

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 501 241**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.1999** **E 06011080 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 1696236**

54 Título: **Dispositivo de recolección para análisis de fluidos orales**

30 Prioridad:

**30.03.1998 US 79958 P**

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

**01.10.2014**

73 Titular/es:

**ORASURE TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)  
150 WEBSTER STREET  
BETHLEHEM, PA 18015, US**

72 Inventor/es:

**MINK, RONALD WILLIAM;  
GOLDSTEIN, ANDREW SHERMAN y  
BOHANNON, ROBERT C.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 501 241 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 de recolección para análisis de fluidos orales

5 La invención se refiere al análisis de fluidos orales típicamente cromatografía de tira lateral. Se revela un formato de análisis rápido de una etapa, en línea continua, adecuado para recolección de muestras orales y realización de pruebas de muestras orales. Más particularmente, se revela una matriz capilar hidrófila como un transporte para los fluidos orales a una tira cromatográfica lateral. Esto permite el análisis rápido de fluidos orales mientras se mantiene en la boca de un paciente un dispositivo de prueba desechable.

10 Se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos para determinar la presencia o la ausencia y/o para cuantificar la cantidad de diversos analitos en tejidos y fluidos de organismos. Actualmente la mayoría de la realización de pruebas diagnósticas se realiza bien con sangre, bien con orina, bien con materia fecal o bien con biopsia tisular. Sin embargo, la realización de pruebas basadas en estos materiales implica invasión sustancial de la privacidad y plantea un riesgo para la seguridad significativo (particularmente con la realización de pruebas de sangre). Por el contrario, la recolección de fluido oral incluyendo saliva y/o transudado de mucosa para realización de pruebas implica una invasión relativamente pequeña de la privacidad, es relativamente segura y puede realizarse rápidamente con relativa facilidad.

20 La idea de usar fluido oral en un procedimiento de detección se lleva tratando durante algún tiempo en la investigación científica y clínica. Una multitud de investigadores han investigado el uso de fluido oral como una posible muestra clínica para el diagnóstico de estados patológicos específicos o una actividad metabólica alterada (véase, p. ej., *Annl. New York Acad. Sci.*, vol. 694: Saliva as a Diagnostic Fluid, Malamud y Tabak, eds., N. Y. *Acad. Sci. Pub.* (1993)). Hay un predominio de evidencia que sugiere que los fluidos orales podrían ser muestras extremadamente útiles para la detección de ciertos analitos. La premisa tecnológica básica es que los analitos presentes en la sangre pasarán a través de la mucosa oral y/o las glándulas salivales a la cavidad oral en la que pueden detectarse. Además se supone que la concentración de analito en el fluido oral será indicativa de la concentración en sangre. Existe por tanto interés considerable en el desarrollo de dispositivos para la recolección, el transporte y el manejo de muestras de fluidos orales y en el desarrollo de análisis basados en fluidos orales; en particular análisis para diversos anticuerpos y metabolitos.

25 Típicamente en pruebas realizadas con muestras tales como sangre, orina o material fecal, hay un abundante suministro de material de prueba y volúmenes elevados de analitos están disponibles para análisis. Además, dado que los análisis de tales materiales se realizan fuera del cuerpo, no hay problema de contaminación del cuerpo con los reactivos de análisis.

30 Esto se ilustra, por ejemplo, en el dispositivo de análisis descrito por de Zoeten *et al.* patente estadounidense 5.611.995 expedida el 18 de marzo de 1997. En este dispositivo se suministra un cuerpo absorbente con un mango y se mantiene en la corriente de orina que está siendo expulsada del cuerpo. Cuando se satura el cuerpo absorbente, este se introduce después en un dispositivo de sujeción que tiene una tira reactiva. La almohadilla saturada entra en contacto con una tira de prueba, se comprime y se deposita la orina sobre la tira de prueba para ponerse a prueba. Un espacio en el lateral del dispositivo de sujeción que sostiene la tira reactiva garantiza la evaporación de fluido en exceso para evitar reflujo a lo largo de la tira de prueba.

35 Los análisis de muestras biológicas previamente descritos, en concreto los análisis para analitos en fluido oral, han requerido típicamente al menos dos acciones diferentes. Primero, se recolecta la muestra, p. ej., sangre, u orina. Luego la muestra recolectada bien se almacena, p. ej., para un análisis posterior en un laboratorio, o bien se somete a análisis en o por un dispositivo de análisis que es típicamente un dispositivo distinto al dispositivo de recolección. Tales análisis, que requieren múltiples componentes, son habitualmente costosos de fabricar e incómodos para uso doméstico.

40 Además, particularmente con respecto a la realización de análisis de muestras de fluidos orales, el fluido oral es a menudo escaso, particularmente en circunstancias donde el sujeto de análisis está estresado (p. ej., cuando se pone a prueba en busca de drogas de abuso o de enfermedades que supongan una amenaza para la vida), lo que puede hacer difícil usar tales análisis de múltiples componentes. Además, los intentos para estimular la producción de fluidos orales (p. ej., mediante el uso de ácido cítrico u otros agentes de salivación) resultan en producción de saliva incrementada lo que realmente puede diluir la concentración de analito.

45 Cuando se usan las almohadillas absorbentes típicas para recuperar fluido oral, las almohadillas típicamente deben comprimirse para liberar el fluido oral retenido. Las manipulaciones asociadas con la etapa de compresión pueden resultar en la contaminación de la muestra. Además, tales lechos cortos «tradicionales» tienen un volumen hueco significativo, lo que requiere que a menudo la muestra se recolecte en un volumen significativamente mayor del realmente requerido para el propio análisis de los analitos.

50 La presente invención se especifica en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona mejores dispositivos y procedimientos para una recolección de fluido oral de una etapa y una detección y/o cuantificación de analitos en el fluido oral. Los dispositivos y los procedimientos requieren

volúmenes extremadamente bajos de fluido oral y no requieren una manipulación posterior de las muestras tras la recolección. La recolección adecuada de la muestra se verifica inmediatamente y el riesgo de contaminación de la muestra se minimiza. Los análisis son directos, rápidos y no requieren etapas complicadas. Los dispositivos y los procedimientos son por tanto idealmente adecuados para su uso en hogares, en entornos laborales o de oficina y generalmente no requieren la presencia de personal médico cualificado.

A diferencia de los dispositivos de recolección de fluido oral de la técnica anterior que típicamente utilizan un lecho corto absorbente hecho de papel, celulosa, algodón o esponja y que requieren la compresión de la almohadilla de recolección para liberar la muestra de fluido oral, los dispositivos de la presente invención utilizan una matriz capilar relativamente rígida, también denominada como una matriz capilar. La matriz capilar, cuando se introduce en la cavidad oral de un mamífero (p. ej., un ser humano) rápidamente absorbe el fluido oral (p. ej., mediante la acción capilar) y lo administra en el área receptora de una tira de cromatografía de flujo lateral. El fluido oral se libera rápidamente de la matriz capilar a la tira de cromatografía de flujo lateral sin ninguna manipulación (p. ej., compresión) de la matriz.

En una realización la presente invención proporciona un aparato para la cromatografía de flujo lateral de un fluido oral. El aparato comprende una matriz capilar que tiene expuesta una superficie para la inserción en una cavidad oral; y una tira de cromatografía de flujo lateral donde la tira de cromatografía de flujo lateral está unida a la matriz capilar de tal forma que cuando la matriz capilar entra en contacto con una mucosa oral de una cavidad oral, la matriz capilar absorbe el fluido oral y administra el fluido oral en una zona receptora de una tira de cromatografía de flujo lateral. En otra realización, el aparato comprende una matriz capilar que tiene expuesta una superficie para recibir el fluido oral; y una tira de cromatografía de flujo lateral donde la tira de cromatografía de flujo lateral está en comunicación con la matriz capilar tal que cuando la matriz capilar recibe el fluido oral, la matriz capilar absorbe el fluido oral y administra el fluido oral en una zona de recepción de dicha tira de cromatografía de flujo lateral.

En una realización preferida, la matriz capilar está compuesta de un material diferente del material que comprende la tira de cromatografía de flujo lateral o la zona de recepción o la almohadilla para muestras de tal tira. La matriz capilar está compuesta de un material tal que la saturación de la matriz capilar con un fluido oral no altere sustancialmente la morfología de la matriz capilar. De ese modo, ni el tamaño medio de poro ni el volumen hueco de la matriz capilar se altera sustancialmente. Además, el volumen de la matriz capilar es sustancialmente constante. La saturación de la matriz capilar, por lo común, ejerce un cambio volumétrico menor que menos del 30 %, preferiblemente, menor del 25 %, más preferiblemente, menor del 20 % y lo más preferible menor de aproximadamente el 15 %, el 10 %, el 5 % o incluso menor de aproximadamente el 1 %. La matriz capilar tiene preferiblemente un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente, de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  y lo más preferible, de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 120  $\mu\text{m}$  y un volumen hueco de menos de aproximadamente 60  $\mu\text{l}/\text{cm}^3$ . Los materiales de la matriz porosa particularmente preferidos tienen tamaños de poro que varían de aproximadamente 45  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 90  $\mu\text{m}$ , de aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 130  $\mu\text{m}$  o de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  a 120  $\mu\text{m}$ . Los materiales preferidos de la matriz capilar son plásticos (p. ej., matrices porosas de un polietileno de alta densidad (HDPE), un polietileno de peso molecular ultra elevado (UHMW), un polipropileno (PP), un fluoruro de polivinilideno (PVDF), un politetrafluoroetileno (PTFE), un nailon 6 (N6) o una polietersulfona (PES)). Los plásticos pueden ser hidrófilos o estar tratados (p. ej., con un tensioactivo tal como N-metil-cocoil-taurato de sodio) para que sean hidrófilos.

En una realización preferida, la matriz capilar, cuando entra en contacto con una mucosa oral absorbe el fluido oral desde dicha cavidad oral y libera inmediatamente ese fluido oral en dicha zona de recepción de dicha tira de cromatografía de flujo lateral en menos de aproximadamente 1 minuto sin compresión, alteración de la presión del fluido o del aire u otra manipulación del material de la matriz. La administración comprende aproximadamente de 100  $\mu\text{l}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{l}$  de fluido oral a administrarse en dicha tira de cromatografía de flujo lateral en menos de aproximadamente 1 minuto. La matriz capilar, cuando entra en contacto con una mucosa oral, absorbe el fluido oral de la cavidad oral y libera dicho fluido oral en dicha zona de recepción de dicha tira de cromatografía de flujo lateral, preferiblemente en menos de aproximadamente 30 segundos. En estas condiciones, la matriz capilar se satura preferiblemente con un fluido oral en menos de aproximadamente 1 minuto y la saturación comúnmente utiliza menos de aproximadamente 500  $\mu\text{l}$  de fluido oral. En términos generales, la matriz capilar liberará suficiente fluido oral como para saturar la zona de recepción de la tira cromatográfica.

El aparato puede incluir además opcionalmente una tira de bloqueo colocada entre la matriz capilar y la tira cromatográfica de flujo lateral. La tira de bloqueo puede contener un reactivo de bloqueo (p. ej., BSA, desoxicolato, n-laurilsarcosina de sodio, etc.) y/o uno o más tampones. La tira de bloqueo también puede evitar el reflujo de los reactivos desde la tira de cromatografía de flujo lateral hacia la matriz capilar.

El aparato puede incluir además opcionalmente una tira de conjugado que contiene uno o más reactivos cromatográficos (p. ej., micropartículas marcadas). Además, una única tira puede servir como una tira de bloqueo y como una tira de conjugado.

El aparato puede comprender además una carcasa que tenga una cavidad, en la que dicha tira cromatográfica de flujo lateral se extienda en la cavidad a lo largo de la carcasa hasta un punto de inspección sobre la carcasa; y al

menos un punto de inspección desde un exterior de la carcasa hasta la tira cromatográfica lateral para permitir la inspección visual de los reactivos en los puntos seleccionados sobre la tira cromatográfica lateral. La carcasa puede actuar como un mango para introducir la matriz capilar en la cavidad oral.

5 En una realización particularmente preferida, se revela el dispositivo de análisis que comprende un formato de análisis rápido de una etapa, en línea continua y de una única unidad adecuado para la recolección y prueba de muestras orales. Más particularmente, se proporciona una matriz capilar hidrófila como un transporte para fluidos orales hasta una tira cromatográfica lateral. La tira cromatográfica lateral se sitúa en una cavidad definida en una carcasa y se dispone a lo largo de la carcasa hasta una zona de inspección. Una matriz capilar hidrófila sobresale de la carcasa hasta una zona de recolección oral exterior de la carcasa en un extremo y se comunica con la tira cromatográfica lateral en el otro extremo. Esta matriz capilar hidrófila define una matriz de conductos definidos entre materiales no absorbentes, tales como bien esferas de plástico o bien espumas. Las superficies exteriores de la matriz son hidrófilas bien por ser naturalmente hidrófilas o bien por estar tratadas para que sean hidrófilas. La dimensión de la matriz intersticial es tal que las fuerzas de la acción capilar producen la extracción inmediata de los materiales en la matriz capilar hidrófila. La matriz capilar hidrófila libera fácilmente el fluido oral en la tira cromatográfica lateral. La prevención del reflujo hacia la cavidad oral desde la tira cromatográfica lateral ocurre de forma natural debido al conducto de flujo sinuoso del material de absorción poroso. Mediante la observación de la tira cromatográfica lateral mientras todo el dispositivo de prueba está en la boca se obtienen los resultados de la prueba inmediatos.

20 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento de detección o de cuantificación de uno o más analitos en un fluido oral. El procedimiento implica las etapas de: i) introducir en la cavidad oral de un mamífero cualquiera de los aparatos de análisis de fluido oral descritos en el presente documento de manera que la matriz capilar entre en contacto con una superficie de la mucosa oral por lo que la matriz capilar absorbe el fluido oral y administra el fluido oral en una zona de recepción de una tira de cromatografía de flujo lateral; e ii) leer una señal sobre la tira de cromatografía de flujo lateral que indica la presencia la ausencia o la cantidad de uno o más analitos.

25 La presente invención también proporciona equipos para la detección de un analito en un fluido oral. Los equipos incluyen un aparato para la recolección y la cromatografía de flujo lateral de un fluido oral como se describe en el presente documento y los materiales de información que describen el uso del aparato.

### Definiciones

30 Como se usa en el presente documento, el término «analito» se usa para referirse a un resto que va a detectarse en un análisis particular. Los analitos pueden ser átomos (elementos), moléculas o grupos de moléculas. Los analitos comúnmente detectados en los análisis de la presente invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, antígenos, factores de crecimiento, enzimas, fármacos terapéuticos, drogas de abuso y similares. Los analitos particularmente preferidos incluyen anticuerpos y antígenos relevantes para enfermedad infecciosa y para enfermedad no infecciosa.

35 Como se usa en el presente documento, un «anticuerpo» se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de las regiones de las constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los miles de genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o bien como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

40 Se sabe que la unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) básica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena «ligera» (de aproximadamente 25 kD) y una cadena «pesada» (de aproximadamente 50–70 kD). El terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos fundamentalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_P$ ) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

45 Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro de la región bisagra para producir  $F(ab)'_2$ , un dímero de Fab que él mismo es una cadena ligera unida a  $V_P-C_P1$  mediante un enlace disulfuro. El  $F(ab)'_2$  puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo así el dímero  $F(ab)'_2$  en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993) para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo).  
50 Mientras que diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto advertirá que tales fragmentos de Fab' pueden sintetizarse *de novo* bien químicamente o bien utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento también incluye fragmentos de anticuerpo bien producidos mediante la modificación de anticuerpos enteros o bien sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante.

El término «fluido oral», como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fluidos encontrados en la cavidad oral individualmente o en combinación. Estos incluyen, pero no se limitan a la saliva y el transudado de mucosa. Se reconoce que el fluido oral (p. ej., saliva) puede comprender una combinación de fluidos procedentes de un número de fuentes (p. ej., la glándula parótida, la glándula submandibular, la glándula sublingual, las glándulas accesorias, la mucosa gingival y la mucosa bucal) y el término fluido oral incluye los fluidos procedentes de cada una de estas fuentes individualmente, o en combinación. El término saliva se refiere a una combinación de fluidos orales tal como la que se encuentra típicamente en la boca, en concreto tras la masticación. El término «transudado de mucosa», como se usa en el presente documento, se refiere al fluido producido mediante la difusión pasiva de los componentes del suero desde los intersticios de la mucosa oral en la cavidad oral. El transudado de mucosa habitualmente forma un componente de la saliva.

Los términos «matriz capilar» y «matriz porosa» se usan en el presente documento para referirse a un material muy poroso caracterizado por un tamaño de poro suficientemente pequeño como para que el material absorba rápidamente solución acuosa (p. ej., de fluido oral) predominantemente mediante la acción capilar o «efecto mecha».

El término «efecto mecha» se usa para referirse a la captación de un fluido predominantemente por adsorción y acción capilar.

El término «tira de cromatografía de flujo lateral» se refiere a una tira reactiva utilizada para la cromatografía de flujo lateral. Los análisis de flujo lateral (cromatografía) implican la aplicación de una muestra de prueba de líquido sospechosa de contener un analito para detectarse en una zona de aplicación de una tira de prueba reactiva de flujo lateral (inmuncromatográfica). La tira está compuesta de un material matricial (p. ej., papel, nitrocelulosa, etc.), véase, p. ej., la patente estadounidense n.º: 5569608) a través del que el fluido de prueba y el analito suspendido o disuelto en el mismo puede fluir por acción capilar desde la zona de aplicación hasta una zona de detección donde una señal visible, o la ausencia de tal señal, revela la presencia o la ausencia del analito. Donde la detección del analito utiliza un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, el análisis puede referirse como un análisis de inmuncromatografía de flujo lateral y la tira una tira de inmuncromatografía de flujo lateral.

Una «zona de recepción o lecho corto para muestras de dicha tira de cromatografía de flujo lateral» se refiere a la zona de la tira de cromatografía de flujo lateral en la que se aplica primero una muestra.

Una «señal sobre dicha tira de cromatografía de flujo lateral» se refiere a una indicación, típicamente en una determinada región predefinida de la tira de cromatografía que indica la presencia, la ausencia, o una cantidad de analito, o la cantidad suficiente de muestra en la tira de cromatografía. La señal puede ser colorimétrica, fluorescente, electroluminiscente, radiactiva, etc.

Como se usa en el presente documento, «carcasa» se refiere a cualquier miembro que revista o sostenga pero que no reaccione con la tira cromatográfica de flujo lateral.

Como se usa en el presente documento, «cavidad» se refiere a cualquier volumen de recepción sobre o dentro de la carcasa para sujetar la tira cromatográfica lateral.

La «tira cromatográfica de flujo lateral» es cualquier miembro absorbente capaz de transportar analito y reactivos a la zona de inspección visual. La tira puede ser nitrocelulosa, acetato de celulosa, papel, nailon, celulosa o cualquier otro material absorbente adecuado.

Como se usa en el presente documento, «un inmunoanálisis» es un análisis que utiliza un anticuerpo o un antígeno para unirse específicamente al analito. El inmunoanálisis se caracteriza por el uso de la unión específica a un anticuerpo particular a diferencia de otras propiedades físicas o químicas para aislar, dirigirse al y cuantificar el analito.

La expresión «que se une específicamente a un analito» o «específicamente inmunoreactivo con», cuando se refiere a un anticuerpo se refiere a una reacción de unión es determinante de la presencia del analito en presencia de una población heterogénea de moléculas tales como proteínas y otros compuestos biológicos (es decir, tales como los que se pueden encontrar en el fluido oral). Por lo tanto, según las condiciones de inmunoanálisis designadas, los anticuerpos especificados se unen a un analito particular y no se unen en una cantidad significativa a otros analitos presentes en la muestra. Se puede usar una diversidad de formatos de inmunoanálisis para seleccionar los anticuerpos específicamente inmunoreactivos con un determinado analito. Por ejemplo, los inmunoanálisis de ELISA en fase sólida se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunoreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane (1988) «Antibodies, A Laboratory Manual», *Cold Spring Harbor Publications*, Nueva York, para una descripción de los formatos y las condiciones de inmunoanálisis que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica.

Una «etiqueta» es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las etiquetas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (p. ej., Dynabeads®), tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radioetiquetas (p. ej., <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C o <sup>32</sup>P), enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente usadas en ELISA) y las etiquetas colorimétricas tales como

las perlas de oro coloidal o de vidrio coloreado o de plástico (p. ej., poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las patentes estadounidenses n.ºs: 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Los medios para detectar tales etiquetas se conocen por aquellos expertos en la técnica. Así, por ejemplo, las radioetiquetas se pueden detectar usando una película  
5 fotográfica o contadores de centelleo, los marcadores fluorescentes se pueden detectar usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Las etiquetas enzimáticas se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato y las etiquetas colorimétricas se detectan simplemente visualizando la etiqueta coloreada.

La fig. 1 es una realización esquemática de un dispositivo de recolección oral de esta revelación que ilustra en general de izquierda a derecha una mecha para el transporte de fluidos orales, un lecho corto de bloqueo, la almohadilla de conjugado de oro, la tira cromatográfica lateral con una ventana de observación y finalmente un lecho corto de absorción final todo contenido en una carcasa simple;

la fig. 2 es una realización esquemática de un dispositivo de recolección de muestras orales alterno similar al de la fig. 1, que omite la almohadilla de bloqueo y que tiene el conjugado de oro aplicado en el extremo del material de la mecha; y

la fig. 3 es una representación tridimensional del dispositivo de prueba con la cubierta de la mecha retirada para usar en la cavidad oral de un ser humano.

La presente invención proporciona un dispositivo para la recolección y detección, de una etapa, rápidas de analitos en fluido oral. En una realización preferida, el dispositivo se introduce en la cavidad oral (p. ej., preferiblemente yuxtapuesto a la mucosa oral) donde absorbe fluido oral. Tras un período de tiempo, se separa el dispositivo de la cavidad oral y se leen uno o más indicadores contenidos en el dispositivo (p. ej., mediante inspección visual o mediante detección en un «lector») para proporcionar una indicación de la presencia o la ausencia, y/o la cantidad de uno o más analitos de interés. El dispositivo proporciona de este modo un análisis no invasivo, de una etapa, rápido para la detección de uno o más analitos de interés.

Los dispositivos y los procedimientos de análisis de la presente invención pueden usarse para la detección (positiva o negativa y/o para la cuantificación) de casi cualquier analito presente en fluido oral. Además, los dispositivos y los procedimientos pueden usarse para detectar uno o más analitos simultáneamente. Tales analitos pueden incluir, pero no se limitan a, los anticuerpos del VIH, los anticuerpos del VLTH, los anticuerpos de *Helicobacter pylori*, los anticuerpos de la hepatitis, los anticuerpos del sarampión, los anticuerpos de las paperas, los anticuerpos de la rubéola, la cotinina, la cocaína, la benzoilecgonina, la benzodiacepina, el tetrahidrocanabinol, la nicotina, la teofilina de etanol, la fenitoína, el acetaminofeno, el litio, el diazepam, la nortriptilina, el secobarbital, el fenobarbital, la teofilina, la testosterona, el estradiol, la 17-hidroxiprogesterona, la progesterona, la tiroxina, la hormona estimulante de los tiroides, la hormona estimulante de los foliculos, la hormona luteinizante, el factor de crecimiento transformante de tipo alfa, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de tipo insulina I y II, el factor de inhibición de la liberación de hormonas de crecimiento, la IgA y la globulina de unión a las hormonas sexuales; y otros analitos que incluyen glucosa, colesterol, cafeína, colesterol, globulina de unión a corticosteroides, AEP o glicoproteína de unión a DHEA, siendo los procedimientos particularmente adecuados para la detección de los anticuerpos del VIH.

El dispositivo de análisis de la presente invención depende de la cooperación exclusiva entre una matriz capilar (W en la figura 1) y una tira cromatográfica de flujo lateral (C en la figura 1). El dispositivo está construido de tal forma que la matriz capilar pueda introducirse en la cavidad oral y en una realización preferida, yuxtapuesta a la mucosa oral. La matriz capilar actúa como un cuerpo receptor o un lecho corto que absorbe (absorbe) rápidamente el fluido oral, p. ej., mediante la acción capilar y administra el fluido oral a una tira de inmunocromatografía de flujo lateral (p. ej., C en la figura 1). La tira de inmunocromatografía proporciona entonces una indicación de la presencia, la ausencia o la cantidad de uno o más analitos en el fluido oral.

El dispositivo puede estar convenientemente ensamblado tal que la matriz capilar comprende un lecho corto receptor para inserción en la cavidad oral, mientras que la tira de inmunocromatografía de flujo lateral comprende el mango del dispositivo. Una o más zonas del mango pueden comprender indicadores para la lectura (p. ej., de una señal colorimétrica) de los resultados del análisis. Por supuesto, otros formatos del dispositivo son adecuados y se reconocerán fácilmente por aquellos expertos en la técnica.

#### 50 **Matriz capilar**

El material de la matriz capilar (matriz porosa) se selecciona preferiblemente para proporcionar un número de propiedades únicas al dispositivo de análisis. Tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, un volumen hueco relativamente bajo, un tamaño de poro suficiente para proporcionar administración rápida y eficaz del fluido oral a la tira reactiva, la reactividad baja o no reactividad con el fluido oral o los analitos, liberación fácil del fluido oral en la tira reactiva inmunocromatográfica y lecho corto de recolección no deformable (cuando se humedece).

Debido a que el fluido oral puede ser escaso (a los pacientes a menudo se les queda «la boca seca» durante la prueba), es deseable maximizar la cantidad de fluido oral que se transporta desde la cavidad oral (p. ej., la mucosa oral) a la tira de cromatografía de flujo lateral. Esto se consigue mediante el uso de una matriz capilar que tiene un

volumen hueco mínimo. La matriz capilar debería tener un volumen hueco de menos de aproximadamente el 65 %/cm<sup>3</sup>, preferiblemente de menos de aproximadamente el 57 %/cm<sup>3</sup>, más preferiblemente, de menos de aproximadamente el 48 %/cm<sup>3</sup>, y lo más preferible de menos del aproximadamente el 40 %/cm<sup>3</sup>, el 35 %/cm<sup>3</sup> o incluso el 25 %/cm<sup>3</sup>. Las matrices capilares que tienen volúmenes huecos tan bajos administran típicamente una cantidad significativa de fluido oral absorbido a la tira de cromatografía de flujo lateral.

La propia matriz debe ser de una dimensión relativamente pequeña. Específicamente, es preferible que los intersticios sean de una dimensión en la que las fuerzas capilares hagan que el fluido sea atraído dentro la matriz capilar. De ese modo, la matriz capilar también se selecciona para que tenga un tamaño medio de poro lo suficientemente pequeño como para proporcionar una captación rápida del fluido oral con el que está en contacto (p. ej., mediante la acción capilar). El tamaño de poro pequeño también funciona para excluir el material particulado presente en la muestra de fluido. Sin embargo, también se selecciona el tamaño de poro para que sea lo suficientemente grande como para que el fluido oral viscoso no obstruya la matriz capilar y en cambio se transporte rápidamente a través de la matriz hasta la almohadilla de cromatografía de flujo lateral. Los materiales preferidos tienen un tamaño medio de poro que varía de aproximadamente 40 µm a aproximadamente 250 µm, más preferiblemente, de aproximadamente 60 µm a aproximadamente 200 µm y lo más preferible, de aproximadamente 80 µm a aproximadamente 120 µm.

Además de tener un tamaño de poro (tamaño del canal) que resulte en una captación rápida del fluido oral, las superficies de la matriz capilar deberían ser químicamente compatibles con la absorción rápida del fluido oral. Por lo tanto, los propios materiales de la matriz capilar son hidrófilos o están tratados para que sean hidrófilos (p. ej., mediante la adición de un tensioactivo también denominado detergente o agente humectante). Es decir, el agua debe fluir por y atraerse hacia las superficies de estos materiales.

Mientras que hay un número de materiales adecuados que son naturalmente hidrófilos (p. ej. vidrio sinterizado limpio o perlas de vidrio fundido), otros materiales adecuados (p. ej., plásticos) son típicamente hidrófobos (p. ej., no se humedecen fácilmente). Sin embargo, tales materiales hidrófobos pueden tratarse rutinariamente con un agente humectante (es decir, tensioactivo / detergente) y de ese modo volverlos hidrófilos (humedecibles). Sin embargo, como la matriz capilar se usa en la cavidad oral, se requiere que el detergente de tratamiento se conozca como no nocivo para el sujeto mamífero (p. ej., para el cuerpo humano) y que, preferiblemente, esté aprobado para tal uso por la autoridad reguladora pertinente (p. ej., Food and Drug Administration). En otra realización preferida, es posible volver un material de plástico poroso (p. ej., espuma de polietileno o de polipropileno) hidrófilo tomando el material de la matriz sin tratar y colocándolo en una solución acuosa diluida de un detergente autorizado tal como N-metil-cocoil-taurato de sodio. Después de ello, se seca el material tratado, dejando las superficies de la matriz aparentemente revestidas de una capa fina de detergente.

Aunque se prefiere el N-metil-cocoil-taurato de sodio, se apreciará que también se pueden usar otros detergentes. Solo se requiere que el detergente por la seguridad de la exposición oral del mamífero, no interfiera con la prueba sobre la tira cromatográfica lateral C y produzca las propiedades hidrófilas requeridas sobre las superficies exteriores de la matriz.

Además de para absorber y transportar rápidamente el fluido oral hacia la tira de cromatografía de flujo lateral, el material de la matriz capilar se selecciona para que preferiblemente libere inmediatamente el fluido en la tira de cromatografía. Esto debería conseguirse rápidamente sin la compresión del propio material de la matriz. Por lo tanto, en una realización preferida, la matriz capilar administra y libera el fluido oral en la tira de cromatografía de flujo lateral sin ninguna manipulación (p. ej., sin apretar ni comprimir la matriz capilar).

A partir de lo anterior, debería resultar claro que los materiales preferidos de la matriz capilar tienen un espaciado intersticial que facilita la absorción del fluido oral a través de la atracción capilar en combinación con la adsorción sobre el material. Esto causa que el fluido oral recogido de la boca sea transportado a la tira cromatográfica lateral en lugar de quedarse en la boca. Al mismo tiempo, cuando el fluido oral llega a la tira cromatográfica lateral, se absorbe por la tira en lugar de permanecer en la matriz capilar.

En una realización preferida, la matriz capilar hidrófila es una matriz esencialmente no absorbente que absorbe el líquido por acción capilar. En tal absorción, el volumen del material no se afecta apreciablemente. Además, el material de la matriz capilar es relativamente rígido tal que su morfología permanece esencialmente invariable durante el análisis (p. ej., cuando se satura con fluido oral). Por lo tanto, la saturación de la matriz con un fluido oral no altera sustancialmente el tamaño medio de poro ni el volumen hueco de la matriz porosa. Además, la saturación de la matriz capilar con un fluido oral da como resultado un cambio de volumen de menos del 30 %, preferiblemente, de menos del 25 %, más preferiblemente de menos del 20 % y lo más preferible menos de aproximadamente el 15 %, el 10 %, el 5 % o incluso menos de aproximadamente el 1 %.

En una realización particularmente preferida, la matriz capilar puede actuar como una barrera frente al reflujo de los reactivos desde la tira de cromatografía de flujo lateral hacia la matriz capilar. Esto se puede conseguir, por ejemplo, cuando la tira cromatográfica tenga un mayor volumen para el almacenamiento de fluido que la matriz capilar. Además o alternativamente, cuando la tira de cromatografía de flujo lateral es más hidrófila que la matriz capilar la matriz capilar también puede actuar como una barrera frente al reflujo.

Los materiales de la matriz capilar se seleccionan de tal manera que no sean químicamente reactivos bien con el fluido oral o bien con los analitos contenidos en el mismo. Los materiales de las matrices compatibles con el fluido oral se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, vidrio, resinas y diversos plásticos.

5 En una realización preferida, las propiedades anteriormente descritas se consiguen mediante el uso de materiales plásticos porosos para la matriz capilar. Los materiales plásticos porosos adecuados incluyen, pero no se limitan a, matrices porosas de polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de peso molecular ultra elevado (UHMW), polipropileno (PP), fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE), nailon 6 (N6) y polietersulfona (PES). En una realización preferida, los materiales de la matriz porosa bien son hidrófilos por sí mismos (tal como para absorber fácilmente el fluido oral) o bien se tratan (p. ej., con un tensioactivo / detergente) para que sean hidrófilos.

15 Tales plásticos porosos se encuentran comercialmente disponibles (véase, p. ej., Porex Technologies, Fairburn, GA). Los plásticos porosos particularmente preferidos son polietileno y/o polipropileno tratado con detergente (tensioactivo). El tratamiento normalmente implica empapar la matriz capilar en un tensioactivo / detergente y luego dejarla secar de forma natural o forzar el secado del material.

20 Los materiales de la matriz porosa particularmente preferidos son Porex X-4588, 80-120 µm de tamaño de poro de 80-120 µm a un espesor de 0,061 cm (0,024 pulgadas) de polipropileno. Asimismo, son adecuados el Porex X-4903 a un espesor de 0,159 cm (0,0625 pulgadas), tamaño de poro de 45-90 µm y el Porex X-4913 a un espesor de 0,159 cm (0,0625 pulgadas) y un tamaño de poro de 90-130 µm. En una realización preferida, se tratan estos materiales con N-metil-cocoil-taurato de sodio. Los materiales de la matriz capilar se empapan en el detergente que luego se seca sobre la superficie que comprende la matriz porosa.

Se apreciará que los materiales de Porex7 que se utilizan no retienen grandes volúmenes de fluido oral. Por ejemplo, se consideran los siguientes datos:

Volumen hueco del Porex

25 **Tabla 1.** Volumen hueco del Porex® X-4903.

Poros medio

Porex X-4903 1 cm x 1 cm x 0,1588 cm

n.º	Peso seco (g)	Peso + H <sub>2</sub> O (g)	Peso de H <sub>2</sub> O (g)	% de volumen / cm <sup>3</sup>
1	0,0791	0,1595	0,0804	50,63
2	0,0745	0,1480	0,0735	46,28
3	0,0746	0,1480	0,0734	46,22
4	0,0767	0,1503	0,0736	46,35
5	0,0762	0,1503	0,0741	46,66
		Media	0,0750	47,23

30 **Tabla 2.** Volumen hueco del Porex® X-4913.

Poros grueso

Porex X-4913 1 cm x 1 cm x 0,1588 cm

n.º	Peso seco (g)	Peso + H <sub>2</sub> O (g)	Peso de H <sub>2</sub> O (g)	% de volumen / cm <sup>3</sup>
1	0,0782	0,1670	0,0888	55,92
2	0,0803	0,1723	0,0920	57,93
3	0,0806	0,1700	0,0894	56,30

4	0,0851	0,1818	0,0967	60,89
---	--------	--------	--------	-------

(continuación)

n.º	Peso seco (g)	Peso + H <sub>2</sub> O (g)	Peso de H <sub>2</sub> O (g)	% de volumen / cm <sup>3</sup>
5	0,0747	0,1593	0,0846	53,27
		Media	0,0903	56,86

En lo anterior, suponemos que 1 cm<sup>3</sup> = 1 ml = 1 g de H<sub>2</sub>O

Al mismo tiempo, la matriz capilar hidrófila W no tiene una retención relativa del fluido oral elevada. Por ejemplo, entrega inmediatamente su fluido a la tira cromatográfica lateral C y al lecho corto absorbente A. Se apreciará que la matriz capilar hidrófila W actúa más como un conducto que como un absorbente; el material se descarga inmediatamente de la mecha.

#### Identificación de los materiales adecuados para la matriz porosa

Se apreciará que la velocidad de la captación, del transporte al lecho corto de cromatografía de flujo lateral y de la liberación en la almohadilla del fluido oral es función tanto de la composición de la matriz capilar como de su forma (p. ej., la superficie expuesta a la mucosa oral, la superficie transversal y la superficie en contacto con la tira de cromatografía de flujo lateral). Las velocidades también se ven afectadas por el tamaño medio de poro, la hidrofiliidad del material de la matriz capilar y las características de absorbancia relativa de la matriz capilar y la almohadilla de cromatografía de flujo lateral.

Es posible optimizar estos parámetros según procedimientos habituales conocidos por aquellos expertos en la técnica. En una realización, esto se consigue ensamblando un dispositivo de prueba que tenga el material de matriz capilar deseado y una tira de inmunocromatografía de flujo lateral. Entonces se puede poner en contacto el dispositivo de prueba con una solución de fluido oral de prueba (p. ej. fluido oral natural, o fluido oral sintético, véase, la patente estadounidense 5.695.929 y la que está en tramitación junto con la presente USSN 08/608.431).

La puesta en contacto puede realizarse mediante la introducción real de la parte receptora (p. ej., lecho corto / cara receptora) de la matriz capilar en la cavidad oral y la puesta en contacto con una mucosa oral (p. ej., de un ser humano o de un animal de prueba no humano). Alternativamente, la puesta en contacto puede realizarse tocando la matriz capilar con el fluido de prueba dispuesto sobre una superficie o un bol u otro recipiente, sumergiendo parte de o toda la matriz capilar en el fluido de prueba, o poniendo en contacto la matriz capilar con un cuerpo de prueba (p. ej., una esponja, una tela, un frotis, etc.) impregnado con el fluido de prueba.

Típicamente el fluido oral de prueba estará en contacto con la matriz capilar durante el período de tiempo que se desee ejecutar el análisis (p. ej. menos de 5 minutos) y luego se puede leer la tira de cromatografía de flujo lateral en cuanto a la presencia, la ausencia o la cantidad de analito y/o en cuanto a la cantidad de fluido oral absorbido. De este modo, se determinará si el análisis ofrece sensibilidad y especificidad adecuadas.

Además, es posible determinar el período de tiempo para la absorción del fluido oral en la matriz capilar y la tira de cromatografía de flujo lateral. De manera similar, también se puede establecer el volumen total de muestra requerido para saturar adecuadamente la tira de cromatografía de flujo lateral y la cantidad de fluido retenido por la matriz capilar (p. ej., pesando los diversos componentes antes y después del análisis).

En una realización preferida, la matriz capilar, cuando se introduce y se mantiene en la boca se satura con fluido oral en menos de aproximadamente 5 minutos, preferiblemente en menos de aproximadamente 3 minutos, más preferiblemente, en menos de aproximadamente 1 minuto y lo más preferible en menos de aproximadamente 30 segundos. De manera similar, la matriz capilar liberará suficiente fluido en la tira de cromatografía para ejecutar apropiadamente el análisis (una ejecución del análisis según las especificaciones de la tira cromatográfica) en menos de aproximadamente 10 minutos, preferiblemente, en menos de aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente en menos de aproximadamente 3 minutos y lo más preferible en menos de aproximadamente 2 minutos o incluso en menos de aproximadamente 1 minuto sin compresión de la matriz porosa.

Se fabricará una matriz porosa que se sature con menos de aproximadamente 500:1, con menos de aproximadamente 500 µl, más preferiblemente con menos de aproximadamente 300 µl y lo más preferible con menos de aproximadamente 100 µl.

Se reconocerá que cuando solo se vayan a analizar las propiedades de absorción y de liberación del fluido oral, no hay necesidad de utilizar un análisis cromatográfico completo. El material base de la matriz capilar, la tira de cromatografía de flujo lateral y si se desea, la almohadilla de bloqueo pueden estar ensambladas. Se puede

5 cuantificar la velocidad de absorción y administración del fluido en la almohadilla sumergiendo o poniendo en contacto la almohadilla de la matriz capilar con un fluido de muestra (p. ej., fluido oral natural o sintético) y cuantificando la velocidad de absorción y administración de fluido en la almohadilla y/o la cantidad retenida en la matriz capilar (p. ej., pesando los diversos elementos tras tiempos particulares preseleccionados de exposición al fluido de prueba). Se prefiere una combinación de materiales y elementos con formas que proporcione la administración máxima de un fluido oral desde una mucosa oral a la tira de cromatografía de flujo lateral en el menor tiempo posible.

10 En una realización particularmente preferida, la tira de cromatografía de flujo lateral es una tira de nitrocelulosa (p. ej., Syntron QuickScan 6, Avitar Visualine II, Avitar Technologies, Canton, Massachussets). Una tira cromatográfica típica es una membrana de nitrocelulosa SRHF de Millipore (Millipore Corp., Bedford, Massachussets) que tiene unas dimensiones de 4 mm x 50 mm. Un material de matriz porosa mide 7 mm x 52 mm [0,159 cm (0,0625 pulgadas) de espesor] y se solapa con la membrana de nitrocelulosa en aproximadamente 64 mm<sup>2</sup>. En otra realización, la matriz capilar tiene forma de paleta que tiene una superficie total de aproximadamente 720 mm<sup>2</sup> y se solapa con la tira cromatográfica en aproximadamente 8 mm<sup>2</sup>. El pequeño solapamiento es particularmente muy adecuado en realizaciones que contienen un lecho corto de conjugado ya que sirve para canalizar eficazmente el fluido oral a través dla almohadilla de conjugado.

### Tira de cromatografía de flujo lateral

20 El dispositivo de análisis de la presente invención puede utilizar casi cualquier tira de cromatografía de flujo lateral para la detección y/o la cuantificación del analito o los analitos. Los análisis de cromatografía de flujo lateral se conocen por aquellos expertos en la técnica (véanse, p. ej., las patentes estadounidenses 5.569.608; 5.120.643; 5.656.503; 4.855.240; 5.591.645; la patente británica GB 2204398A y la patente europea EP 0323605 B1) y tales análisis se encuentran comercialmente disponibles al por menor o sobre una base de fabricantes de equipo original para numerosos analitos.

25 Los inmunoanálisis de flujo lateral normalmente suponen la aplicación de una muestra de líquido sospechoso de contener un analito a detectarse en una zona de aplicación de una tira reactiva de flujo lateral (inmuncromatográfica). La tira está compuesta de un material matricial (p. ej., papel, nitrocelulosa, etc., véase, p. ej., la patente estadounidense n.º: 5569608) a través del que el fluido de prueba y el analito suspendido o disuelto en el mismo pueden fluir por capilaridad desde la zona de aplicación a la zona de detección donde una señal visible, o la ausencia de tal señal, revela la presencia o la ausencia del analito.

30 Típicamente, la tira incluirá un medio para unir inmuno específicamente el analito a detectarse con su pareja de unión específica (p. ej., cuando el analito es un antígeno, la pareja de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y viceversa) que lleva una etiqueta detectable. En un esquema tal, como se revela en la patente estadounidense n.º: 4.446.232, la tira contiene una enzima marcada, una pareja de unión móvil para el analito que está en una zona corriente abajo de la zona de aplicación de la muestra. Si el analito está presente en la muestra, se combinará con su pareja de unión marcada para formar un complejo que fluirá a lo largo de la tira hasta una zona de detección que contenga un sustrato para la etiqueta enzimática capaz de proporcionar una señal (p. ej., una respuesta coloreada) en presencia de la etiqueta enzimática.

35 La tira típicamente contiene una zona en la que el analito se inmoviliza, de manera que la pareja de unión marcada que no se combina con el analito, debido a la ausencia de analito en la muestra, se capturará e inhibirá de este modo que alcance la zona de detección. Se han publicado diversas modificaciones de esta técnica, muchas de las cuales suponen algún sistema de unión específica competitiva en el que la presencia o la ausencia del analito en la muestra se determina por la detección o la falta de la misma de pareja de unión marcada en la zona de detección. En la patente estadounidense n.º: 4.868.108 se revela un esquema similar con la adición de un reactivo de captura inmovilizado para la pareja de unión marcada enzimáticamente en la zona de detección para concentrar la etiqueta enzimática y aumentar su capacidad de reaccionar con el sustrato enzimático y volver de este modo al análisis más sensible.

40 No todos los esquemas para la inmuncromatografía se basan en una pareja de unión marcada enzimáticamente / un sustrato enzimático para proporcionar la señal para la detección del analito. En la patente estadounidense n.º: 4.806.311 se revela un dispositivo de prueba con múltiples zonas para la determinación mediante un análisis de unión específica de un analito y una pareja de unión inmovilizada por lo tanto junto con una zona de detección para recibir el reactivo marcado que migra hacia la misma desde la zona reactiva. La zona de detección contiene una forma inmovilizada de una sustancia de unión para el reactivo marcado. El reactivo marcado lleva un grupo químico detectable que tiene una propiedad física detectable que es detectable en base a sus propias propiedades físicas, de tal manera que no requiere una reacción química con otra sustancia. Los ejemplos de tales grupos son especies coloreadas fluorescentes, moléculas fosforescentes, radioisótopos y restos electroactivos. La patente estadounidense n.º: 4.313.734 describe el uso de suelas de oro como etiquetas para anticuerpos que son detectables sin un cambio químico.

Muchos sistemas de inmuncromatografía de flujo lateral utilizan marcadores particulados (microparticulados) (p. ej., gelatina, látex teñido u oro coloidal) que están marcados con una pareja de unión (p. ej., un anticuerpo o un antígeno)

que se une al analito de interés.

Las micropartículas u otros restos detectables unidos a un resto de unión a analitos (p. ej., un anticuerpo o un antígeno) se secan sobre (o se localizan de otro modo en) bien una tira cromatográfica de flujo lateral o bien sobre un lecho corto de aplicación de muestras (típicamente fibra de vidrio) que a su vez está fijado a un extremo de una tira de medio cromatográfico tal como nitrocelulosa. Otro material que se une al analito de interés está fijado al medio cromatográfico en o cerca del extremo opuesto al extremo que tiene la almohadilla de aplicación.

La muestra de líquido a analizarse se coloca en la almohadilla, provocando la suspensión de las micropartículas en el líquido y permitiendo que cualquier analito en la muestra líquida se una al material de unión a analitos unido a las micropartículas. La muestra líquida abandona la almohadilla de aplicación por difusión y acción capilar y comienza a migrar a lo largo de la tira de nitrocelulosa transportando las micropartículas hacia abajo por la tira junto con el líquido. Cuando el líquido que contiene las micropartículas suspendidas llega a la región de la tira cromatográfica que lleva el segundo material de unión, el analito (si está presente en la muestra original) formará un enlace molecular entre el material de unión a analitos que está sobre las micropartículas y el material de unión a analitos fijado a la tira, dando como resultado la inmovilización de las micropartículas en ese punto sobre la tira donde el material de unión a analitos está fijado. Esta inmovilización de las micropartículas da como resultado una señal visible (p. ej., una tira coloreada o una mancha coloreada) en este punto de la tira. Si el analito no está presente en la muestra, las micropartículas continuarán pasando por este punto de la tira cromatográfica y no se producirá ninguna señal visible.

Se apreciará que es posible utilizar otras etiquetas (p. ej., etiquetas fluorescentes) además de micropartículas. Además, una única tira cromatográfica puede contener reactivos para detectar o cuantificar un número de distintos analitos.

También se apreciará que la tira de flujo lateral puede usar una detección de analitos que no implique un sistema de reconocimiento anticuerpo-antígeno. Así, por ejemplo, la tira puede impregnarse en una zona de detección con un producto químico que reacciona con el propio analito para producir una señal.

Los dispositivos de la presente invención pueden estar fácilmente ensamblados con cualquiera de una diversidad de análisis de cromatografía de flujo lateral comercialmente disponibles (p. ej., Syntrol QuickScan 6, Avitar Visualine II, Avitar Technologies, Canton, Massachusetts, etc.).

#### **Tira de bloqueo opcional**

Los dispositivos de análisis de la presente invención pueden incluir opcionalmente un tira de bloqueo entre la matriz porosa y la tira de cromatografía de flujo lateral. La tira de bloqueo puede estar impregnada de tampones para ajustar el pH (p. ej., hasta un pH 7,5) del fluido oral para que sea compatible con el análisis de cromatografía de flujo lateral. La tira de bloqueo también puede incluir uno o más reactivos de bloqueo que reduzcan la unión inespecífica del analito y/o los reactivos del dispositivo de análisis y reduciendo de este modo la aparición de falsos positivos. Los reactivos de bloqueo adecuados incluyen, pero no se limitan a seroalbúmina bovina (ASB), desoxicolato y n-lauroilsarcosina. En una realización particularmente preferida, la solución de bloqueo incluye: alcohol polivinílico al 4 % (PM: 10 kd (Aldrich 36.062-2); n-lauroilsarcosina de sodio al 4 % (Sigma L5777), polivinilpirrolidona al 2 % (PM: 10 kd, Sigma P2263) en 60 X Tris EDTA (Sigma T9285) o n-lauroilsarcosina de sodio al 7,5 % (Sigma L5777), tectronic 1307 al 2,5 % (BASF), compuesto de polietilenglicol al 0,0001 % (Sigma P2263) en 100 x tampón de Tris EDTA (Sigma T9285).

La almohadilla de bloqueo puede estar compuesta de una amplia diversidad de materiales siempre y cuando no impidan el flujo del fluido oral desde la matriz capilar a la tira de cromatografía de flujo lateral. Tales materiales incluyen, pero no se limitan a, papel, celulosa, nitrocelulosa y similares. Los materiales particularmente preferidos se seleccionarán para reducir o eliminar el reflujo de los reactivos o del fluido oral desde la tira reactiva cromatográfica a la matriz capilar. En una realización preferida, cuando está presente, la almohadilla de bloqueo es un filtro de celulosa n.º: 470 de Schleicher & Schuell (Schleicher & Schuell, GMBH, Alemania).

#### **Tira opcional de conjugado**

En una realización, los reactivos de cromatografía de flujo lateral (p. ej., partículas de oro marcadas con anticuerpos, etc.) están dispuestos sobre o en la propia tira cromatográfica de flujo lateral. Sin embargo, en otra realización, puede haber uno o más reactivos cromatográficos dispuestos en una tira de conjugado (G), p. ej., para facilitar la fabricación. La tira de conjugado está colocada yuxtapuesta a la tira de cromatografía de flujo lateral de tal manera que el fluido oral deba pasar por o a través de la tira de conjugado con el fin de migrar hacia arriba por la tira cromatográfica. Alternativamente, la tira de conjugado puede estar tejida en la tira de cromatografía de flujo lateral o puede estar alineada, en el mismo plano, según la tira de cromatografía de flujo lateral. Como con la tira de bloqueo, la tira de conjugado puede estar modelada de cualquier material conveniente (p. ej., nitrocelulosa, fibra de vidrio, poliéster, etc.) que sea compatible con el análisis y que no impida sustancialmente el flujo del fluido oral y de los reactivos. En una realización preferida, la almohadilla de conjugado es un lecho corto de fibra de vidrio de 4 mm x 4 mm o un lecho corto de poliéster (p. ej., Ahlstrom Remay n.º: 2033).

### Ensamblaje del dispositivo de análisis

Los componentes (p. ej., la matriz capilar, la tira de cromatografía de flujo lateral, la tira opcional de bloqueo) pueden ensamblarse mediante cualquiera de una amplia diversidad de medios conocidos por aquellos expertos en la técnica. Así, por ejemplo, los componentes pueden soldarse o pegarse y similares.

5 En una realización preferida, los componentes están simplemente prensados y sujetos en su sitio por una carcasa (H). La carcasa (H) puede ser de cualquier construcción deseada. Por ejemplo, en una construcción prototípica, se utilizaron pajitas de refresco que proporcionaron tanto estructura adecuada como visibilidad adecuada para medir la exactitud de la prueba. También se ha usado una tubería acrílica. Se reconocerá que es posible utilizar otros materiales de tubería estándar o que es posible moldear o extrudir personalmente carcasas especialmente diseñadas.

10 Los componentes se ensamblaron de tal manera que la tira de cromatografía de flujo lateral estaba dispuesta longitudinalmente dentro de la pajita y quedando fija por un extremo a un extremo de la matriz capilar (W). La carcasa H proporcionó así un mango conveniente para la introducción de la matriz capilar en la cavidad oral de un mamífero (p. ej. un ser humano).

15 Las figuras 1, 2 y 3 ilustran diversas realizaciones del dispositivo de análisis de la presente invención. La tira de inmunocromatografía o cromatografía de flujo lateral (C) está dispuesta longitudinalmente en la carcasa (H). Un extremo de la tira cromatográfica está en contacto directo, o por medio de la almohadilla de bloqueo (B) con una parte de la matriz capilar (W). La matriz capilar (W) sobresale de la carcasa (H) en la que presenta una cara (3) que actúa como una superficie absorbente para captar el fluido oral. El fluido oral migra a través de la matriz (W) y a través de la almohadilla de bloqueo (B), si está presente, donde se administra finalmente a una zona de recepción (R) sobre la tira de cromatografía de flujo lateral.

20 El fluido oral migra entonces a lo largo de la tira de cromatografía de flujo lateral donde interactúa con diversos reactivos (p. ej., parejas de unión marcadas con anticuerpos o antígenos (p. ej., anticuerpos o antígenos)) que se depositan en la tira cromatográfica y/o en la almohadilla de conjugado (G) opcional que, cuando está presente, está en contacto con la tira cromatográfica.

25 La combinación de fluido oral / reactivos continúa migrando a lo largo de la tira cromatográfica hasta que alcanza una o más zonas de indicadores (20). Si un analito está presente la zona de indicadores inmoviliza el analito marcado unido o produce de otra forma una señal detectable. Una o más de las zonas de indicadores pueden indicar también una cantidad suficiente de muestra (p. ej., con un cambio de color) cuando se alcanza el volumen de muestra necesario y/o la concentración de analito necesaria. Los indicadores de una cantidad suficiente de muestra se conocen bien por aquellos expertos en la técnica y en la solicitud USSN 08/456.459, en tramitación junto con la presente, así como en la patente estadounidense n.º: 5.479.937, se describen indicadores de la cantidad suficiente de muestra particularmente ventajosos.

30 Las zonas de indicadores pueden leerse (p. ej. mediante una inspección visual o mediante otros medios) a través de ventanas de observación (18). El dispositivo está opcionalmente equipado con lecho corto de bloqueo (B). Este lecho corto puede estar impregnado con un reactivo de bloqueo (p. ej., n-lauroilsarcosina) y/o con tampón o tampones para ajustar el pH de la muestra. Además, la almohadilla de bloqueo puede estar modelada de un material semipermeable que permita que el fluido oral fluya hacia la tira cromatográfica, pero que evite el reflujo del fluido oral y/o los reactivos a la matriz capilar. El otro extremo (el lado opuesto de la matriz capilar) de la tira cromatográfica puede llevar fijado a él un lecho corto absorbente que actúe como un depósito para recibir el fluido oral y evitar de ese modo el reflujo a la matriz capilar.

35 Se apreciará que los dispositivos pueden estar ensamblados en una amplia diversidad de formas. En la figura 3 se ilustra una realización preferida. En esta realización, la tira de cromatografía de flujo lateral (C) está dispuesta en una carcasa (H) que actúa como un mango para la manipulación del dispositivo. La carcasa / el mango (H) se proporciona con ventanas de observación (18) para visualizar la cantidad suficiente de muestra y los resultados de análisis. La matriz capilar sobresale de la carcasa para proporcionar una superficie planar para introducción en la cavidad oral donde la cara de la matriz capilar (3) puede ponerse en contacto con la mucosa oral.

40 Por comodidad, el dispositivo de análisis puede estar opcionalmente equipado con una cubierta (22) para la protección de la superficie de la matriz capilar antes y después de su uso. Esto evita la contaminación del dispositivo de análisis y facilita la eliminación sanitaria de los dispositivos usados.

45 El lector apreciará que con la interacción de la matriz capilar hidrófila W y la tira cromatográfica lateral C, es posible una construcción extremadamente simple. Además, el producto final funciona de una manera similar a la de un termómetro convencional. La prueba es rápida –con los prototipos presentando aproximadamente 2 minutos para completar los resultados de la prueba. Además, la prueba conduce fácilmente a la propia estimulación de la saliva - tal como mediante la colocación de componentes ligeramente ácidos en el extremo de la mecha.

50 Lo más importante, la prueba solo requiere volúmenes mínimos de fluido procedente de la cavidad oral para ejecutarse. Por ejemplo en los diseños mostrados, los análisis solo utilizaron de 100 a 200 µl de fluido oral. Esto

supone una mejora de al menos un factor de 4 con respecto a los requisitos de volumen de muestra de los análisis anteriores.

#### **Uso del dispositivo de análisis**

- 5 En uso, el dispositivo de análisis de la presente invención se introduce en la cavidad oral de un mamífero (p. ej. un ser humano) de tal forma que el mango en el que está dispuesta la tira cromatográfica queda fuera de la boca. La cara de la matriz capilar se pone preferiblemente en contacto con la mucosa oral y en una realización particularmente preferida, se presiona contra la mucosa oral en la cresta gingival, p. ej. se presiona entre la mejilla y las encías.
- 10 El dispositivo de análisis se mantiene en su lugar, preferiblemente sin masticación, hasta que se recoge muestra suficiente. Esto puede ser durante un intervalo de tiempo predeterminado o hasta que la matriz capilar alcanza una cualidad táctil característica, o hasta que un indicador de cantidad suficiente de muestra (p. ej. un cambio de color) indica una muestra adecuada.
- 15 En el tiempo recomendado (tras la finalización del análisis de inmunocromatografía), el dispositivo se lee (p. ej., mediante una inspección visual de la zona o las zonas de indicadores a través de la ventana o las ventanas de observación, para determinar si el sujeto es positivo o negativo para el o los analitos de interés o para cuantificar el analito o los analitos.

#### **Equipos para la detección de analitos en fluidos orales**

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona equipos para la detección de uno o más analitos en fluidos orales. Los equipos incluyen uno o más de los dispositivos de análisis descritos en el presente documento. Además, los equipos pueden incluir materiales informativos que contienen las instrucciones (es decir, los protocolos) para la práctica de los procedimientos de análisis de la presente invención. Aunque los materiales informativos comprenden típicamente materiales escritos o impresos no se limitan a ellos. En la presente invención se contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (p. ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (p. ej., CD-ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan tales materiales informativos.
- 25 Los equipos pueden contener opcionalmente cualquiera de los tampones, reactivos, reactivos de detección, etcétera que sean útiles para la práctica de los procedimientos de la presente invención.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo para análisis de anticuerpos en fluidos orales, que comprende:  
una carcasa;  
una tira que comprende una tira de recolección para recoger una muestra de fluido oral y una tira de análisis de flujo lateral, en las que la tira de recolección está en comunicación fluida con la tira de análisis de flujo lateral y en el que la tira de flujo lateral está contenida sustancialmente en la carcasa y contiene:
- 5
- (a) al menos un reactivo usado para detectar la presencia o ausencia de al menos un tipo de anticuerpos en la muestra de fluido lateral y
- 10
- (b) una o más zonas que indican la presencia o ausencia del tipo de anticuerpo en la muestra de fluido oral; y una tira de bloqueo acoplada entre y en comunicación fluida con la tira de recolección y la tira de análisis de flujo lateral, en la que la tira de bloqueo es un material semipermeable que permite al fluido oral fluir hacia la tira de análisis de flujo lateral pero evita el reflujo de fluido oral en la tira de recolección.
- 15
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la tira de bloqueo incluye al menos un agente de bloqueo o al menos un tampón.
3. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que el al menos un tampón ajusta el pH de la muestra de fluido oral y el agente bloqueante reduce la unión no específica del anticuerpo.
4. El dispositivo de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente:  
una tira conjugada acoplada entre, y en comunicación fluida con, la tira de bloqueo y la tira de análisis de flujo lateral, en la que la tira conjugada contiene una pareja de unión marcada para al menos un tipo de anticuerpo en el fluido oral.
- 20
5. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:  
una tira conjugada acoplada entre, y en comunicación fluida con, la tira de recolección y la tira de análisis de flujo lateral, en la que la tira conjugada contiene una pareja de unión marcada para al menos un tipo de anticuerpo en el fluido oral.
- 25
6. El dispositivo de la reivindicación 1 o 4, en el que al menos un anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos del VIH, anticuerpos del VLTH, anticuerpos de *Helicobacter pylori*, anticuerpos de hepatitis, anticuerpos del sarampión, anticuerpos de las paperas, anticuerpos de la rubéola, cotinina, cocaína, benzoilecgonina, benzodiacepina, tetrahidrocanabinol, nicotina, teofilina de etanol, fenitoína, acetaminofeno, litio, diazepam, nortriptilina, secobarbital, fenobarbital, teofilina, testosterona, estradiol, 17-hidroxiprogesterona, progesterona, tirosina, hormona estimulante del tiroides, hormona estimulante de los folículos, hormona luteinizante, factor de crecimiento transformante de tipo alfa, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de tipo insulina I y II, factor de inhibición de la liberación de hormonas de crecimiento, IgA y globulina de unión a hormonas sexuales y otros analitos que incluyen glucosa, colesterol, globulina de unión a hormonas sexuales y otros analitos incluyendo glucosa, colesterol, cafeína, colesterol, globulina de unión a corticosteroides, PSA, o glucoproteína de unión a DHEA y globulina de unión a corticosteroides.
- 30
- 35
7. El dispositivo de la reivindicación 1 o 4, en el que el al menos un anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos del VIH.
8. El dispositivo de la reivindicación 1 o 4, en el que el al menos un anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos de hepatitis.
- 40
9. Un equipo para la detección de anticuerpos en fluidos orales que comprende:  
un dispositivo de la reivindicación 1 o 4; y por separado  
un tampón, reactivo, o reactivo de detección para recolección y cromatografía de flujo lateral de un fluido oral.



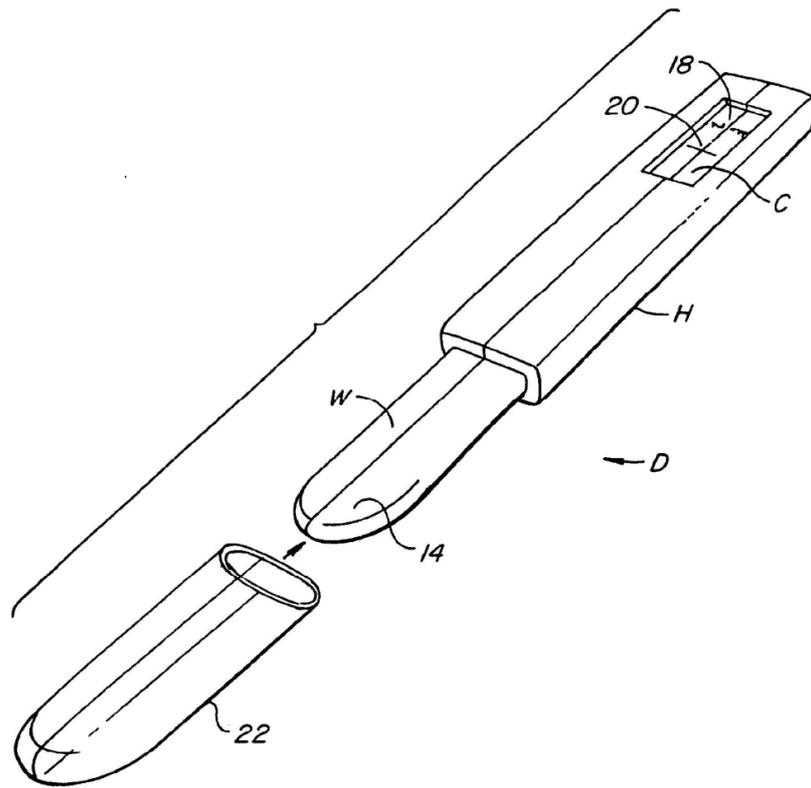


FIG. 3.