, orosomucoide, α_1 -antitripsina, α_1 -antiquimotripsina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína C reactiva y amiloide sérico A. Ejemplos adicionales de estas proteínas son la proteína de unión a retinol (RBP) y la proteína de unión a manosa (MBP). El inmutosorbente marcado con enzima puede un anticuerpo hacia la proteína en cuestión o una molécula que se une espontáneamente a la misma.

15 El marcador enzimático está implicado preferiblemente en una reacción luminiscente, lo más preferiblemente en una reacción quimioluminiscente. La luz emitida se usa como medio de determinación de la extensión de la formación del complejo entre el inmutosorbente y el reactante marcado con enzima. La unión del reactivo marcado a la fase sólida se detecta entonces por el detector que monitoriza la señal quimioluminiscente, y se registra la señal electrónica, por ejemplo, en un ordenador personal. Por consiguiente, se monitoriza la extensión de la reacción como las unidades de intensidad generadas desde la celda de reacción dentro del microchip a una distancia adecuada de la misma.

20 También puede determinarse la extensión de la reacción tras la adición de compuestos adicionales a la mezcla de ensayo. Son de particular interés los compuestos que puede hacerse que presenten luminiscencia mediante medios fotoquímicos, químicos o electroquímicos. En la fotoluminiscencia, se induce que el compuesto presente luminiscencia en un procedimiento, en el que absorbe radiación electromagnética, por ejemplo en fluorescencia o fosforescencia. En la quimioluminiscencia, se genera una especie luminiscente mediante la transferencia química de energía al compuesto en cuestión.

25 Cuando se excita un compuesto de este tipo a un estado luminiscente mediante medios químicos, se obtiene un derivado de alta energía, por ejemplo por medio de oxidación química. Tras la oxidación, la especie quimioluminiscente emite un fotón. Algunos compuestos que pueden usarse en métodos basados en luminiscencia, tales como luminol, no son de naturaleza repetitiva en cuanto al acontecimiento detectable sino que producen un fotón sólo una vez por molécula, y tales compuestos son especialmente adecuados para usarse en relación con la invención. El luminol se prefiere particularmente como agente quimioluminiscente. Sin embargo, puede utilizarse una gama de compuestos alternativos, por ejemplo isoluminol, luciferina y otros ésteres de acridinio.

30 Por tanto, se proporciona un sistema de detección eficaz, por ejemplo, con un marcador de peroxidasa del rábano picante junto con luminol y un peróxido (tal como H_2O_2) en el medio de reacción.

35 Generalmente, las reacciones quimioluminiscentes tienen vidas cortas y dan como resultado limitaciones temporales en los procedimientos experimentales. Esto puede superarse mediante el uso de potenciadores que mejoran la duración eficaz de la emisión de luz. Tales reactivos prolongan la emisión durante un periodo de tiempo adecuado y permiten una medición apropiada.

40 Por tanto, mediante la adición de un potenciador adecuado al medio de reacción, que sea suficientemente inerte químicamente y no se vea afectado por la reacción del peróxido, la luz procedente del medio está dotada de una longitud de onda apropiada que es lo suficientemente alta como para permitir la potenciación en la señal tras la reacción. Preferiblemente, la potenciación de las reacciones quimioluminiscentes se logra usando compuestos que esencialmente son fenoles sustituidos, por ejemplo p-yodofenol. Por tanto, un cóctel quimioluminiscente adecuado comprende una disolución de luminol 0,5 mM, 4-yodofenol 0,01 mM y peróxido de hidrógeno al 50%.

45 Es ventajoso incorporar en la mezcla de reacción un sistema fluorescente que pueda absorber la luz quimioluminiscente y emitir luz a una longitud de onda diferente. Un sistema de este tipo ayuda a eliminar el efecto de la luz generada en la muestra a granel, especialmente si la luz emitida se visualiza a través de un filtro apropiado. Por ejemplo, puede absorberse la luz azul procedente del luminol por cumarina, que emitirá una luz de color amarillo/verde. El agente que fluoresce se ubica en o cerca de los medios de detección de señal. Alternativamente, puede usarse el agente que fluoresce como marcador distribuido dentro de la muestra a granel de modo que sólo se detectará la quimioluminiscencia generada localmente.

50 En un inmunoensayo de tipo sándwich bien diseñado, que se prefiere, se inmutiliza un primer reactivo específico (un anticuerpo monoclonal) con una reactividad específica para el analito (por ejemplo, una proteína) en la fase sólida. A este respecto, un anticuerpo específico significa un anticuerpo que se ha seleccionado de varios anticuerpos adecuados similares.

55 El medio de ensayo, que es generalmente acuoso, contiene un segundo reactivo de unión que tiene una especificidad para el analito y un marcador fijado. En ausencia de analito, no se producirá acoplamiento con el primer reactivo y así no se generará ninguna señal detectable. En la configuración de tipo sándwich, el analito actúa esencialmente como

molécula de unión entre el reactivo específico no marcado (primero) y el marcado (segundo), y la extensión del acoplamiento proporciona una medida de la concentración del analito en la muestra.

5 Un inmunoensayo directo típico se realiza generalmente en un medio acuoso en contacto con la fase sólida, que contiene la molécula específica inmovilizada (es decir, una cantidad conocida del analito que va a someterse a ensayo) que tiene una determinada especificidad para la molécula de reconocimiento (es decir, un anticuerpo monoclonal) que esté determinándose. El medio de ensayo consiste en una cantidad excedente del anticuerpo monoclonal marcado (o análogos del mismo que presentan sitios de reconocimiento idénticos) que se permite que reaccione con una cantidad variable del analito inmovilizado, y de esta manera se obtiene una curva de calibración. Se determina la cantidad desconocida del analito inmovilizando el analito sobre las paredes del tubo flexible y llenando los sitios sin reaccionar de la fase 10 sólida con una proteína inerte (por ejemplo, una fracción de gelatina). Entonces se permite que reaccione el analito con el reactivo específico y marcado. Se determina la extensión de la reacción mediante la señal procedente del reactivo marcado y se monitoriza usando un ensayo enzimático que genera cualquier luz emitida detectable. Esta luz puede ser, por ejemplo, fluorescencia o quimioluminiscencia que se monitoriza usando detectores adecuados. Se compara la luz emitida con los resultados convencionales, es decir los resultados obtenidos en ausencia del analito, y se obtiene una 15 medida de la concentración del analito en la muestra.

En un inmunoensayo competitivo, que se realiza generalmente con la fase acuosa en contacto con la fase sólida que contiene el anticuerpo monoclonal específico inmovilizado, el analito está en la fase líquida. La competencia tiene lugar entre el analito marcado y no marcado. Si el analito está presente en una muestra, se mezcla una proporción adecuada del analito marcado con la muestra y se permite que reaccione con el reactivo específico de la fase sólida inmovilizada. 20 Se obtiene un control mediante el analito marcado que se permite que reaccione con la fase sólida inmovilizada y es una medida de la reacción total. La presencia de analito no marcado en la muestra da como resultado la pérdida de un determinado porcentaje de la señal, lo que es por tanto una medida del analito no marcado en la muestra. Habitualmente, una dilución de la muestra determina cómo debe calcularse la concentración original del analito en la muestra.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para determinar una concentración de una sustancia biológica activa en una muestra a partir de una señal óptica emitida durante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), realizándose dicho ensayo en la muestra usando fluidos relacionados con ELISA tales como un inmunorreactante marcado con enzima y un sustrato de enzima, comprendiendo el dispositivo:
- 5 un microchip (10) que se extiende sustancialmente en un plano, teniendo además el microchip al menos una parte permeable a la luz;
- un tubo (17) flexible dispuesto en el interior de un microchip (10) a lo largo del plano del microchip, en el que al menos una parte de dicho tubo (17) flexible sirve como celda de reacción en la que tiene lugar la reacción relacionada con ELISA, emitiéndose desde esa celda la señal óptica durante el ensayo,
- 10 comprendiendo la celda de reacción una pluralidad de secciones curvas de dicho tubo (17) flexible, que forman por tanto una celda de reacción que tiene un área (22) de detección grande, estando además dicha celda de reacción dispuesta de modo que dicha pluralidad de curvas se extiende en el plano del microchip y la señal óptica se transmite sustancialmente de manera perpendicular al plano del microchip,
- 15 un soporte sólido dentro del tubo (17) flexible para alojar y unir un inmunosorbente y alojar fluidos relacionados con ELISA tales como un inmunorreactante marcado con enzima y un sustrato de enzima,
- un detector (15), cuyo plano de detección es sustancialmente perpendicular al plano del microchip, para detectar una señal óptica debida a la actividad en la celda de reacción, y una pantalla de visualización para presentar visualmente la señal óptica detectada, **caracterizado porque** cada segunda curva de dicha pluralidad de curvas de dicho tubo (17) flexible está sustancialmente a 180° de la curva a la derecha y las curvas restantes están sustancialmente a 180° de las curvas a la izquierda y en el que la distancia entre cada curva del tubo (17) flexible aumenta en un sentido hacia una posición central de la celda de reacción y disminuye en un sentido desde la posición central de la celda de reacción.
- 20 2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el microchip (10) comprende una primera entrada (18) para introducir un primer fluido en el tubo (17) flexible y una segunda entrada (19) para introducir un segundo fluido en el tubo (17) flexible.
- 25 3. Dispositivo según la reivindicación 2, en el que el microchip (10) comprende múltiples entradas (21) para introducir múltiples fluidos en el tubo (17) flexible.
4. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el microchip (10) comprende un material transparente o permeable a la luz entre la celda de reacción y el detector (15).
- 30 5. Dispositivo según la reivindicación 4, en el que el microchip (10) está dotado de una capa (25) de reflexión de luz en un sentido opuesto al detector (15).
6. Dispositivo según la reivindicación 4, en el que el microchip (10) comprende un material impermeable a la luz en un sentido opuesto al detector (15) para reducir la dispersión de luz.
- 35 7. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el microchip (10) está formado de un material de plástico o un material de polímero tal como poliestireno.
8. Dispositivo según la reivindicación 7, en el que el microchip (10) es un artículo moldeado por inyección o un artículo moldeado por compresión.
9. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el detector (15) es un fotodiodo, una fotocelda, una fibra óptica, un sensor de estado sólido o un tubo fotomultiplicador para la detección de la luz emitida desde la celda de reacción.
- 40 10. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que una sección transversal del tubo (17) flexible está diseñado para reflejar la luz emitida hacia el detector (15).
11. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el tubo (17) flexible está diseñado con una sección transversal rectangular, triangular, circular o semicircular.
- 45 12. Dispositivo según la reivindicación 11, en el que la sección transversal del tubo (17) flexible está diseñada con un lado plano que se extiende hacia el detector (15) y un ápice o un arco que se extiende perpendicular al plano del microchip (10) en un sentido opuesto.
13. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el microchip (10) comprende una pluralidad de celdas de reacción dispuestas por separado para someter a ensayo una pluralidad de sustancias simultáneamente.

14. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que el detector (15) está dispuesto para detectar la luz emitida desde cada celda de reacción por separado.
- 5 15. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que el detector (15) está dispuesto para cubrir una pluralidad de celdas de reacción simultáneamente para detectar la luz emitida desde una pluralidad de celdas de reacción en combinación.
16. Dispositivo según la reivindicación 13, en el que el dispositivo está dispuesto para el análisis múltiple de diversas sustancias biológicas.
17. Dispositivo según la reivindicación 16, en el que el dispositivo está dispuesto para el análisis múltiple de proteínas de fase aguda.
- 10 18. Dispositivo según la reivindicación 17, en el que el dispositivo está dispuesto para el análisis múltiple de marcadores de infarto.
19. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el microchip (10) comprende una pluralidad de depósitos (22-24) para contener fluidos, dispuestos dentro del microchip (10).
- 15 20. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que un primer depósito (22) y un segundo depósito (23) están dispuestos para contener fluidos para realizar el ensayo, estando los depósitos (22, 23) conectados a la celda de reacción para conducir los fluidos hasta la celda de reacción en un orden predeterminado cuando se inicia el ensayo, y en el que un depósito (24) de desechos está dispuesto para fluidos de desecho.
21. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el tubo (17) flexible se trata en superficie con una superficie modificada a base de poliestireno con una alta afinidad por grupos polares o un recubrimiento químico.
- 20 22. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el tubo (17) flexible incluye material de soporte activado para el acoplamiento covalente de una molécula bioactiva a través de un grupo de extremo terminal de la misma, siendo partes funcionales en el material de soporte (material silíceo, por ejemplo partículas de vidrio, sílice coloidal, CPG, hidrogel, etc.) cuando no están activadas para grupos hidroxilo o sulfhidrilo, y en el que se sustituyen átomos de cloro por los grupos hidroxilo o sulfhidrilo para el acoplamiento covalente de la molécula bioactiva a través de grupo amino terminal
- 25 de la misma

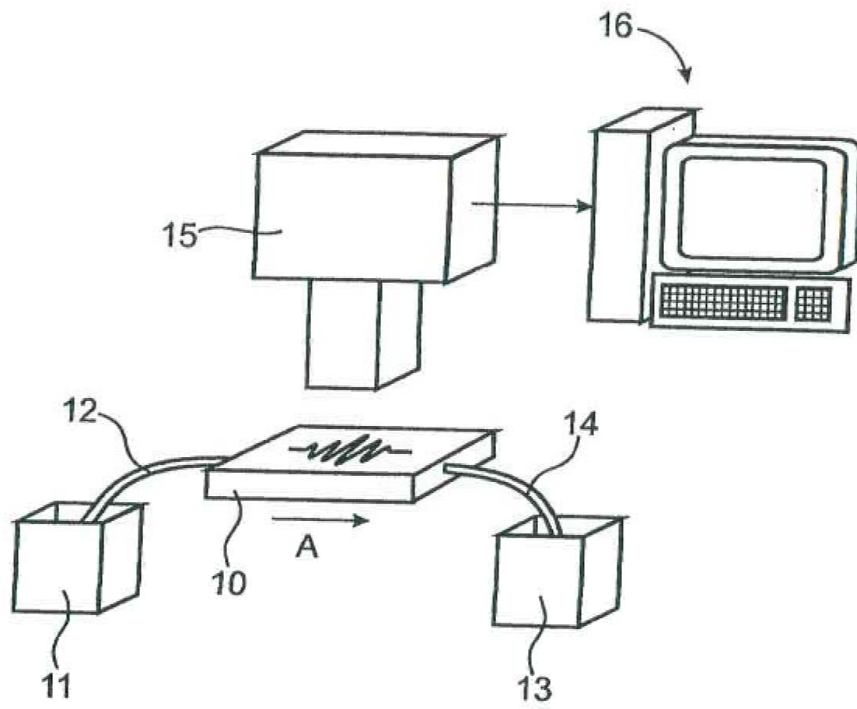


Fig. 1

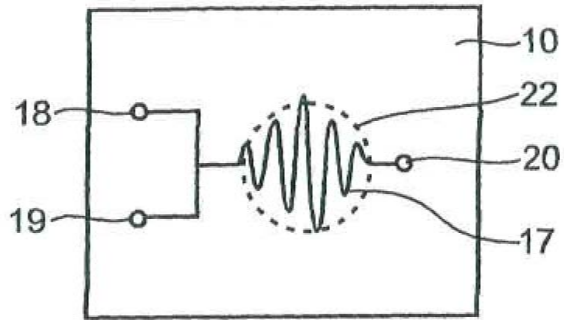


Fig. 2

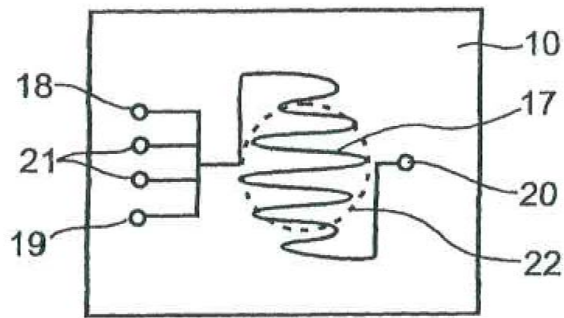


Fig. 3

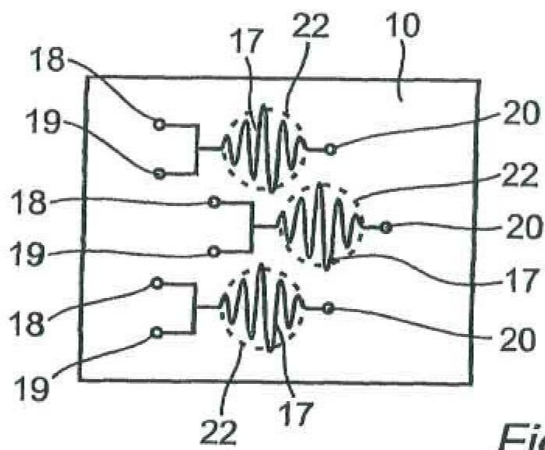
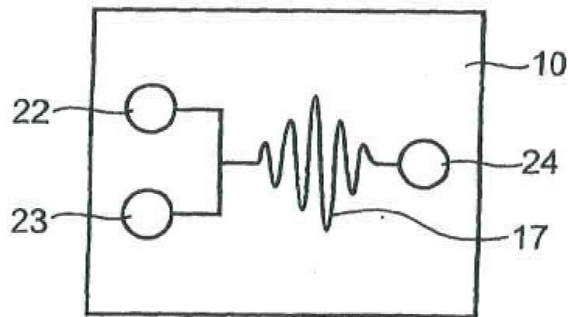
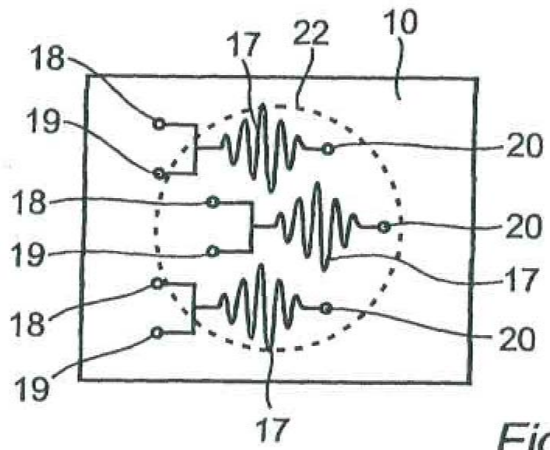


Fig. 4



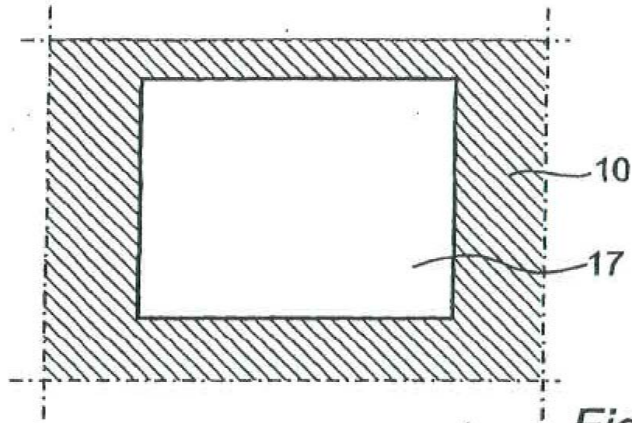


Fig. 7

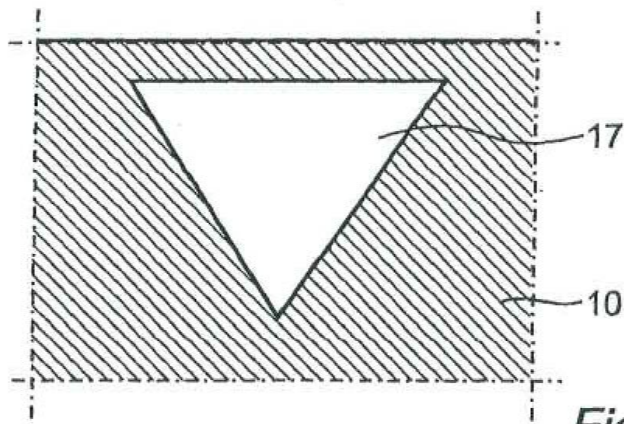
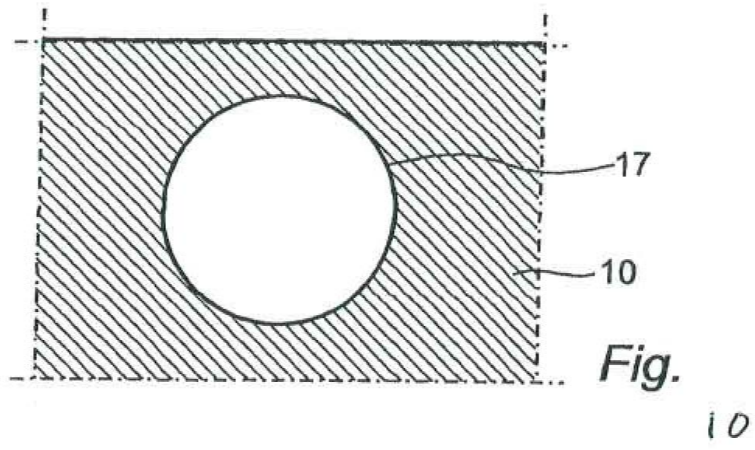
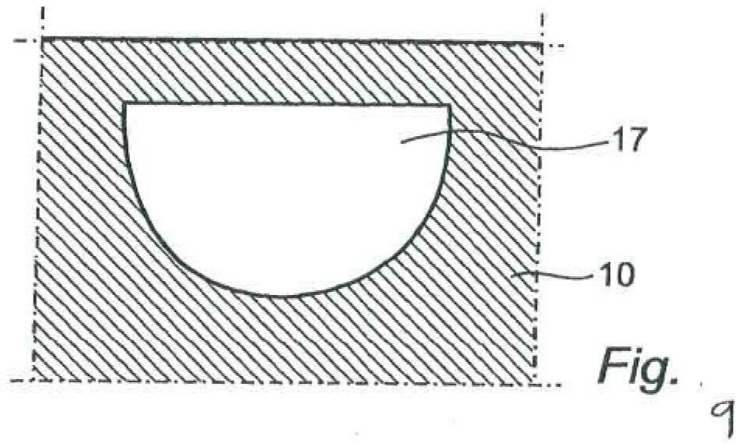


Fig. 8



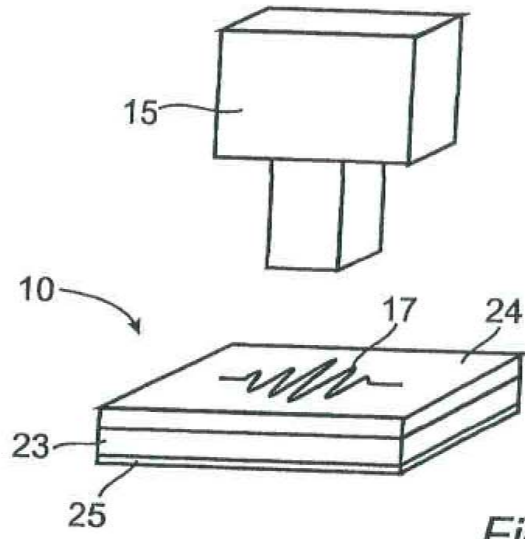


Fig. 11

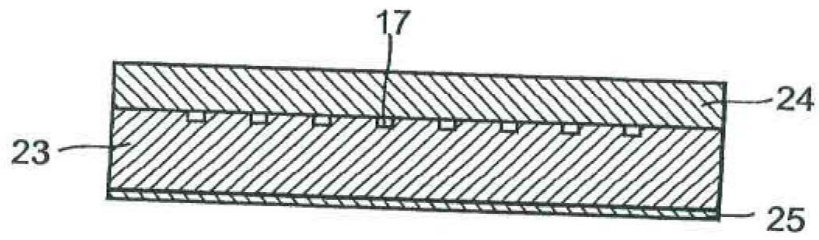


Fig. 12