

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 052**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10733022 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2440929**

54 Título: **Procedimientos de generación de señal y localización de señal para mejorar la legibilidad de señal en bioensayos basados en fase sólida**

30 Prioridad:

12.06.2009 GB 0910203

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

22.10.2014

73 Titular/es:

**SUPERNOVA DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
20271 Goldenrod Lane, Suite 2028
Germantown, Maryland 20876, US**

72 Inventor/es:

**MAK, WING CHEUNG;
WONG, LING WAI;
CHAN, PUI YEE CANGEL;
RENNEBERG, REINHARD y
SIN, KING KEUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 511 052 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

Procedimientos de generación de señal y localización de señal para mejorar la legibilidad de señal en bioensayos basados en fase sólida

Descripción

5 La presente invención se refiere a ensayos para analitos, por ejemplo, antígenos, en una muestra líquida tal como un fluido corporal. Más particularmente, la invención se refiere a un dispositivo de ensayo de flujo lateral para la detección de un analito en un fluido corporal tal como orina, sangre, suero, plasma, saliva o una solución de extracción de heces usando un conjugado que comprende material detectable como se define en las reivindicaciones adjuntas. La invención también es aplicable a situaciones no clínicas, tales como ensayos de
10 alimentos y agua para detectar la presencia de contaminantes, o en el sector veterinario o militar.

La invención usa un medio portador para llevar a diferentes reactivos para la generación de señal y la localización de señal en el ensayo. El medio portador comprende:

(i) Disolvente (por ejemplo, solución acuosa que incluye tampón, solución salina, agua, disolvente orgánico, por ejemplo, alcoholes tales como etanol, propanol; éteres tales como tetrahidrofurano (THF), y disolventes apróticos polares tales como dimetil sulfóxido (DMSO);
15

(ii) Espesante, que se disuelve en el disolvente como una mezcla coloidal que forma una estructura interna que proporciona las propiedades del medio portador resultantes que varían desde las de un fluido de alta viscosidad a un gel. Los medios portadores tipo gel tienen la apariencia de un sólido, mientras que están compuestos en su mayoría por el disolvente. Los ejemplos incluyen polímeros tales como poliacrilamida y poliisobutileno; polisacáridos
20 tales como almidones, celulosa, alginatos obtenidos a partir de algas pardas, agar, carragenina, pectina; gomas naturales tales como goma de algarroba y goma guar; proteínas tales como colágeno, albúmina y gelatina.

En algunas realizaciones, el medio portador puede también incluir un reactivo de desarrollo de señal que es un material que convierte las moléculas precursoras de señal a un estado en el que se genera una señal detectable. En otras realizaciones, un reactivo de desarrollo de señal no es necesario porque la pluralidad de moléculas precursoras de señal se convierte a una pluralidad de moléculas de señal detectables por medios físicos tales como
25 el cambio en la temperatura, cambio de pH, sonicación, irradiación de luz o calentamiento por microondas.

Las funciones del medio portador son:

(i) Impedir la difusión de las moléculas de señal, lo que lleva a la acumulación de señal.
(ii) Mejorar la legibilidad de la señal (nitidez, prolongación del tiempo de retención de la señal) en la plataforma de
30 fase sólida, y por lo tanto potenciar la sensibilidad.

En algunas realizaciones, cuando la conversión de la pluralidad de moléculas precursoras de señal a una pluralidad de moléculas que generan señal detectable se produce por medios químicos o bioquímicos, el medio portador tiene una tercera función:

(iii) Generar una señal por medio de la conversión de una pluralidad de moléculas precursoras de señal a una pluralidad de moléculas que generan señal detectable.
35

Para los ensayos que usan detección de luz visible, el medio portador es sustancialmente ópticamente transparente.

Se han usado muchos tipos de ensayos diana - receptor para detectar la presencia de diversas sustancias diana en fluidos corporales tales como orina, sangre, suero, plasma, saliva o soluciones de extracción de heces. Estos
40 ensayos implican típicamente reacciones antígeno anticuerpo, conjugados sintéticos con marcas metálicas radiactivas, enzimáticas, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes, o visualmente observables, y usan cámaras de reacción especialmente diseñadas. En todos estos ensayos, hay un receptor, por ejemplo, un anticuerpo, que es específico para la diana seleccionada, por ejemplo, el antígeno, y un medio para detectar la presencia, y, a menudo la cantidad, del producto de reacción diana-receptor. Muchas pruebas actuales están
45 diseñadas para proporcionar una determinación semi-cuantitativa o cuantitativa pero, en muchas circunstancias, todo lo que se requiere es una detección cualitativa que proporcione una indicación positiva o negativa de la presencia de la especie diana. Ejemplos de tales ensayos cualitativos incluyen la determinación de sangre, la mayoría de los tipos de análisis de orina y la muy importante prueba de sangre oculta en heces como un ensayo de evaluación del carcinoma colorrectal. Para estas pruebas, se prefieren los indicios visualmente observables, tales
50 como la acumulación de partículas de color, por ejemplo, partículas de oro, la presencia de aglutinación o un cambio de color.

Sin embargo, los ensayos cualitativos deben ser muy sensibles debido a la frecuente concentración pequeña de la diana de interés en el fluido de ensayo. Se han desarrollado ensayos sándwich y otros procedimientos de detección sensibles que usan soles de metal u otros tipos de partículas de color. Sin embargo, estas técnicas no han resuelto todos los problemas encontrados en los procedimientos de detección rápida y se están buscando constantemente mejoras adicionales.

A modo de ejemplo, en ensayos sándwich de flujo lateral, con frecuencia se usa oro coloidal en forma de marcador de un primer anticuerpo (1), mientras que el otro anticuerpo (2) se fija en un sitio de detección bien definido en una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa. Si el analito en cuestión está presente en una muestra, entonces el analito reacciona con el anticuerpo marcado de oro (1) y migra al anticuerpo unido a la membrana de nitrocelulosa (2). Allí se forma un sándwich y estos complejos de sándwich se recogen después y se concentran en el sitio de detección. Este sitio se puede hacer más visible en cierta medida (amplificada) por reacción adicional con iones de plata.

Sin embargo, la sensibilidad analítica no es excepcional y esta tecnología no es fácilmente aplicable a ciertos ensayos, por ejemplo, para la determinación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), antígeno prostático específico (PSA), troponina I o troponina T en el intervalo de concentración baja, pero muy importante para el diagnóstico.

Por lo tanto, con el fin de hacer estos ensayos más eficaces, se usan otros marcadores (denominados "moléculas precursoras de amplificación de la señal") que pueden ser amplificados al final de la reacción de determinación, por ejemplo al final de la formación del sándwich: anticuerpo (2)_{hijo}- analito {anticuerpo (1)-marcador}.

Si el marcador de amplificación es una microcápsula que contiene diacetato de fluoresceína cristalina (FDA), que está constituida por millones de moléculas de FDA, entonces la amplificación se efectúa después de la reacción de determinación desintegramiento la microcápsula e hidrolizando las moléculas de FDA no fluorescentes a moléculas de fluoresceína fluorescentes. Esta amplificación está bien probada y se describe en la patente europea concedida EP 1309867.

Normalmente, la reacción de amplificación se lleva a cabo en una solución del reactivo de liberación. Esto lleva a una ligera disminución de la sensibilidad analítica del ideal por el factor de dilución - las moléculas de fluoresceína liberadas se vuelven diluidas en el volumen de reacción del reactivo de liberación.

Desafortunadamente, en determinadas circunstancias, el beneficio de la amplificación se puede compensar o incluso superar por la desventaja de la disipación de la señal. Por ejemplo, si la detección o determinación se realiza sobre una membrana, por ejemplo, en una tira de ensayo de flujo lateral, la adición de una solución de reactivo de liberación para permitir la amplificación de la señal da como resultado la difusión de la señal amplificada a lo largo de la membrana. Las moléculas amplificadas / liberadas no se localizan y, por tanto, la señal puede ser difícil de detectar incluso después de la amplificación. La adición de cualquier solución - después de que la reacción de ensayo subyacente se haya completado - lleva a una ampliación de la línea, punto o zona de detección. La difusión amplía el sitio de detección y no es posible medir de forma fiable la intensidad de color del sitio de detección.

La técnica anterior también incluye ejemplos en los que el marcador puede ser una enzima con un número de renovación alto que, cuando reacciona con su sustrato, forma muchas moléculas de producto de reacción. De nuevo, esto se lleva a cabo en solución acuosa, más específicamente en una solución tamponada con las moléculas de sustrato específicas para la enzima. Una desventaja de los sistemas basados en enzimas es que, como son catalíticas, la amplificación se inicia cuando se produce la conversión del sustrato y esto es un proceso continuo. La amplificación depende de la concentración de sustrato y del tiempo elegido para la reacción enzimática. Si no se añade un reactivo de detención, la enzima funcionará durante el tiempo de medición (y después), por lo que no hay una señal constante. La adición de un agente de detención incrementará el efecto de dilución.

La solicitud de patente europea número EP 0212670 A2 desvela un procedimiento para detectar un resto analito por medio de una señal localizada. El procedimiento implica la generación de la señal en un medio específico, indicativo, viscoso, o espeso. El medio específico comprende una red, una solución, y un precursor de la señal. El medio indicativo comprende una red, una solución, y un resto de señalización. El medio viscoso comprende un componente específico, una solución, y un precursor de la señal. El medio espeso comprende un componente específico, una solución, y un resto de señalización. La red se suspende o se disuelve en la solución. La señal de localización se produce porque la red reduce la convección en el medio específico o indicativo o porque la viscosidad reduce la difusión en el medio viscoso o espeso.

Es por tanto un objeto de la invención superar las limitaciones en la tecnología de vanguardia dificultando la difusión de las moléculas de señal y de ese modo mejorar la legibilidad de la señal mediante el mantenimiento de su nitidez

5 y prolongando el tiempo de retención de señal de modo que las señales se puedan detectar de forma fiable. También es un objeto de la invención proporcionar un procedimiento rápido, sensible, para la detección de analitos en muestras de fluido, particularmente muestras de fluidos corporales. Otro objeto es proporcionar un ensayo que tiene una alta sensibilidad en comparación con ensayos convencionales. Un objeto adicional es proporcionar un dispositivo de prueba para detección de niveles bajos de analitos en fluidos.

DEFINICIONES

10 Medio portador: El medio portador dificulta la difusión de la pluralidad de moléculas de generación de señales detectables, que lleva a la acumulación de la señal. Esto da como resultado una mejora de la legibilidad (nitidez, prolongación del tiempo de retención de la señal) de la pluralidad de moléculas de generación de señales detectables en la plataforma de fase sólida, y por lo tanto aumenta la sensibilidad.

El medio portador comprende:

(i) Disolvente (por ejemplo, solución acuosa que incluye tampón, solución salina, agua, disolvente orgánico, por ejemplo, alcoholes tales como etanol, propanol; éteres tales como tetrahidrofurano (THF), y disolventes apróticos polares tales como dimetil sulfóxido (DMSO);

15 (ii) Espesante, que se disuelve en el disolvente en forma de una mezcla coloidal que forma una estructura interna que proporciona las propiedades del medio portador resultante que varían desde las de un fluido de alta viscosidad a un gel.

El medio portador también puede comprender, para las moléculas precursoras de señal que requieren activación química o bioquímica:

20 (iii) Reactivo de desarrollo de señal, que es un material que convierte las moléculas precursoras de señal a un estado en el que generan una señal detectable.

25 Espesantes: Estos son materiales usados para espesar y estabilizar soluciones, emulsiones y suspensiones líquidas. Se disuelven en la fase líquida en forma de una mezcla coloidal que forma una estructura interna que proporciona las propiedades del medio portador resultante que varían desde las de un fluido de alta viscosidad a un gel. El medio portador de tipo gel tiene la apariencia de un sólido, mientras que se compone principalmente de un líquido. Ejemplos de espesantes incluyen polímeros formadores de gel, tales como poliacrilamida y poliisobutileno; polisacáridos tales como celulosa, almidones, alginatos obtenidos a partir de algas pardas, agar, carragenina, pectina; gomas naturales tales como goma de algarroba y goma guar; proteínas tales como colágeno, albúmina y gelatina.

30 Moléculas precursoras de señal: Estas son moléculas que, cuando se hacen reaccionar con uno o más de otros reactivos, llevan a una señal detectable. Existen muchas sustancias diferentes de diferentes clases químicas que llevan a través de una reacción iniciada a una señal detectable, por ejemplo fluoróforos y sus derivados, luminóforos y sus derivados, cromóforos y sus derivados, grupos prostéticos, o sustancias redox activas seleccionadas de mediadores redox, sustancias electrodo activas, proteínas bioluminogénicas y fluorogénicas, colorantes visibles, colorantes fluorescentes, materiales bioluminiscentes o quimioluminiscentes, materiales electroquímicamente activos, o materiales magnéticos. Las moléculas precursoras de la señal son marcadores no catalíticos.

La señal detectable se puede basar en:

- fluorimetría
- luminometría
- 40 - Cambio de color en el intervalo ultravioleta, visible y casi infrarrojo
- Cambio en el potencial redox.
- Cambio en la masa resultante de la formación de complejos o precipitación
- Detección de los productos de desintegración radiactiva
- Detección de campo magnético

45 Moléculas de señal: El término moléculas de señal sólo se usa en esta memoria descriptiva para designar moléculas precursoras de señal y / o moléculas de generación de señal cuando el contexto no requiere que estén en un estado particular de precursor de señal o estado de generación de señal. También se usa cuando las moléculas precursoras de señal y moléculas de generación de señal pueden estar presentes juntas al mismo

tiempo.

Reactivo de desarrollo de señal: El reactivo de desarrollo de señal, si está presente, es un material que permite que las moléculas precursoras de señal generen una señal detectable. El reactivo de desarrollo de señal se puede adaptar para activar fluoróforos seleccionados del grupo que consiste en fluoresceínas y sus derivados, incluyendo diacetato de fluoresceína (FDA), isotiocianato de diacetato de fluoresceína (isotiocianato de FDA) o diacetato de fluoresceína maleimida (FDA maleimida), cianinas, carbocianinas, rodaminas, xantenos, sustancias fluorescentes basadas en colorantes diazo y moléculas aromáticas y heteroaromáticas fluorescentes pequeñas. De forma alternativa, el reactivo de desarrollo de señal puede activar cromóforos seleccionados del grupo que consiste en sustancias colorantes basadas en cianina, pirazolona, antraquinona, carbocianina, rodamina, xanteno, carotenoides y diazo y monoazo, oxazina, indigoide, o riboflavina.

Dispositivo de prueba: Como se usa en este documento, el término dispositivo de prueba se usa para denotar un dispositivo que incorpora un sustrato en fase sólida. El sustrato en fase sólida puede ser una membrana.

El material y la forma para el sustrato en fase sólida puede ser: una membrana porosa tal como nitrocelulosa, nylon; una superficie plana no porosa tal como vidrio, poliestireno, metal o carbono.

Membrana de detección: Una membrana de detección está compuesta por una membrana de reacción, por ejemplo, una tira de nitrocelulosa a la que están unidas diferentes almohadillas - algunas con reactivos - (por ejemplo, almohadilla de conjugado, almohadilla de muestra, almohadilla absorbente). Los sitios de reacción (sitio de detección, sitio de control) con anticuerpos o antígenos están recubiertos en lugares bien definidos sobre la membrana de reacción. Los recubrimientos en los sitios de reacción se pueden adsorber de forma pasiva sobre la membrana de reacción, se pueden unir de forma covalente, o se pueden unir de forma inmuno-química, por ejemplo, a través de estreptavidina (recubiertas con estreptavidina ← anticuerpo biotinilado) o a través de un anticuerpo específico de la especie (anticuerpo de cabra anti-ratón ← anticuerpo de ratón).

Moléculas de afinidad: Las moléculas de afinidad pueden ser moléculas de bioreconocimiento seleccionadas de los siguientes grupos de materiales:

(a) péptidos o proteínas seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos, anticuerpos modificados genéticamente, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, receptores, antígenos, lectinas, avidinas, oligopéptidos, lipoproteínas, glicoproteínas, alérgenos y hormonas peptídicas o partes de los mismos;

(b) ácidos nucleicos seleccionados del grupo que consiste en ADN, ARN, oligonucleótidos, aptámeros y partes de los mismos;

(c) carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en mono, oligo y polisacáridos, glicolípidos, proteopolisacáridos y partes de los mismos; o

(d) ligandos de bajo peso molecular seleccionados del grupo que consiste en biotina, derivados de biotina, esteroides, hormonas, cofactores, activadores, inhibidores, fármacos, alérgenos o haptenos.

Diana: El término "diana" se usa en la presente memoria descriptiva para referirse tanto al analito en un ensayo de tipo sándwich, o al competidor en un ensayo de tipo competitivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un dispositivo de prueba para la detección de un material diana en una muestra de fluido, tal como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, el medio portador también puede incluir un reactivo de desarrollo de señal que es un material que convierte la pluralidad de moléculas precursoras de señal a la pluralidad de moléculas generadoras de señal detectable que generan una señal detectable. En otras realizaciones, no es necesario un reactivo de desarrollo de señal porque la pluralidad de moléculas precursoras de señal se convierte a la pluralidad de moléculas de generación de señal detectable por medios físicos medios tales como cambio de temperatura, cambio de pH, sonicación, irradiación de luz o calentamiento por microondas.

Para evitar dudas, la expresión no catalítica también incluye la no enzimática, estando basada la invención en el uso de material precursor de señal que comprende una pluralidad de moléculas precursoras de señal que se pueden convertir a una pluralidad de moléculas generadoras de señal detectable. Por consiguiente, cuando el material diana se une con una molécula de afinidad específica para ese material diana al que se adjunta un marcador no catalítico, comprendiendo dicho marcador no catalítico una pluralidad de moléculas precursoras de señal, existe una amplificación inherente o potencial de la señal detectable porque cada molécula diana se asocia con una pluralidad de moléculas precursoras de señal. En otras palabras, cuando se produce la reacción de

determinación, el material precursor de señal puede ser "activado" y convertido a una pluralidad moléculas generadoras de señal detectable.

Por ejemplo, se considera el caso en el que el material diana es un antígeno y el marcador no catalítico conjugado con moléculas de afinidad que se unen específicamente al material diana es un anticuerpo detector unido a una micro-cápsula que contiene un cristal de diacetato de fluoresceína (FDA, es decir, un cristal de moléculas precursoras de señal). Cuando el anticuerpo antígeno / detector está capturado en un sitio de detección (por ejemplo, un anticuerpo de captura sobre un soporte sólido), la disolución del cristal de FDA por un disolvente y conversión del FDA a fluoresceína (mediante tratamiento con KOH, por ejemplo) libera millones y millones de moléculas fluorescentes para cada antígeno diana.

La invención proporciona una solución técnica al problema de la línea, punto, mancha o zona que se amplían en un sitio de detección y lleva a una mejora de la legibilidad de las líneas de ensayo y de control, especialmente en dispositivos de prueba PoC. La ampliación normalmente se provoca e inicia por medio de la adición de los reactivos de liberación requeridos en solución acuosa. El sitio de detección no es una línea de reacción nítida y se vuelve borrosa, extendida e indefinida a través de la difusión de sustancias en solución. Por medio de la presente invención, se satisface ahora la necesidad de localizar la señal en su lugar de formación.

La invención se describirá ahora a modo de ejemplo solamente y sin limitación con referencia a los dibujos en los que:

La figura 1 es una vista esquemática que muestra la construcción de una tira de ensayo de flujo lateral conocido;

La figura 2 muestra esquemáticamente dos vistas de una tira de ensayo de flujo lateral de una técnica anterior en condiciones de uso; vista (a) ilustra una tira de ensayo que usa un marcador directo, es decir, no amplificado, mientras que la vista (b) ilustra una tira de ensayo que usa una técnica de solución de la técnica anterior para amplificar el marcador;

La Figura 3 es otra ilustración esquemática de una tira de ensayo que muestra la aplicación de una película delgada de medio portador para la señal de localización;

La Figura 4 ilustra los cambios de señal fluorescente a diferentes intervalos de tiempo para las señales generadas que usan una solución de liberación convencional (tiras de la izquierda) y señales localizadas que usan un gel de matriz de acuerdo con el presente documento (tiras de la derecha);

La Figura 5 es una ilustración esquemática de una tira de ensayo que tiene una tapa ópticamente transparente cargada con un gel de matriz para colocar sobre la tira de ensayo después de la finalización de la reacción de determinación para efectuar la localización de la señal visible.

En la descripción que sigue, los términos espaciales relativos como "atrás", "izquierda", "derecha", etc., se usan según convenga al lector experto y se refieren a la orientación de los dispositivos de prueba y sus partes constituyentes como se representa en los dibujos. No se pretende limitación por el uso de estos términos, ya sea en uso de la invención, durante su fabricación, embarque, custodia o venta, o durante el montaje de sus partes constituyentes o cuando se incorpora en o en combinación con otro aparato.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una tira de ensayo de flujo lateral convencional en vista en planta (vista (a)) y vista lateral (vista (b)). El número de referencia 10 denota un laminado trasero para mantener juntos los componentes porosos. En la parte superior de este se asienta una almohadilla de carga de la muestra 12, en la que se aplica la muestra, en uso. Al lado de ésta se encuentra una almohadilla de conjugado 14 que contiene el material detector o sonda que reacciona con la diana cuando ésta pasa por la tira de ensayo en una muestra de fluido que lleva la membrana de nitrocelulosa 16. En la dirección de flujo de izquierda a derecha, como se representa en la figura, el sitio de detección 18 es una línea de sonda de captura aplicada a través de la anchura de la tira de ensayo en la que se capturan los complejos diana / detector, mientras que el sitio de control 20 es una línea adicional de material aplicado en toda la anchura de la tira de ensayo hacia abajo del sitio de detección 18. El sitio de control no detecta nada en la muestra, sino que indica que la tira se ha humedecido correctamente y que todos los componentes del ensayo son funcionales. El sitio de control siempre debe producir una señal visible para verificar que el ensayo se ha realizado correctamente, incluso para muestras que no contienen ninguna diana detectable y por lo tanto no producen ninguna señal en el sitio de detección. El exceso de fluido se absorbe por medio de la almohadilla de succión 22.

Volviendo ahora a la Figura 2, ésta muestra en vistas de forma esquemática dos tiras de ensayo de flujo lateral en condiciones de uso. En la vista (a), se ilustra una tira de ensayo que usa un marcador directo, en la que no existe la necesidad de convertir moléculas precursoras de señal a moléculas de generación de señal; las líneas de detección en el sitio de detección y el sitio de control son nítidas y bien definidas. La vista (b) es una ilustración de una tira de ensayo en la que, después de producirse la reacción de determinación, se ha añadido una solución de reactivo de

desarrollo de señal para iniciar la conversión de moléculas precursoras de señal a moléculas de generación de señal detectable. Aquí, las líneas de detección en el sitio de detección y el sitio de control no están bien definidas; se han extendido debido a la difusión de las moléculas de generación de señal a través de la solución usada para aplicar el reactivo de desarrollo de la señal.

5 En la presente invención, tal difusión se ve obstaculizada. Se permite la conversión de moléculas precursoras señal a moléculas de generación de señal detectable para que se lleve a cabo manteniendo al mismo tiempo líneas de detección bien definidas en el sitio de detección y el sitio de control. Esto se consigue por medio del uso de un medio portador que minimiza la difusión y la distribución de las moléculas de señal. En algunas realizaciones, el medio portador puede incluir un reactivo de desarrollo de señal que convierte moléculas precursoras de señal a moléculas de generación de señal detectable, pero el medio portador no está en una forma que permite la difusión rápida a través de la membrana de detección.

10 El medio portador se basa en el desarrollo de un espesante con "agua unida a la matriz" en el que un disolvente y, en algunas realizaciones también un reactivo de desarrollo de señal, se han disuelto en estado sol antes de que se forme el estado gel. En estado gel, la matriz minimiza la difusión de la pluralidad de moléculas generadoras de señal detectable apoyadas sobre la membrana de detección.

15 La Figura 3 es otra ilustración esquemática de una tira de ensayo como la tira que se describe en la Figura 1, en la que la vista (b) muestra la aplicación de una capa fina de medio portador 24 a la superficie superior de la membrana de detección 16 para producir la generación de la señal mediante la conversión de una pluralidad de moléculas precursoras de señal a una pluralidad de moléculas de generación de señal detectable y la localización de la pluralidad de moléculas de generación de señal detectable. De forma conveniente, el medio portador puede ser un gel de matriz que ha sido cortado en una tira fina de película que se corresponde preferentemente en tamaño a la superficie superior expuesta de la membrana de detección.

20 La Figura 4 es una fotografía que ilustra los cambios de señal fluorescente en diferentes intervalos de tiempo para señales generadas usando una solución de liberación convencional (tiras de la izquierda) y señales generadas usando un medio portador que contiene un reactivo de desarrollo de señal en forma de un gel de matriz (tiras de la derecha). Los pares de tiras se fotografiaron inmediatamente después de aplicar una solución de liberación convencional para liberar fluoresceína de las moléculas precursoras señal de diacetato de fluoresceína o inmediatamente después de la aplicación de un gel de matriz. Los mismos pares de tiras se fotografiaron de nuevo en los siguientes intervalos de tiempo sucesivos: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12 y 15 minutos. Las tiras en las que se generó la señal usando el gel de matriz mantienen líneas bien definidas, incluso después de 15 minutos, mientras que las tiras en las que se generó la señal de manera convencional usando una solución de liberación empezaron a mostrar signos de difusión, incluso en el primer intervalo. Después de 15 minutos, estas tiras convencionales mostraron líneas muy difusas que serían prácticamente imposibles de leer de forma reproducible en la práctica.

25 La Figura 5 es una ilustración esquemática de una tira de ensayo que tiene una tapa ópticamente transparente 26 cargada con un gel de matriz 24 para colocar sobre la tira de ensayo después de la finalización de la reacción de determinación para efectuar la localización de la señal visible. La tapa puede ser un artículo separado, pero aquí se muestra unida por medio de una bisagra viva 28 al laminado trasero 10 que sostiene los componentes porosos.

La presente invención aborda los siguientes problemas y limitaciones de los procedimientos existentes:

40 • La fluorescencia, luminiscencia o absorbancia no se puede determinar de manera fiable porque la difusión de las moléculas de generación de señales significa que la medición no se puede centrar en la zona de medición.

45 • Se produce una disminución de la sensibilidad analítica. La difusión se refiere a que la fluorescencia, luminiscencia o la absorbancia no se fijan en un sitio bien definido, si no que se distribuyen en su lugar, sobre partes de la membrana que no se pretende que sean sitios de detección. Esto lleva a una pérdida de moléculas de generación de señales detectables por el flujo de su lugar de formación y por lo tanto se produce una disminución en la sensibilidad analítica.

• Si el dispositivo de flujo lateral se concibe como semi-cuantitativo, entonces se proporcionan varias líneas de anticuerpos (2) en la membrana. El resultado no puede ser interpretado porque las moléculas de generación de señales detectables están borrosas / distribuidas entre y después de las líneas.

50 La invención aborda estos problemas basándose en una modificación del término viscosidad del coeficiente de difusión de las bien conocidas leyes primera y segunda de Fick que tratan del flujo difusivo. Fick postula que el flujo procede de regiones de alta concentración a regiones de baja concentración, con una magnitud que es proporcional al gradiente de concentración (dc / dx). En una dimensión espacial, la ecuación es:

$$J = -D \cdot (dc/dx)$$

en la que:

- J es el flujo de difusión que es una medida de la cantidad de sustancia que fluirá a través de un área pequeña durante un intervalo de tiempo corto. En la presente invención, es conveniente que el valor de J sea un mínimo.
- D es el coeficiente de difusión gel-agua "unido" depende de los tamaños de poro, su distribución y especialmente en la viscosidad del "líquido".
- c es la concentración; aquí, por ejemplo, de la fluoresceína formada.
- x es la posición o la distancia de la localización de la formación; aquí la distancia del sitio de detección.

El coeficiente de difusión (D) es proporcional a la velocidad al cuadrado de las partículas de difusión, que depende de la temperatura, la viscosidad del fluido y el tamaño de las partículas. En las soluciones acuosas diluidas, los coeficientes de difusión de la mayoría de los iones son similares y tienen valores que típicamente varían desde $0,6 \times 10^{-9}$ a 2×10^{-9} m² / s. Para las moléculas biológicas, los coeficientes de difusión normalmente varían de 10^{-11} a 10^{-10} m² / s.

La invención usa un medio portador que incorpora los reactivos necesarios para la localización de las moléculas de señal. Como se trató anteriormente, en algunas realizaciones el medio portador puede incluir también un reactivo de desarrollo de señal para la conversión de moléculas precursoras de señal a moléculas de generación de señal detectable. En otras realizaciones, esta conversión se logra por medios físicos tales como el cambio en temperatura, cambio de pH, sonicación, irradiación de luz o calentamiento por microondas. En el caso de un gel acuoso, el agua está fuertemente unida / fijada en la matriz del gel, después de que el estado gel se haya formado a partir de su estado sol. La difusión se vuelve notablemente impedida debido a que el líquido (agua) en el gel está más o menos "solidificado". En el caso de un líquido con un alto módulo de cizalladura, el disolvente impide la difusión de las moléculas de señal.

Los geles que contienen los reactivos clave se pueden producir fácilmente por medio de la disolución de los reactivos en el estado sol del compuesto formador de gel. Después de la incorporación de los reactivos en sol, el sol se transforma al estado gel después de una cierta cantidad de tiempo o la transformación se puede inducir por un cambio de temperatura (por ejemplo, agar-agar es líquido (estado sol) a temperaturas más altas y sólido (estado gel) a temperaturas más bajas).

Existen numerosas sustancias que se producen tanto en estado sol como en estado gel. El estado gel y sol con agua puede ser caracterizado en que, en el estado sol, la sustancia formadora de gel - el espesante - se dispersa coloidalmente en agua mientras que, en estado gel, el agua se dispersa en la red formadora de gel del espesante.

En una realización preferida particular, la invención hace uso del principio descrito en la patente europea nº EP 1309867, en la que la marca de uno de los agentes de reacción es un cristal FDA que incorpora millones de moléculas de FDA no fluorescentes. Estas se hidrolizan en el sitio de detección a millones de moléculas de fluoresceína. En virtud del espesante incorporado en el medio portador, se impide la difusión de las moléculas de fluoresceína así formadas del sitio de detección.

En este procedimiento, DMSO y NaOH son el disolvente y reactivo de desarrollo de señal que se incorporan en el medio portador. El efecto de localización de la señal se explica por la difusión parcial del DMSO y NaOH fuera del medio portador (es decir, el flujo de una región de alta concentración de solución de DMSO y NaOH a una región de concentración más baja) a la superficie de la membrana de detección. Los cristales de FDA se disuelven en el DMSO y se hidrolizan por NaOH para detectar la presencia de fluoresceína, que presenta fluorescencia. Debido a que el agua está fuertemente unida en el medio portador, que puede ser considerada como una red de 3 dimensiones, reticulada, en virtud de la acción del espesante, las sustancias de peso molecular pequeño se difunden solamente a través del medio portador con el agua acuosa unida y se ponen rápidamente en contacto con la membrana de detección. Este procedimiento no lleva más de aproximadamente 30 segundos.

Debido a que no se añade solución acuosa sin agua unida, no se produce difusión ni distribución de las moléculas de fluoresceína, con la asistencia de la almohadilla absorbente de la membrana de detección. Por lo tanto, se localizan las moléculas de fluoresceína y se pueden medir sin perder sensibilidad analítica. Además, no hay restricción de la legibilidad si están presentes más líneas de detección en las determinaciones semi-cuantitativas.

De acuerdo con la invención, el medio portador está integrado en un dispositivo de cubierta transparente separada que está adaptada para llevar el medio portador en contacto con la membrana de detección cuando se cierra

5 después de la finalización de la reacción de determinación. En este caso, el dispositivo de detección está compuesto por dos piezas en forma de una caja. El dispositivo de detección (caja) se abre, la reacción de determinación se realiza en la parte inferior de la caja con la membrana de detección. Posteriormente se cierra la caja con la cubierta en la que está integrado el medio portador. Para evitar el contacto accidental entre las moléculas precursoras de la señal y el medio portador debido al cierre prematuro de la cubierta, el medio portador puede tener una cubierta protectora de una lámina fina de película desprendible que se retira después de que se haya realizado la reacción de determinación. Sólo entonces el medio portador puede ponerse en contacto con los sitios de detección en la membrana de detección.

Preparación / producción del medio portador

10 La formación del medio portador se puede realizar por lo general con la mezcla del disolvente, reactivo de desarrollo de la señal (si está presente) y espesante. Pueden ser necesarios el calentamiento y el enfriamiento en función de la elección del espesante. Se pueden usar diferentes espesantes o mezclas de espesante para el procedimiento de formación del medio portador. Para cada tipo de espesante, se tienen que optimizar las concentraciones apropiadas para que los espesantes consigan la localización de las moléculas generadoras de
15 señal detectable en lo que se refiere al contenido de agua unida, características de cizallamiento del gel, reducción durante el proceso de solidificación, constante de difusión de los agentes de reacción integrados, densificación, transparencia óptica, estabilidad y solidez a los cambios de temperatura.

20 La viscosidad del medio portador cuando está en forma de un gel de matriz se puede comparar con la de geles de poliacrilamida usados en SDS-PAGE. Se puede aplicar un bajo porcentaje de gel, que no sería muy espeso, a la superficie de la membrana de detección por pulverización. Un alto porcentaje de gel espeso es más adecuado para ciertas plataformas de detección múltiple en las que están inmersos pétalos recubiertos en un gel para desarrollar una señal localizada. El porcentaje de gel puede variar desde el 0,05% al 50% en peso en base al peso total del medio; más preferiblemente en el intervalo del 0,1% al 20%. En otras realizaciones, el límite inferior de la proporción del gel puede tener uno cualquiera de los valores del 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% y 0,5%; el límite superior para
25 la proporción del gel puede tener uno cualquiera de los valores del 3%, 4%, 5%, 10%, 20% y 50%. Los intervalos para la proporción del gel pueden ser, por lo tanto, una combinación de cualquiera de los límites inferiores mencionados anteriormente con cualquiera de los límites superiores mencionados anteriormente.

30 El módulo de cizallamiento del medio portador se puede ajustar mediante la variación de la cantidad de espesante añadido. Por supuesto, una solución con alta viscosidad también puede retrasar la difusión, pero el tiempo de retención de la señal será más corto que el obtenido mediante el uso de la forma solidificada.

Si el gel de la matriz está optimizado, se obtienen líneas de reacción localizadas (líneas de señales) en la posición del sitio de detección, como se muestra en la Figura 4 en base a resultados experimentales. La figura 4 muestra una vez más las diferencias notables en la forma de los sitios de detección si se usa el gel de matriz para la generación de la señal y la localización de la señal, en lugar de una solución acuosa.

35 Ejemplos

Los elementos de la invención se ilustrarán ahora particularmente con referencia a varios ejemplos, aunque se entiende que éstos no son limitantes.

Ejemplo 1:

Preparación del medio portador basado en DMSO para el sistema de señal basado en cristal de FDA

40 El medio portador para FDA está compuesto por DMSO, NaOH y Polisorbato 20, en el que el propósito de DMSO es disolver el FDA y se usa NaOH para hidrolizar el FDA disuelto. El Polisorbato 20 es el componente activo para la formación de gel. De forma específica, los componentes se mezclan entre sí (por ejemplo, mezclando 1 ml de DMSO + 1 ml de NaOH 1M + 50 µl de Polisorbato 20) y se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 -10 minutos para solidificación.

45 La Tabla 1 muestra la optimización de las composiciones y de la apariencia de ciertos medios portadores en forma de geles de matriz.

Ejemplo 2:

Preparación del medio portador basado en isopropanol (IPA) para el sistema de señales basado en cristal de FDA

50 El medio portador basado en IPA para FDA está compuesto por IPA, NaOH y polivinilpirrolidona (PVP), en el que el propósito del IPA es disolver el FDA y se usa NaOH para hidrolizar el FDA disuelto. Se usa PVP para aumentar la

ES 2 511 052 T3

viscosidad del medio portador. De forma específica, los componentes se mezclan entre sí (por ejemplo, mezclando de 1 ml de IPA + 1 ml de NaOH 1 M + 0,2 g de PVP).

Tabla 1						
Composiciones y apariencia de geles de matriz						
Nombre	Tween 20*	SDS 20%	SDR	Dureza	Color	Claridad
100 _T 50 _S	100 ml	50 ml	850 ml	F	Amarillo	X
100 _T 0 _S	100 ml	0 ml	900 ml	S	Incoloro	X
50 _T 50 _S	50 ml	50 ml	900 ml	S	Incoloro	X
50 _T 0 _S	50 ml	0 ml	950 ml	F	Amarillo claro	L
25 _T 25 _S	25 ml	25 ml	950 ml	S	Incoloro	L'
25 _T 0 _S	25 ml	0 ml	975 ml	S	Incoloro	L
0 _T 25 _S	0 ml	25 ml	975 ml	Líquido	Incoloro	L
Observaciones		SDS: Dodecilsulfato sódico	SDR: Reactivo de desarrollo de señal	F: Gel firme S: Gel suave		X: Lechoso L: Transparente L': Semi – lechoso
•Tween 20 es una forma disponible en el mercado de Polisorbato 20. Tween es una marca registrada.						

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo para la detección de un material diana en una muestra de fluido, comprendiendo dicho dispositivo:
- 5 un sistema de detección de sustrato en fase sólida que comprende medios para el transporte de la muestra de fluido desde un sitio de aplicación de la muestra a un sitio de detección (18);
- un marcador no catalítico, dispuesto en una posición (14) alejada de dicho sitio de detección, conjugado con una molécula de afinidad específica para el material diana, comprendiendo dicho marcador no catalítico una pluralidad de moléculas precursoras de la señal, pudiéndose convertir dichas moléculas precursoras señal en una pluralidad de moléculas de generación de señal detectable,
- 10 y
- un medio portador (24) que comprende un disolvente para la disolución del marcador no catalítico y un espesante para producir la localización de la señal generada por dicha pluralidad de moléculas de generación de señal detectable en dicho sitio de detección que indica la presencia y / o cantidad de dicho material diana, disolviéndose dicho espesante en fase líquida en forma de una mezcla coloidal que forma una estructura interna que proporciona las propiedades del medio portador resultantes que varían desde las de un fluido de alta viscosidad a las de un gel;
- 15 en el que dicho dispositivo de ensayo es una tira de ensayo de flujo lateral que comprende además una tapa ópticamente transparente (26) cargada con dicho medio portador (24) para su colocación sobre la tira de ensayo después de la finalización de una reacción de detección de material diana, y en el que dicho medio portador está adaptado para ser puesto en contacto con dichas moléculas de señal, al menos, en dicho sitio de detección.
- 20 2. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la tapa ópticamente transparente (26) está articulada a un laminado trasero (10) para sostener los componentes porosos del dispositivo.
3. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una capa protectora amovible que recubre el medio portador.
4. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en el que el sustrato en fase sólida es seleccionado entre una membrana porosa, incluyendo nitrocelulosa o nylon; o una superficie plana no porosa, incluyendo el vidrio, poliestireno, metal o carbono.
- 25 5. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en el que dicha molécula de afinidad es seleccionada entre los grupos que consisten en:
- (a) péptidos o proteínas seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos, anticuerpos modificados genéticamente, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, receptores, antígenos, lectinas, avidinas, oligopéptidos, lipoproteínas, glicoproteínas, hormonas peptídicas y alérgenos;
- 30 (b) ácidos nucleicos seleccionados de entre el grupo que consiste en ADN, ARN, oligonucleótidos y aptámeros;
- (c) carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en mono., oligo. y polisacáridos, glicolípidos y proteo-polisacáridos; o
- 35 (d) ligandos de bajo peso molecular seleccionados del grupo que consiste en biotina, esteroides, hormonas, cofactores, activadores, inhibidores, fármacos, alérgenos o haptenos.
6. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende además un reactivo de desarrollo de señal contenido en dicho medio portador para la conversión de dicha pluralidad de moléculas precursoras de señal a dicha pluralidad de moléculas generadoras de señal detectable.
- 40 7. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 6, en el que dicha reactivo de desarrollo de señal es una base o esterasa.
8. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en el que dichas moléculas precursoras de señal son seleccionadas del grupo que consiste en fluoróforos, luminóforos, cromóforos, grupos prostéticos, o sustancias redox activas seleccionadas entre mediadores redox, sustancias electrodo activas, proteínas bioluminogénicas y fluorogénicas, colorantes visibles, colorantes fluorescentes, materiales bioluminiscentes o quimioluminiscentes, materiales electroquímicamente activos, o materiales magnéticos.
- 45 9. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 8, en el que las moléculas precursoras de señal son fluoróforos seleccionados del grupo que consiste en fluoresceínas, diacetato de fluoresceína (FDA),

isotiocianato de diacetato de fluoresceína (isotiocianato de FDA), diacetato de fluoresceína maleimida (FDA maleimida), cianinas, carbocianinas, rodaminas, xantenos, sustancias fluorescentes basadas en colorantes diazo y moléculas aromáticas y heteroaromáticas fluorescentes pequeñas.

5 10. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 9, en el que dichas moléculas precursoras de señal son seleccionadas entre diacetato de fluoresceína (FDA), isotiocianato de diacetato de fluoresceína (isotiocianato de FDA) y diacetato de fluoresceína maleimida (FDA maleimida) y que comprende además un reactivo de desarrollo de señal para el diacetato de fluoresceína (FDA), isotiocianato de diacetato de fluoresceína (isotiocianato de FDA) y diacetato de fluoresceína maleimida (FDA maleimida).

10 11. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 8, en el que las moléculas precursoras de señal son diacetato de fluoresceína cristalina (FDA), y en el que el medio portador comprende un disolvente para FDA, un reactivo de desarrollo de señal y un espesante.

12. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 11, en el que el medio portador comprende dimetil sulfóxido, hidróxido de sodio acuoso y Polisorbato 20.

15 13. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en la reivindicación 8, en el que las moléculas precursoras de señal son cromóforos seleccionados del grupo que consiste en cianina, pirazolona, antraquinona, carbocianina, rodamina, xanteno, carotenoides y diazo y monoazo, oxazina, indigoide, o sustancias colorantes basadas en riboflavina.

14. Un dispositivo de ensayo como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, en el que la proporción de espesante en el medio portador varía del 0,05% al 50% en peso en base al peso total del medio portador.

20

Figura 1

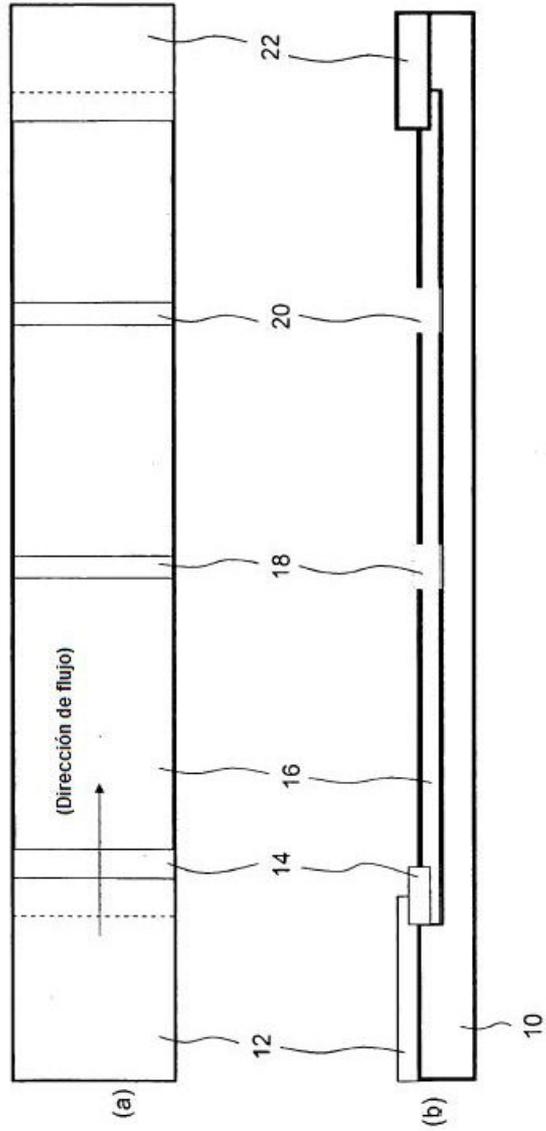


Figura 3

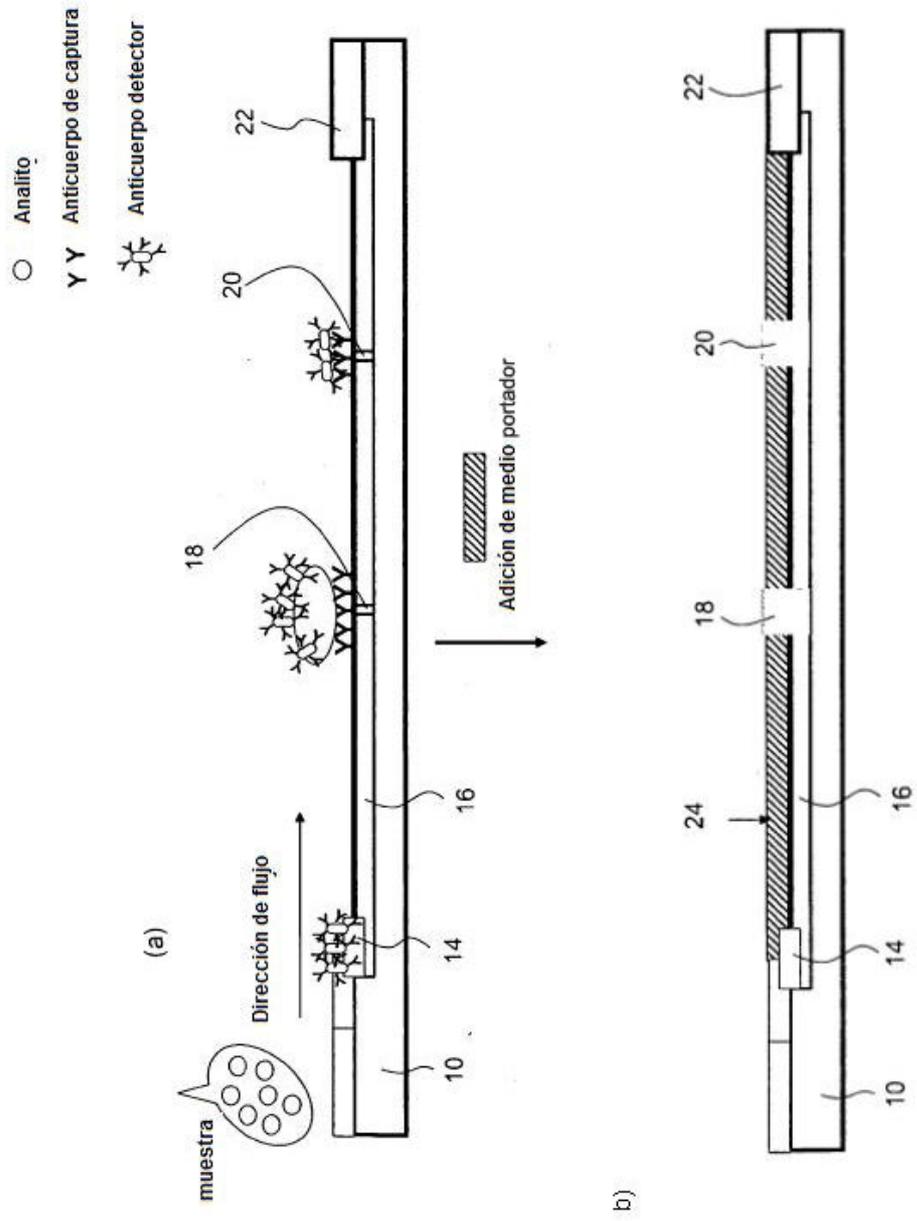
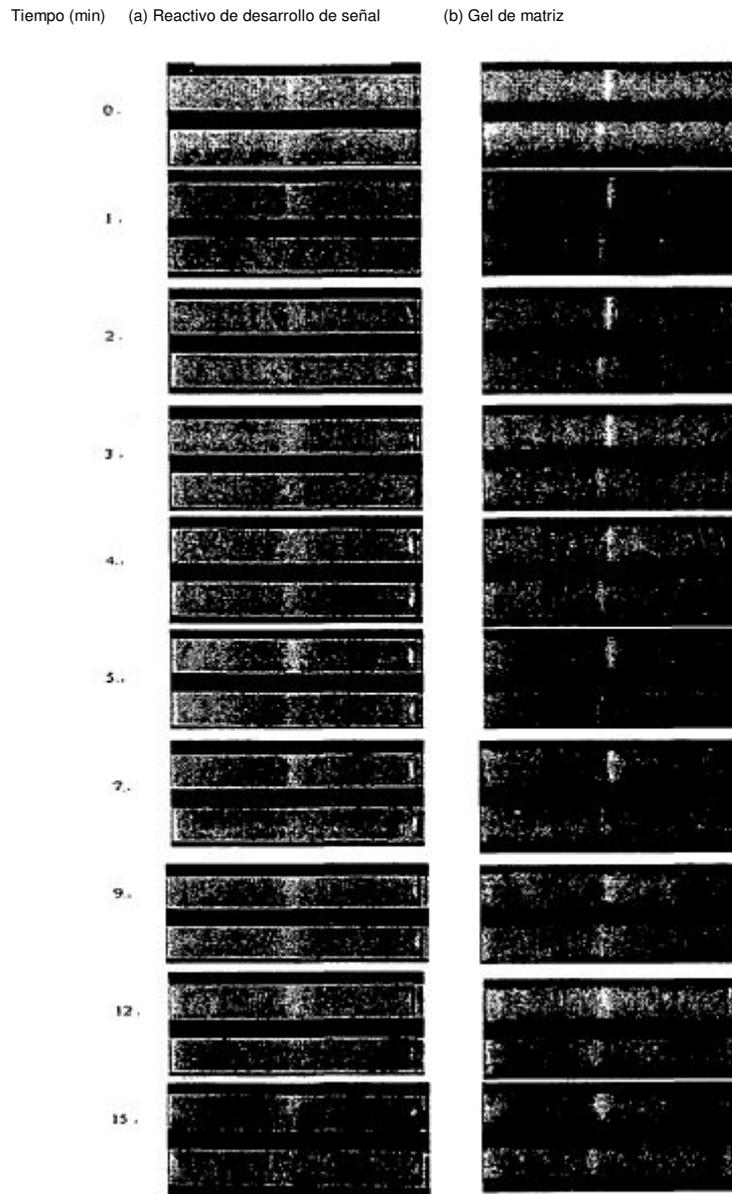


Figura 4



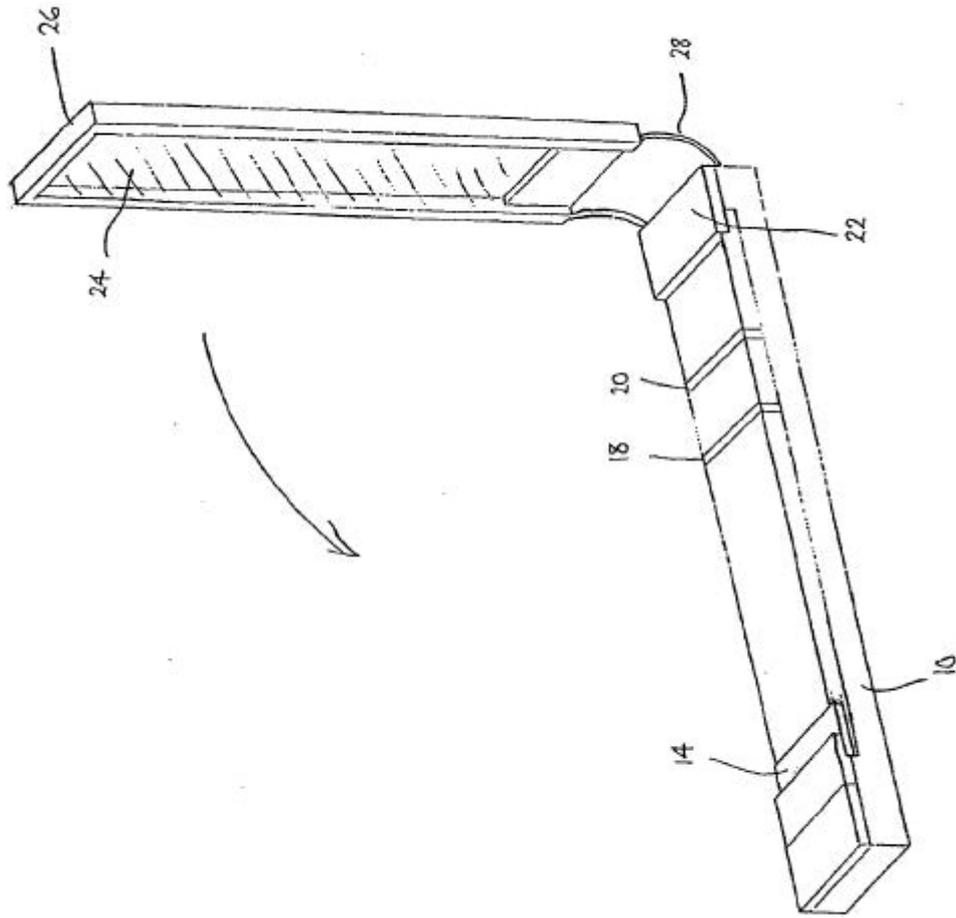


Figura 5