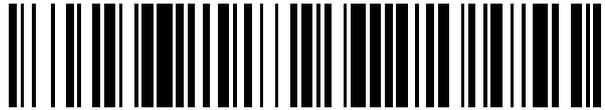


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 545**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008** **E 08877220 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013** **EP 2348316**

54 Título: **Un método para analizar un líquido**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2013

73 Titular/es:

ACTHERM INC. (100.0%)
6F, No. 18, Jhanye 2nd Road Hsinchu Science
Park
Hsinchu 30078, TW

72 Inventor/es:

HSIEH, WEN-PIN y
WU, YI-JEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 435 545 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

Un método para analizar un líquido

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**Campo Técnico**

10 La presente invención se refiere a un método para analizar un líquido, y más particularmente, a un método para analizar un líquido que se aplica al ensayo bioquímico y ensayo inmunológico.

Descripción de Técnica Relacionada

15 Las tiras analíticas convencionales usadas en ensayos bioquímicos o inmunológicos normalmente tienen un sustrato o una tabla base provista de un canal o un canal microfluídico. Mientras tal canal está típicamente bordeado por un material no absorbente, y la viscosidad de la muestra de fluido a analizar es normalmente alta porque la muestra está principalmente compuesta por proteínas o carbohidratos, parte de la muestra de fluido tiende a adherirse a la superficie del canal y no reaccionará. Tal caso, si sucede, no solamente provocará desventajosamente la pérdida de la muestra de fluido a analizar, sino que también afectará negativamente a la precisión de los ensayos cuantificativos.

20 Además, la tira analítica convencional puede facilitar el flujo de la muestra de fluido por canales microfluídicos para que la muestra de fluido se entregue a través de la fuerza capilar ejercida por las estructuras de tales canales con el área de reacción. Otra técnica alternativa para entregar la muestra de fluido incluye la aplicación de una fuerza impulsora, tal como con medios de presurización, en el momento en el que la muestra de fluido se introduce en el canal para que la muestra de fluido se propulse al área de reacción a través del canal. Sin embargo, cualquiera de las dos técnicas anteriormente mencionadas tiende a causar burbujas de aire que ocurren después de que la muestra de fluido se haya introducido en el canal. Estas burbujas, ya sean grandes o pequeñas, bloquearán el canal y darán como resultado resultados inexactos de análisis.

25 Además, el proceso de fabricación de los canales o canales microfluídicos en los sustratos actuales normalmente incluye moldeado, formación por inyección o impresión, usando procesos caros de fabricación con troquel tales como micro-manufactura o LIGA (abreviatura de "Litographie Galvanoformung Abformung" o "Litografía, Galvanización y Conformado" en español) que, unido al temprano desgaste y desgarre de moldes, aumenta el coste total incurrido en la fabricación de tiras analíticas.

30 WO2004/086042A1 describe un dispositivo de análisis con múltiples canales, que incluye una pluralidad de canales grabados en un material poroso. El material poroso está provisto de agentes espesantes inmovilizados en el mismo.

35 Ahmad et al. analiza en "Efectos del grosor de fundición de membrana en el control de la estructura macro vacía en la membrana de nitrocelulosa de flujo lateral y determinación de sus características" (SCRIPTA MATERIALIA, ELSEVIER, vol. 57, nº 8, 2007-07-28, p. 743-746) la influencia del grosor de una capa de nitrocelulosa en las propiedades dinámicas de una muestra de fluido.

40 Comenzando con WO 2004/086042A1, es el objeto de la presente invención proporcionar un método para analizar una muestra de fluido dando como resultado un resultado fiable de análisis en base a una cantidad mínima de muestra de fluido.

50 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

55 El objeto anteriormente mencionado se resuelve con el método para analizar una muestra de fluido de acuerdo con la reivindicación 1. Las mejoras ventajosas de la presente invención son el contenido de las reivindicaciones dependientes.

60 Con el fin de superar los fallos anteriormente mencionados, la presente invención proporciona un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido. El método comprende las etapas de:

65 (1) proporcionar un sustrato que tiene una superficie superior cóncavamente formada con al menos un canal. El canal comprende una primera área, una segunda área y una tercera área y estas tres áreas están conectadas secuencialmente. Cada una de la segunda y tercera área tiene una capa de nitrocelulosa formada en las partes inferiores de las mismas. Ambas capas de nitrocelulosa tienen una conformación de matriz hueca. La segunda área está configurada para entregar la muestra de fluido y la tercera área está configurada donde la muestra de fluido reacciona. La capa de nitrocelulosa de la segunda área comprende

un grosor medio que no es mayor que el grosor medio de la capa de nitrocelulosa de la tercera área. La capa de nitrocelulosa de la tercera área es capaz de absorber un volumen fijo de la muestra de fluido. Además, se forma un material de reacción en la conformación de matriz hueca de las capas de nitrocelulosa;

(2) aplicar la muestra de fluido a la primera área del sustrato, para que la segunda área y después la tercera área entreguen la muestra de fluido;

(3) absorber el volumen fijo de la muestra de fluido por la capa de nitrocelulosa de la tercera área; y

(4) permitir que el material de reacción en la tercera área y el analito específico en la muestra de fluido reaccionen y produzcan una señal.

Por ello, un objeto principal de la presente invención es proporcionar un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido, donde el método comprende proporcionar un sustrato formado con un canal que tiene capas absorbentes de nitrocelulosa. Debido a que la nitrocelulosa tiene una capacidad absorbente volumétrica constante se permite de este modo que pueda realizarse un ensayo cuantitativo controlando el volumen de las capas de nitrocelulosa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido, donde el método comprende proporcionar un sustrato formado con un canal que tiene capas de nitrocelulosa de conformación de matriz hueca, que es capaz de destruir las burbujas de aire en la muestra de fluido cuando la muestra de fluido fluye a través de la matriz hueca, así como impedir que las burbujas bloqueen el canal o el canal microfluídico del sustrato. De este modo, puede asegurarse un resultado preciso del ensayo cuantitativo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

La invención así como un modo preferente de uso, más objetos y ventajas de la misma se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción detallada de una realización ilustrativa en conjunto con los dibujos acompañantes, donde:

Fig. 1 es un diagrama de flujo de un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido de acuerdo con una realización preferente de la presente invención;

Fig. 2 es una vista esquemática en perspectiva de un sustrato proporcionado en el método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido de acuerdo con la realización preferente de la presente invención;

Fig. 3 es una vista esquemática en sección del sustrato proporcionado en el método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido de acuerdo con la realización preferente de la presente invención;

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención desvela un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido en la que los principios físicos y químicos así como las técnicas de aplicación de solución implicadas son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por lo tanto, una descripción detallada de tales principios y técnicas se omite en el presente documento por motivos de brevedad. Además, los dibujos referenciados en la siguiente descripción no están dibujados a escala real y no es necesario que así sea porque pretenden demostrar características de la presente invención solamente esquemáticamente.

En referencia a la Fig. 1, de acuerdo con una realización preferente de la presente invención, un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en la muestra de fluido comprende las siguientes etapas.

En la etapa 1, se proporciona un sustrato 10. En referencia a la Fig. 2, el sustrato 10 tiene una superficie superior 100 cóncavamente provista de al menos un canal 11. El canal 11 incluye una primera área 111, una segunda área 112 y una tercera área 113. Estas tres áreas 111, 112, y 113 están conectadas secuencialmente. El sustrato 10 está preferentemente hecho de un material biocompatible. Por favor hagan ahora referencia a la Fig. 3, que es una vista en sección del sustrato 10 tomada a lo largo de una línea A-A en la Fig. 2. Las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131, cada una con una conformación de matriz hueca, están formadas en las partes inferiores de la segunda y tercera área 112 y 113, respectivamente. La segunda área 112 está configurada para entregar una muestra de fluido y la tercera área 113 está donde la muestra de fluido reacciona. La capa de nitrocelulosa 1121 tiene un grosor medio D_a que no es mayor que el grosor medio D_b de la capa de nitrocelulosa 1131. Debido a que la nitrocelulosa tiene una capacidad absorbente volumétrica constante, la capa de nitrocelulosa 1131 puede absorber un volumen constante de la muestra de fluido. Además, la conformación de matriz hueca de las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 contiene un material de reacción cuya composición varía de las categorías de analitos en la muestra de fluido que se detectarán.

En la etapa 2, una muestra de fluido se aplica a la primera área 111 del sustrato 10, para que las segunda área 112 y después la tercera área 113 entreguen la muestra de fluido.

5 En la etapa 3, la capa de nitrocelulosa 1131 de la tercera área 113 absorbe el volumen fijo de la muestra de fluido.

10 En la etapa 4, el material de reacción en la tercera área 113 reacciona con el analito específico en la muestra de fluido para producir una señal para detección. La señal puede ser una señal luminiscente, una señal fluorescente, una señal fotoabsorbente o una señal eléctrica.

15 Además, con el fin de reducir la influencia del efecto capilar ejercido entre los canales y la muestra de fluido, la configuración del canal 11 desvelado en la presente invención no es similar a la del micro-canal convencional. Preferentemente, una anchura W_a de la segunda área 112 y una anchura W_b de la tercera área 113 son al menos 0,3 mm.

20 Las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 están formadas de la siguiente manera. Para empezar, se mezcla un polvo de nitrocelulosa con un disolvente orgánico que contienen ésteres y cetonas para formar una solución de nitrocelulosa. Después, la solución de nitrocelulosa se vierte en las partes inferiores de la segunda y tercera área 112 y 113 en un proceso de fundición. Después del secado, la capa de nitrocelulosa 1121 se forma en la parte inferior de la segunda área 112 y la capa de nitrocelulosa 1131 se forma en la parte inferior de la tercera área 113. Para un mejor resultado del proceso de fundición, el canal 11 tiene preferentemente una aspereza de superficie que oscila entre 3 μm y 50 μm .

25 Con el fin de obtener una matriz hueca con una mejor estructura, el polvo de nitrocelulosa se mezcla con disolvente orgánico que contiene ésteres y cetonas preferentemente en una proporción volumétrica de 1:9. Debido a que la nitrocelulosa tiene una capacidad absorbente volumétrica constante, el volumen requerido de la solución de nitrocelulosa puede derivarse del volumen deseado de la muestra de fluido que se absorberá y analizará antes de la fundición. Como resultado, el volumen requerido de la muestra de fluido de la tira analítica 1 se establecerá de manera fija, para que la tira analítica resultante 1 sea adecuada para un ensayo en un volumen pequeño.

30 Los materiales de reacción en las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 pueden estar formados por las dos siguientes maneras, donde una es la de formarse en capas de nitrocelulosa fácilmente formadas y la otra la de formarse simultáneamente con las capas de nitrocelulosa.

35 Los materiales de reacción están formados en capas de nitrocelulosa fácilmente formadas de las siguientes maneras. Una solución de reacción que contiene el material de reacción se inyecta en las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 que ya se han formado fácilmente. La solución de reacción se seca después mediante un proceso de secado con aire o liofilización para que el material de reacción se deje en las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 en forma de polvo.

40 Sin embargo, en una técnica alternativa, para formar los materiales de reacción simultáneamente con las capas de nitrocelulosa, la solución de reacción que contiene el material de reacción primero se mezcla con la solución de nitrocelulosa que comprende el polvo de nitrocelulosa y el disolvente orgánico que contiene ésteres y cetonas, antes de que la mezcla resultante se funda en las partes inferiores de la segunda y tercera área 112 y 113, para que después del secado mediante secado con aire o liofilización, la solución de nitrocelulosa se seque para formar las capas de nitrocelulosa 1121 y 1131 mientras el material de reacción se deja dentro en forma de polvo.

45 El método para analizar un líquido de la presente invención puede aplicarse a ensayos bioquímicos o ensayos inmunológicos. Como los analitos que se detectarán varían, se requieren diferentes ensayos, y los diferentes ensayos producen diferentes señales. Por ejemplo, un ensayo bioquímico puede usar una enzima para catalizar la reacción entre analitos en la muestra de fluido a detectar y un reactivo químico para producir una señal específica para detección. Por lo tanto, con el fin de realizar el ensayo bioquímico, el material de reacción contiene una enzima adecuada y el correspondiente reactivo químico. Por otro lado, si se desea detectar la presencia de una cierta proteína, tal como α -fetoproteína, en un espécimen, será necesario usar un anticuerpo con especificidad para la proteína diana y el correspondiente reactivo químico adecuado para el reconocimiento del anticuerpo para la proteína diana, produciendo de este modo una señal para detección. Como consecuencia, para realizar la detección inmunológica, el material de reacción contiene tales reactivos inmunológicos como anticuerpos y los correspondientes reactivos químicos. De este modo, el sustrato 10 proporcionando en la presente invención es aplicable para la detección de varios compuestos en una variedad de especímenes biológicos, tales como orina, sangre y otros especímenes fluidos.

50 La realización preferente de la presente invención descrita anteriormente utiliza un sustrato formado con un canal que tiene tres áreas. Sin embargo, el método para analizar un líquido correspondiente a la presente invención puede también implementarse con un sustrato formado con un canal que tiene una cuarta área (no mostrada) para alojar el exceso de la muestra de fluido en el canal, además de estar dispuesta secuencialmente después de la primera, segunda y tercera área. La cuarta área también está provista de una capa de nitrocelulosa que contiene un

65

material de reacción, y la conformación y el método de formación de la capa de nitrocelulosa, ingredientes y la proporción volumétrica preferente de la solución de nitrocelulosa que forma la capa de nitrocelulosa, y la composición del material de reacción son similares a los desvelados en la realización preferente anterior y no se repetirán en el presente documento.

5

La descripción anterior pretende solamente demostrar la realización preferente de la presente invención y no limitar el alcance de la invención. Además, como los contenidos desvelados en el presente documento deberían entenderse fácilmente y pueden implementarse por aquellos expertos en la técnica, todos los cambios y modificaciones equivalentes que no partan del espíritu de la presente invención deberían estar incluidos en las reivindicaciones adjuntas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar un líquido que se aplica para detectar un analito específico en una muestra de fluido, que comprende las etapas de:
- 5 proporcionar un sustrato (10) que tiene un canal (11) definido por un espacio cóncavo formado sobre una superficie superior (100) del sustrato (10) para analizar una muestra de fluido que contiene el analito, donde el canal (11) tiene una primera área (111), una segunda área (112) y una tercera área (113) que están conectadas secuencialmente, donde cada una de la segunda área (112) y tercera área (113) del canal (11) tiene una parte inferior provista de una capa de nitrocelulosa (1121, 1131) que tiene una configuración de matriz hueca formada con un material de reacción;
- 10 aplicar la muestra de fluido a la primera área (111) del canal (11) del sustrato (10);
entregar la muestra de fluido mediante la segunda área (112) configurada para absorber la muestra de fluido que procede de la primera área (111) y entregar la muestra de fluido a la tercera área (113); y
detectar el analito en la muestra de fluido en la tercera área detectando señales generadas desde una reacción entre el material de reacción y el analito en la muestra de fluido,
- 15 donde cada una de la segunda área (112) y la tercera área (113) tiene una anchura (W_a , W_b) de al menos 0,3 mm, y la capa de nitrocelulosa (1131) de la tercera área (113) es capaz de absorber un volumen constante de la muestra de fluido para absorber un volumen constante de la muestra de fluido para absorber un volumen fijo de la muestra de fluido que procede de la segunda área (112), teniendo la capa de nitrocelulosa (1121) de la segunda área (112) un grosor medio (D_a) que es inferior a un grosor medio (D_b) de la capa de nitrocelulosa (1131) de la tercer área (113).
2. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde las capas de nitrocelulosa (1121, 1131) están formadas mediante fundición de una solución de nitrocelulosa en las partes inferiores de la segunda y tercera área (112, 113) seguido por un proceso de secado.
- 25 3. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 2, donde la solución de nitrocelulosa se forma mezclando un polvo de nitrocelulosa con un disolvente que contiene ésteres y cetonas.
- 30 4. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde el sustrato (10) está hecho de un material biocompatible.
5. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde el canal (11) tiene una aspereza de superficie que oscila entre 3 μm y 50 μm .
- 35 6. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 2, donde el material de reacción está en forma de polvo y se forma en la conformación de matriz hueca de las capas de nitrocelulosa (1121, 1131) inyectando una solución de reacción que contiene el material de reacción en las capas de nitrocelulosa (1121, 1131) seguido por un proceso de secado.
- 40 7. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 2, donde el material de reacción está en forma de polvo y se forma en la conformación de matriz hueca de las capas de nitrocelulosa (1121, 1131) mezclando una solución de reacción que contiene el material de reacción con la solución de nitrocelulosa seguido por un proceso de secado para que la solución de nitrocelulosa forme las capas de nitrocelulosa (1121, 1131) mientras el material de reacción se deja en las capas de nitrocelulosa en forma de polvo.
- 45 8. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde el material de reacción comprende una enzima y un reactivo químico.
- 50 9. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde el material de reacción comprende un anticuerpo y un reactivo químico.
10. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde el canal (11) incluye además una cuarta área que tiene una parte inferior formada con una capa de nitrocelulosa que tiene una conformación de matriz hueca para alojar el exceso de la muestra de fluido.
- 55 11. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde la señal se selecciona del grupo consistente en una señal luminiscente, una señal fluorescente y una señal fotoabsorbente.
- 60 12. El método para analizar un líquido como se reivindica en la Reivindicación 1, donde la señal es una señal eléctrica.

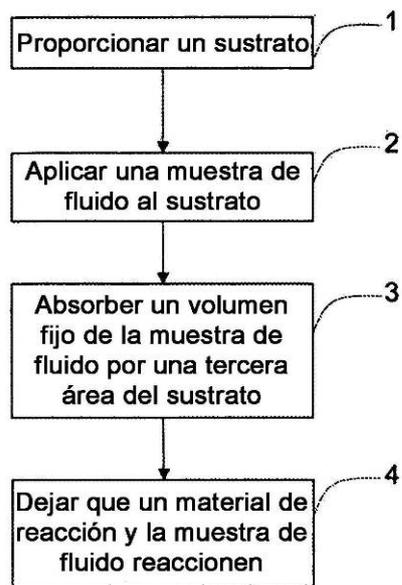


Fig. 1

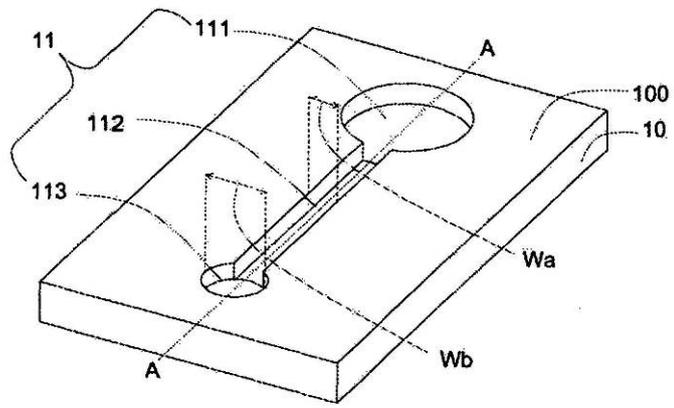


Fig. 2

