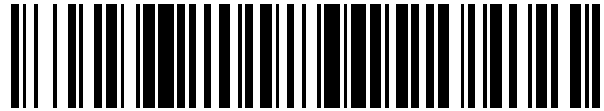


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 940**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2009 E 09785337 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2321050**

54 Título: **Dispositivo y métodos de ensayo**

30 Prioridad:

15.07.2008 GB 0812907
28.05.2009 GB 0909130

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2014

73 Titular/es:

L3 TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
The Elms Courtyard
BromsberrowLedbury-Hertfordshire HR8 1RZ, GB

72 Inventor/es:

NICHOLLS, ANTHONY;
GARCIA, LAURA;
HUDSON, MARK;
JONES, GARETH y
CLARKE, DAVID

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 524 940 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y métodos de ensayo

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el uso de polímeros anfipáticos para mejorar el flujo lateral y la mezcla de los reactivos en los dispositivos de ensayo. Más específicamente, la invención se relaciona con el uso de un polímero anfipático en métodos de ensayo que incluyen un dispositivo para la determinación de la concentración de lípidos en el suero o el plasma de la sangre.

Antecedentes de la invención

15 Los dispositivos y los métodos de ensayo de flujo lateral se conocen en la técnica. Los dispositivos de la técnica anterior incluyen los que se muestran en el documento WO 01/47637, que describe un dispositivo de ensayo que comprende una vía de flujo hacia la superficie a la cual está unido un polímero no iónico hidrofílico. Anteriormente, dichos dispositivos se han desarrollado para muestras de prueba que están fácilmente disponibles en grandes cantidades. Sin embargo, cuando la muestra de prueba es sangre o un componente de la sangre, la recolección de una muestra grande no siempre es posible, particularmente en un punto de asistencia tal como la consulta de un médico.

20 Generalmente estos dispositivos comprenden una matriz de flujo lateral, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa y similares. Una muestra aplicada a la matriz fluye a lo largo de la matriz, y uno o más analitos dentro de la muestra reaccionan con uno o más reactivos dentro de la matriz de flujo lateral. Típicamente, al menos uno de estos reactivos está inmovilizado dentro de la matriz lo que permite detectar cualquier reacción con los analitos, por ejemplo, visualmente. Desafortunadamente, las variaciones asociadas con la transferencia de la muestra y la difusión de la muestra a la membrana resulta en un flujo que es en gran medida incontrolado e irregular antes de alcanzar el área de prueba. Esto se debe a que dichos dispositivos se basan sólo en la acción capilar de los fluidos. Tal dependencia de la acción capilar puede tener un efecto adverso sobre la exactitud del dispositivo debido a que la cantidad de analito y/o marcador capturado a través de un área de prueba no es consistente. El uso de la acción capilar sola significa además que los ensayos son lentos debido a la poca confiable absorción por capilaridad del fluido. Los ensayos son además inadecuados para muestras de fluido pequeñas, tal como en la detección de ácidos nucleicos, donde la membrana puede secarse antes de que el ensayo esté completo o el fluido puede ser insuficiente para desplazarse por la longitud del dispositivo de prueba.

35 Como tal, actualmente existe la necesidad de una técnica simple y eficiente para mejorar los ensayos de flujo lateral, particularmente para permitir la prueba más rápida a la vez que permite realizar pruebas de pequeño volumen.

Un área donde los dispositivos de flujo lateral para puntos de asistencia serían útiles es en el campo de las pruebas del colesterol y lípidos en la sangre.

40 Es bien conocido que la concentración de varias lipoproteínas en la sangre se correlaciona con el riesgo de un individuo de desarrollar aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad que afecta los vasos sanguíneos de las arterias y se refiere comúnmente como un "endurecimiento" o "revestimiento" de las arterias. Es provocada por la formación de múltiples placas sobre las paredes de los vasos sanguíneos, en gran parte debido a la acumulación de células blancas macrófagas de la sangre y promovida por las lipoproteínas de baja densidad. Sin la eliminación adecuada de las grasas y el colesterol de los macrófagos por las lipoproteínas de alta densidad (HDL), se desarrolla una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias.

50 La mayor parte del colesterol circulante en el plasma de la sangre se encuentra en tres clases principales de lipoproteínas. El colesterol y los ésteres de colesterol son sustancias insolubles en agua y por ello son transportados por estas lipoproteínas dentro del sistema circulatorio para su utilización eventual por las células del cuerpo.

Cada una de estas clases de lipoproteínas transporta cantidades variables de colesterol. El colesterol total del suero es por ello un promedio complejo de la cantidad que aporta cada clase de lipoproteína a la concentración total de lipoproteínas del suero.

55 Cada clase de lipoproteína juega un papel diferente en la aterosclerosis. Las lipoproteínas de alta densidad o HDL se consideran generalmente como 'colesterol bueno', es decir que son anti-aterogénicas. En contraste, las lipoproteínas de baja densidad o LDL se refieren frecuentemente como 'colesterol malo' dado que se conoce que son altamente aterogénicas. Otra clase de lipoproteínas, las lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL se consideran ligeramente aterogénicas.

60

Los niveles de HDL en la sangre se han investigado extensamente en vista de la relación inversa entre el colesterol HDL y el riesgo de aterosclerosis y, por ejemplo, ataque al corazón. Por lo tanto, si se determina que los niveles de colesterol HDL son bajos, un individuo puede tener un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis. Por ello, este riesgo puede estimarse al ensayar el colesterol HDL. A partir de los resultados de este ensayo puede calcularse una cantidad aproximada de colesterol LDL mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - 1/5 \text{ Colesterol Total} - \text{colesterol HDL}$$

Para determinar el contenido de colesterol de las diversas fracciones de colesterol, se usan generalmente cuatro métodos. Estos incluyen (1) ultracentrifugación, (2) precipitación fraccionada, (3) cálculo mediante el uso de la ecuación de Friedewald y (4) separación electroforética y precipitación.

Cada uno de estos métodos tiene una serie de desventajas. Por ejemplo, la ultracentrifugación requiere el uso de equipamiento de laboratorio especializado y puede tomar varios días para completarse. La precipitación fraccionada y la separación electroforética consumen tiempo y también requieren el uso de equipamiento especializado. La ecuación de Friedewald es inexacta debido a que estima la concentración del colesterol LDL mediante la sustracción del colesterol asociado con otras clases de lipoproteínas. Por lo tanto, la ecuación proporciona una estimación indirecta sobre la base de tres análisis de lípidos independientes cada uno de los cuales proporciona una fuente potencial de error.

Como resultado de estas desventajas, los resultados de los ensayos de colesterol no están disponibles por varias horas o incluso días y no pueden realizarse en laboratorios más pequeños o por médicos en sus consultas. En consecuencia existe la necesidad de un dispositivo y un método para realizar un ensayo de colesterol que sea simple y barato de usar. Además existe la necesidad de un ensayo que mida directamente la concentración de cada clase de lipoproteína sin depender de estimaciones indirectas.

Cuando se adicionan moléculas hidrofóbicas sólidas a una solución o suspensión acuosa estas forman un precipitado inmediato y no entran a la fase acuosa debido a que las moléculas hidrofóbicas se 'pegan' entre sí en lugar de disolverse. Incluso con la agitación vigorosa del precipitado el número de encuentros directos entre las moléculas hidrofóbicas y las moléculas en solución es pequeño. Tales interacciones también pueden ser termodinámicamente desfavorables.

Los métodos de la técnica anterior implican disolver las moléculas hidrofóbicas en solventes orgánicos miscibles en agua adecuados antes de mezclar con una solución o suspensión acuosa. En su entrada a la solución acuosa, las moléculas hidrofóbicas están mono-dispersas y por ello tienen una mayor probabilidad de interactuar con las moléculas que ya están en solución. Sin embargo, dichos métodos tienen la desventaja de que el solvente orgánico es frecuentemente tóxico o puede interferir con reacciones enzimáticas o la medición de la fluorescencia. Dichos métodos generalmente no son adecuados además para el uso en un punto de asistencia tal como la consulta de un médico o clínica.

Resumen de la invención

Los solicitantes han hecho el sorprendente descubrimiento de que mediante el uso de polímeros anfipáticos en un sistema de ensayo, pueden lograrse ganancias considerables en la eficiencia y/o la velocidad del ensayo. Los métodos de los solicitantes son aplicables además para combinar rápidamente reactivos y compuestos hidrofóbicos tales como luminóforos con analitos, por ejemplo lipoproteínas, en solución(s) /suspensión(s) acuosa(s) sin la aplicación directa de solventes orgánicos. Este método permite cuantificar fácilmente el contenido de lipoproteínas de la sangre, los productos alimenticios, y similares mediante la medición de la fluorescencia. El uso de dichos métodos ha permitido además el desarrollo de un sistema de ensayo de colesterol para puntos de asistencia rápido y barato.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de ensayo para detectar la presencia o la cantidad de un analito que reside en una muestra acuosa, el dispositivo que comprende: al menos una vía de flujo a lo largo de la cual puede desplazarse una muestra acuosa, caracterizada porque la al menos una vía de flujo comprende al menos un polímero anfipático en donde, en uso el paso del fluido a lo largo de la vía de flujo es mayor que el esperado por la acción capilar sola.

Un polímero anfipático es un polímero que posee propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas. Dicho compuesto puede denominarse además un compuesto anfifílico o un polímero hidrofílico no iónico. En modalidades particulares un polímero anfipático es una sustancia que es soluble en agua y en una amplia variedad de solventes orgánicos.

La presente invención se relaciona con el uso de polímeros anfipáticos tales como polietilenglicol para promover y/o

controlar el flujo lateral del fluido. La invención puede utilizarse además para aumentar la interacción entre una muestra acuosa y al menos un reactivo, preferentemente entre luminóforos hidrofóbicos y lipoproteínas.

La vía de flujo está recubierta con el al menos un polímero anfipático.

5

Sorprendentemente se ha encontrado que los polímeros anfipáticos pueden usarse para recubrir la superficie de, por ejemplo, plásticos o vidrio para mejorar el flujo del fluido para mover y/o mezclar soluciones acuosas, por ejemplo con componentes 'secos' combinados dentro de o como capas por encima o por debajo del recubrimiento de polímeros anfipáticos. El uso de polímeros anfipáticos además tiene la ventaja de que el flujo lateral de los fluidos mejora, por ejemplo, sobre la 'absorción por capilaridad' tradicional con materiales porosos tal como se describe en US6,485,982. Los métodos de absorción por capilaridad de la técnica anterior se basan en el uso de un vehículo de soporte tal como papel o una membrana a través del cual se arrastra el líquido por acción capilar. El uso de polímeros anfipáticos elimina la necesidad de un vehículo de soporte que depende solamente de la acción capilar y tiene el efecto sorprendente de que los líquidos pueden desplazarse a mayores distancias o a mayores velocidades, por ejemplo, a lo largo de microtubos o superficies que en los materiales porosos por la acción capilar sola.

10

15

Como se usa en la presente, el término "flujo lateral" se refiere al movimiento de un fluido sobre una superficie en donde el fluido fluye, por ejemplo lateralmente, en una dirección particular o a lo largo de una vía particular. Preferentemente el fluido fluye a una mayor velocidad o por una mayor distancia que las observadas por la acción capilar sola a través de un material particular. Debe señalarse que el término "flujo lateral" pretende ser descriptivo y no limitante, ya que el dispositivo puede configurarse de otras maneras con el mismo efecto, por ejemplo, puede preverse fácilmente el uso de flujo radial o vertical con el empleo de los mismos principios de la presente invención, sin apartarse del espíritu de la invención. En modalidades particulares el fluido interactúa coincidentemente con, y los analitos contenidos en el mismo pueden reaccionar con, varios reactivos a medida que fluye o se desplaza.

20

25

El dispositivo comprende al menos una vía de flujo a lo largo de la cual puede desplazarse una muestra acuosa, y se caracteriza porque la al menos una vía de flujo comprende al menos un polímero anfipático en donde, en uso el paso del fluido a lo largo de la vía de flujo es mayor que el esperado por la acción capilar sola. En contraste con la técnica anterior, el dispositivo no requiere una membrana porosa para el flujo lateral del fluido, en su lugar el fluido puede desplazarse a lo largo de la vía de flujo que comprende el al menos un polímero anfipático.

30

Sorprendentemente se ha descubierto que los fluidos se desplazan más rápido y/o por mayores distancias a lo largo de una vía de flujo que comprende un polímero anfipático que a lo largo de vías de flujo que comprenden materiales porosos, tales como membranas.

35

En modalidades particulares la vía de flujo contiene el al menos un polímero anfipático.

Por lo tanto, un polímero anfipático puede usarse para recubrir una superficie tal como el interior de un tubo, capilar, canal, pocillo, membrana o similares. Resultará evidente que el polímero anfipático puede usarse además como un recubrimiento para membranas usadas en ensayos de flujo lateral 'estándar' para acelerar y/o proporcionar mayor control sobre el flujo del fluido.

40

El polímero hidrofóbico o anfipático puede imprimirse y/o rociarse sobre una superficie, tal como una superficie plana, por ejemplo formando 'pistas' y/o capas, por métodos de impresión tales como mediante impresión por chorro de tinta o por chorro de burbujas, pintura, impresión por rociado u otros métodos de aplicación.

45

El polímero anfipático puede estar en forma de una película.

En otras modalidades, la película puede triturarse hasta material particulado o puede formarse en, por ejemplo, gránulos, perlas, bolitas, microesferas o nanoesferas o picoesferas. El polímero anfipático en sí puede estar en forma de gránulos, perlas, bolitas, microesferas, nanoesferas o picoesferas.

50

Aún en otras modalidades el polímero anfipático puede imprimirse como parte de o formando uno o más conjuntos de gotitas en nano-, pico-, o femto-litros.

55

Preferentemente, el polímero anfipático comprende al menos una sonda, reportero o reactivo. Preferentemente el reportero es un compuesto o reactivo hidrofóbico tal como un luminóforo.

Para combinar un compuesto o reactivo hidrofóbico con el polímero, dicho compuesto o reactivo hidrofóbico debe disolverse primero en un solvente, tal como un solvente orgánico, que es miscible con el polímero anfipático. El polímero anfipático se

60

disuelve además en un solvente tal como agua o un solvente más volátil tal como dimetil formamida o cloroformo aunque otros solventes adecuados resultarán fácilmente evidentes a un experto en la técnica. El compuesto o reactivo hidrofóbico y el polímero anfipático se combinan entonces y después se secan preferentemente en una película delgada. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que en el secado, no existe fase de separación del compuesto o reactivo hidrofóbico y el polímero.

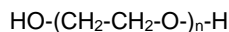
La vía de flujo puede comprender al menos una sonda, reportero o reactivo. La vía de flujo puede contener la sonda, reportero o reactivo.

Por lo tanto, la combinación de al menos un luminóforo hidrofóbico y un polímero anfipático puede usarse para recubrir una superficie tal como el interior de un tubo, capilar, canal, pocillo, membrana o similares. Aún en otras modalidades, la combinación puede imprimirse sobre una superficie, por ejemplo formando 'pistas', por métodos de impresión tales como mediante impresión por chorro de tinta o por chorro de burbujas, pintura, impresión por rociado u otros métodos de aplicación. La sonda, reportero o reactivo puede estar adyacente a la al menos una vía de flujo. Alternativamente, la sonda, reportero o reactivo puede estar en capas directamente por encima o por debajo de la al menos una vía de flujo. Por lo tanto, los reactivos pueden estar dentro de la vía de flujo en sí, por ejemplo combinados con el polímero anfipático o pueden disponerse como capas distintas o imprimirse como 'puntos' por encima, por debajo o al lado del polímero anfipático.

Resultará evidente que los métodos de la invención son aplicables además a reactivos distintos de los luminóforos hidrofóbicos, por ejemplo, tales como enzimas, reactivos de bloqueo, sustancias químicas y similares.

Particularmente el polímero anfipático es polietilenglicol (PEG) con un peso molecular de aproximadamente 1000 a 20,000 Da, más particularmente entre aproximadamente 1000 a 6000 Da y aún más particularmente de aproximadamente 1000 a 3000 Da. PEG particulares incluyen PEG2000, PEG6000, PEG12000 y PEG20000.

El polietilenglicol, conocidos además como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), es un oligómero o polímero de óxido de etileno. Los PEG están disponibles en una amplia variedad de pesos moleculares de 300 g/mol a 10,000,000 g/mol. PEG tiene la siguiente estructura general:



Los números se incluyen con frecuencia en los nombres de los PEG para indicar sus pesos moleculares promedio. Por ejemplo, un PEG con $n=80$ tendrá un peso molecular promedio de aproximadamente 3500 daltons y se etiquetará como PEG 3500.

Generalmente los PEG incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares. Aunque los PEG que tienen diferentes pesos moleculares encuentran uso en una variedad de aplicaciones debido a sus propiedades físicas diferentes, tales como la viscosidad, sus propiedades químicas son casi idénticas. Diferentes formas de PEG están disponibles además en dependencia del iniciador usado para el proceso de polimerización, tal como PEG éter metílico monofuncional (metoxipoli(etilenglicol)), abreviado mPEG. Los PEG están disponibles además con diferentes geometrías. Los PEG ramificados tienen 3 a 10 cadenas de PEG que emanan de un grupo núcleo central. Los PEG estrella tienen 10 - 100 PEG cadenas de PEG que emanan de un grupo núcleo central. Los PEG comb tienen múltiples cadenas de PEG normalmente injertadas a un cadena principal del polímero. Los PEG además pueden acoplarse covalentemente a otras moléculas en un proceso conocido como PEGilación que puede ser ventajoso cuando se usan las propiedades de flujo de fluido del PEG para la mezcla de reactivos por ejemplo.

Los polímeros anfipáticos adicionales pueden incluir polipéptidos anfipáticos, es decir, un polipéptido que tiene una estructura secundaria de tal manera que el polipéptido tiene una cara hidrofílica y una hidrofóbica. El diseño de estructuras de péptidos anfipáticos (por ejemplo polipéptidos con alfa hélice) se conoce en la técnica. Por ejemplo, en: Grell y otros (2001) J Pept Sci 7(3):146-51; Chen y otros (2002) J Pept Res 59(1):18-33; Iwata y otros (1994) J boil Chem 269(7):4928-33; Cornut y otros (1994) FEBS Lett 340(1):29-33; Negrete y otros (1998) Protein Sci 7(6):1368-79. Otros polímeros anfipáticos o no iónicos incluyen alcohol polivinílico (PVA) (Sigma Aldrich: 360627-25G), carboximetilcelulosa (Sigma: C-5678); 0,0'-Bis(2-aminoetilo) PEG 2000 (polioxietileno bis(amina)) (Aldrich Chemistry: 14501) y éter metílico de PEG 5000 (Aldrich Chemistry: 81323-250G) y otros polímeros iónicos.

Preferentemente el dispositivo comprende además al menos un área de aplicación para la aplicación de una muestra acuosa.

Un área de aplicación es la región en el aparato en donde se aplica la muestra. Preferentemente existe un área de

5 aplicación única a partir de la cual una pluralidad si no al menos una, dos, tres o más alícuotas de la muestra pueden tomarse para realizar ensayos de acuerdo con el método de la invención. Alternativamente pueden existir áreas de aplicación separadas para cada una o diferentes alícuotas de la muestra. Se apreciará que, en algunas modalidades, el dispositivo puede estar diseñado de tal manera que la muestra pueda introducirse directamente en el(las) área(s) de prueba obviando la necesidad de un área de aplicación.

10 El término "muestra acuosa" como se usa en la presente se refiere a cualquier muestra líquida, preferentemente una a partir de la cual pueda detectarse un analito. Los ejemplos no limitantes de tales muestras incluyen muestras de sangre total, suero o plasma, orina, fluido cefalorraquídeo (CSF), linfa, exudado seroso u otros fluidos biológicos, homogenados de tejido animal, homogenados de tejido desproteinizado, leche, huevo crudo, caldos de fermentación, alimentos para animales, y alimentos marinos. Se apreciará que una muestra sólo necesita estar en forma líquida o acuosa por al menos una parte esencial de cualquier ensayo. Por lo tanto, un experto en la técnica puede prever que tal ensayo también puede llevarse a cabo a temperaturas por encima del punto de fusión de una muestra, tal como una cera o lípido por ejemplo, que es normalmente sólido a temperatura ambiente.

15 Preferentemente el dispositivo comprende además al menos un área de prueba en donde se determina el resultado y/o el progreso de una reacción entre una parte de la muestra acuosa y la sonda, reportero o reactivo.

20 El(Las) área(s) de prueba es(son) una región(es) en las que puede determinarse el resultado y/o el progreso de una reacción entre un analito y la sonda, reportero o reactivo. El(Las) área(s) de prueba puede(n) ponerse en contacto con instrumentos de excitación.

25 Preferentemente al menos una vía de flujo está en comunicación continua con al menos un área de aplicación y al menos un área de prueba. Preferentemente, el aparato comprende una pluralidad de vías de flujo y áreas de prueba. Preferentemente la vía de flujo conecta, por ejemplo mediante comunicación continua, un área de aplicación con al menos un área de prueba.

30 La vía de flujo puede ser un canal, ranura, capilar, pista o vía y similares. La vía de flujo comprende un polímero anfipático. El polímero anfipático puede estar en forma de un recubrimiento o película sobre la superficie de la vía de flujo o puede estar en forma de un polvo, bolitas, micropartículas, nanopartículas, picopartículas o relleno dentro de una cavidad de la vía de flujo. Cuando el polímero anfipático es un relleno dentro de una cavidad puede rellenar la cavidad completamente o puede ser un relleno parcial con, por ejemplo, hendiduras. Alternativamente, el polímero anfipático puede ser la vía de flujo, por ejemplo, proporcionado como una pista o vía, por ejemplo, impreso sobre una superficie a lo largo de la cual se produce el flujo lateral del fluido.

35 La vía de flujo que comprende el polímero anfipático puede comprender además otros reactivos requeridos para el(los) ensayo(s), por ejemplo, al menos un luminóforo hidrofóbico y/o al menos una enzima. Diferentes vías de flujo pueden comprender diferentes reactivos. Una vía de flujo puede comprender además diferentes reactivos a lo largo de su longitud, por ejemplo, lo que permite la adición secuencial de reactivos a través del flujo lateral de la muestra acuosa. Alternativamente la vía de flujo comprende el polímero anfipático solo que conduce a un(unas) área(s) de prueba que comprende(n) el polímero anfipático en combinación con otros reactivos. Los reactivos pueden estar dentro de la vía de flujo en sí, por ejemplo combinados con el polímero anfipático o pueden disponerse como capas por encima, por debajo o al lado del polímero anfipático.

40 Preferentemente el resultado y/o el progreso de una reacción se determina mediante instrumentos de medición ópticos. Alternativamente el resultado y/o el progreso de una reacción se determina por inspección visual. Más particularmente el resultado y/o el progreso de una reacción se determina mediante instrumentos de fluorescencia.

45 Por lo tanto se prefiere que el área de prueba esté dispuesta de manera que pueda ponerse en contacto óptico con instrumentos de excitación. El área de prueba debe disponerse de tal manera que la fluorescencia producida a partir del ensayo pueda detectarse mediante el instrumento de detección. Pueden existir áreas de prueba separadas para diferentes aspectos del mismo ensayo o para diferentes ensayos. Los "instrumentos de excitación" son instrumentos factibles para excitar la muestra de manera que al menos un componente de la muestra - usualmente una sonda o reportero- fluoresce.

50 El uso del término 'contacto' anterior no pretende implicar o limitarse al contacto físico, en este contexto el término puede significar simplemente que el(las) área(s) de prueba se mueve(n) físicamente en la trayectoria de un haz de luz o que el área de prueba es iluminada/excitada por un haz de luz.

55 Los instrumentos de detección son instrumentos factibles para detectar la fluorescencia emitida por la muestra. En modalidades particulares, la medición puede realizarse simplemente por inspección visual. En este caso, los instrumentos de excitación y los instrumentos de detección pueden no ser necesarios.

5 En modalidades particulares el dispositivo comprende al menos dos componentes separables. Con mayor preferencia los al menos dos componentes separables son un lector y un cartucho de prueba. Por lo tanto, el aparato puede comprender dos o más componentes separados, por ejemplo, un lector y un cartucho adaptado para colocarse en comunicación funcional con el lector. Preferentemente, el cartucho puede insertarse en, colocarse en o unirse al lector. El lector puede comprender instrumentos de acoplamiento en los que se inserta, se coloca o se une el cartucho. Los instrumentos de acoplamiento pueden ser una ranura. Por tanto, preferentemente, el cartucho es removible del lector. El cartucho puede adoptar una variedad de formas, por ejemplo, una tarjeta, un chip o diapositiva, y construirse a partir de materiales conocidos en la técnica, por ejemplo, cartón, vidrio, silicio, plásticos y similares. Preferentemente el material comprende, o es, un material hidrofóbico o tiene regiones que son hidrofóbicas.

10 Preferentemente el cartucho de prueba comprende la al menos una vía de flujo. Preferentemente el cartucho de prueba es desechable y puede reemplazarse con un nuevo cartucho que contiene nuevos reactivos de ensayo. Preferentemente el lector es un componente reutilizable.

15 En modalidades preferidas el dispositivo es un dispositivo de ensayo para detectar la presencia o la cantidad de un analito que reside en una muestra acuosa que comprende:

- 20 (i) al menos un área de aplicación adecuada para la aplicación de una muestra acuosa al dispositivo;
- (ii) al menos una sonda, reportero o reactivo en donde, en uso la al menos una sonda, reportero o reactivo es capaz de reaccionar con un analito que reside en la muestra acuosa;
- (iii) al menos un área de prueba en donde, en uso puede determinarse el resultado y/o el progreso de una reacción entre el analito y la al menos una sonda, reportero o reactivo;
- 25 (iv) al menos una vía de flujo que está en comunicación continua con el al menos un área de aplicación y el al menos un área de prueba,

caracterizado porque la al menos una vía de flujo comprende al menos un polímero anfipático y en donde, en uso el paso del fluido a lo largo de la al menos una vía de flujo es mayor que el esperado por la acción capilar sola.

30 En modalidades particulares el aparato comprende un área de aplicación única y una pluralidad de vías de flujo, por ejemplo cuatro, que conducen a una pluralidad, por ejemplo al menos tres, áreas de prueba.

35 Cuando el dispositivo comprende al menos tres áreas de prueba y al menos tres vías de flujo preferentemente, una primera vía de flujo está en comunicación continua con el área de aplicación y una primera área de prueba, una segunda vía de flujo está en comunicación continua con el área de aplicación y una segunda área de prueba y una tercera vía de flujo está en comunicación continua con el área de aplicación y una tercera área de prueba.

40 En una modalidad la primera vía de flujo y/o área de prueba comprende el polímero anfipático en combinación con un primer luminóforo hidrofóbico y opcionalmente al menos una enzima. Una segunda vía de flujo y/o área de prueba comprende el polímero anfipático en combinación con un segundo luminóforo hidrofóbico y opcionalmente al menos una enzima. La tercera vía de flujo y/o área de prueba comprende el polímero anfipático en combinación con ya sea el primer, segundo o un tercer luminóforo hidrofóbico y opcionalmente al menos una enzima. En el uso la muestra (en forma acuosa) aplicada al área de aplicación se impulsa a lo largo de la al menos una vía de flujo al(a las) área(s) de prueba(s) respectiva(s) por el flujo lateral efectuado por el polímero anfipático. A medida que la muestra fluye a lo largo de la al menos una vía de flujo esta se presenta y se mezcla con el luminóforo hidrofóbico y/u otros reactivos. Alternativamente, la muestra sólo se presenta con el luminóforo hidrofóbico y/u otros reactivos cuando alcanza el área de prueba. Preferentemente la muestra se mueve mediante flujo lateral sin requerir fuerzas externas, tales como bombas, para mover la muestra acuosa. Una vez que la muestra acuosa alcanza el(las) área(s) de prueba pueden tomarse las mediciones.

50 Cuando el ensayo es un ensayo de perfiles de lípidos, la sonda, el reportero o reactivo se pueden seleccionar del grupo que consiste en Amplex Rojo, K37, Rojo del Nilo, colesterol esterasa, colesterol oxidasa o peroxidasa de rábano picante.

55 Amplex Rojo (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), disponible de Invitrogen (catálogos números A12222 y A22177) entre otros, reacciona con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con una estequiometría 1:1 para producir resorufina muy fluorescente. K37 (4-dimetilamino-4'-difluorometil-sulfonilo-bencilideno-acetofona) se describe por los inventores en su solicitud de patente internacional anterior PCT/GB2005/004757. El rojo del Nilo un tinte lipofílico, conocido además como oxazona azul Nilo, está disponible de Invitrogen (número de catálogo N1142) o puede producirse al hervir una solución de azul Nilo con ácido sulfúrico. El rojo del Nilo tiñe de rojo las gotitas de lípidos intracelulares y además es intensamente fluorescente, con una fuerte emisión amarillo dorada en un ambiente rico en lípidos.

La colesterol esterasa (Esteril-éster acilhidrolasa, Número de registro: EC 3.1.1.13) es una enzima que cataliza la hidrólisis del éster de colesterol y algunos otros ésteres de esterol, para liberar colesterol más un anión de ácido graso. Colesterol oxidasa (Colesterol:oxígeno oxidorreductasa, Número de registro: EC 1.1.3.6) es una enzima que cataliza la oxidación de colesterol en presencia de oxígeno molecular a 4-colesten-3-ona y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich, Número de registro: EC 1.11.1.7) es un peróxido de hidrógeno oxidorreductasa. Otras peróxido de hidrógeno oxidorreductasas equivalentes se conocen y pueden derivarse de, por ejemplo, frijol de soja.

Para el perfil de lípidos una primera vía de flujo comprende Amplex Rojo, una segunda vía de flujo comprende K37 y una tercera vía de flujo comprende rojo del Nilo. Alternativamente la primera área de prueba puede comprender Amplex Rojo, la segunda área de prueba puede comprender K37 y la tercera área de prueba puede comprender rojo del Nilo. Aún con mayor preferencia, cuando la primera vía de flujo comprende Amplex Rojo, la primera vía de flujo comprende además colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante. En modalidades alternativas la primera área de prueba puede comprender colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante. Aún en otras modalidades el área de aplicación comprende la al menos una sonda, reportero o reactivo seleccionado del grupo que consiste en Amplex Rojo, K37, rojo del Nilo, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante.

Preferentemente la sonda, reportero o reactivo está en forma seca.

De manera favorable, el aparato puede usarse para llevar a cabo ensayos rápidos y fáciles que pueden realizarse simultáneamente, en paralelo, para determinar la presencia/ausencia o concentración de un analito a partir del fluido biológico. Por ejemplo, el uso de un polímero anfipático reduce el tiempo que toma un ensayo desde varias horas o incluso días hasta alrededor de tan poco como un minuto.

En otro aspecto se proporciona un método para medir un analito en una muestra biológica acuosa que comprende:

(i) poner en contacto la muestra biológica acuosa con una combinación de al menos un luminóforo hidrofóbico y al menos un polímero anfipático en donde, el al menos un luminóforo hidrofóbico se une al menos a un analito en la muestra biológica acuosa y cuando se une a él fluoresce bajo la excitación adecuada;

(ii) excitar el(los) producto(s) de la etapa (i) a una longitud de onda de excitación;

(iii) medir la emisión de fluorescencia después de la etapa (ii) a una longitud de onda de detección adecuada.

Resultará evidente a un experto en la técnica que las longitudes de onda de excitación y de emisión adecuadas dependerán del colorante o luminóforo particular usado. La selección de longitudes de onda adecuadas puede determinarse mediante el uso de técnicas de laboratorio estándar o de datos disponibles con relación al colorante o luminóforo.

En una modalidad del método, la muestra biológica acuosa se pone en contacto con el al menos un polímero anfipático antes de ponerse en contacto con al menos un luminóforo hidrofóbico.

En una modalidad alternativa, la muestra biológica acuosa se pone en contacto con el al menos un polímero anfipático sustancialmente en el mismo momento que se pone en contacto con al menos un luminóforo hidrofóbico.

A manera de ejemplo no limitante, la muestra biológica (en forma acuosa) se aplica a un área de aplicación en, por ejemplo, un chip de prueba o tarjeta de acuerdo con el primer y el segundo aspectos de la invención. El área de aplicación se conecta a al menos una, preferentemente tres, cuatro o más áreas de prueba. La conexión entre las áreas puede ser mediante canales, capilares, pistas y similares. Los canales, capilares y similares se recubren preferentemente con un polímero anfipático. Cuando se usan pistas, pueden formarse de un polímero anfipático, por ejemplo, impreso o fijado sobre una superficie. El polímero anfipático 'absorbe por capilaridad' o arrastra la muestra acuosa desde el área de aplicación, a lo largo de los canales, capilares, pistas y similares, hasta el al menos un área de prueba. Cuando se usan múltiples canales, capilares, pistas y similares, la muestra puede dividirse o separarse en alícuotas a medida que el fluido se desplaza a lo largo de ellos. De esta manera la muestra puede dividirse sin etapas de procesamiento manual a través del uso del flujo lateral efectuado por el polímero anfipático.

Cada canal, capilar, pista y similares puede comprender al menos un luminóforo hidrofóbico en combinación con el polímero anfipático. Cuando está presente, el luminóforo hidrofóbico en cada canal, capilar, pista y similares puede ser el mismo o uno diferente. Cada luminóforo hidrofóbico diferente puede unirse a una clase o subclase específica de lipoproteínas y cuando se une a ella, modifica la producción de fluorescencia bajo la excitación adecuada, lo que es indicativo de la concentración de la clase o subclase específica de lipoproteínas. De manera similar, cada canal, capilar o pista y similares

5 puede comprender además al menos una enzima u otro componente o reactivo. De esta manera, a medida que la muestra se desplaza o fluye (se arrastra) a lo largo de los canales, etc., esta se presenta y se mezcla con otros componentes o reactivos sin la necesidad de etapas de procesamiento manual. Resultará evidente a un experto en la técnica que, como resultado, diferentes cantidades o combinaciones de reactivos o condiciones pueden aplicarse a diferentes alícuotas de la muestra lo que resulta en la realización y medición de diferentes ensayos en cada área de prueba.

10 Preferentemente el al menos un luminóforo hidrofóbico es un colorante, más particularmente un colorante fluorescente y aún más particularmente un colorante que solamente es fluorescente cuando está unido a un analito tal como un componente lipídico.

15 La albúmina sérica humana (HSA) es un componente principal del suero de la sangre que tiene una concentración de aproximadamente 30-50 mg/ml. Se conoce que la HSA tiene al menos dos tipos de sitios de unión que son capaces de unir varios ligandos. Un primer tipo se refiere en la presente como "un dominio hidrofóbico" mientras que un segundo tipo de dominio se refiere en la presente como un "dominio de unión a fármacos". Estos dominios son conocidos para un experto en la técnica y se distinguen entre sí en un artículo en Nature Structural Biology (V5 p827 (1998)). Este artículo identifica un dominio hidrofóbico como uno al que pueden unirse los ácidos grasos mientras que el dominio de unión a fármacos es capaz de unir una serie de fármacos que pueden asociarse a la HSA.

20 Los inventores han establecido que los luminóforos hidrofóbicos pueden unirse a los sitios/dominios de unión hidrofóbica de la HSA y pueden fluorescer cuando están unidos a la HSA. Por ello, los inventores consideran que esta fluorescencia adicional puede provocar una señal de fondo sustancial, que distorsiona potencialmente las mediciones y que conduce a errores en la determinación de la concentración de las lipoproteínas.

25 Por lo tanto, cuando la muestra acuosa es una muestra de sangre, los sitios de unión hidrofóbica de la HSA a los que pueden unirse los luminóforos hidrofóbicos, se bloquean. Por lo tanto, antes del análisis de una muestra se adiciona preferentemente un inhibidor de la unión de ligandos.

30 El inhibidor de la unión de ligandos puede ser hidrofóbico. El inhibidor puede ser anfipático. El inhibidor de la unión de ligandos puede comprender un ácido graso o un derivado funcional de este, así como también otras moléculas hidrofóbicas. Los ejemplos de derivados de ácidos grasos adecuados, que pueden bloquear los sitios de unión hidrofóbica de la HSA pueden comprender un ácido graso, sus ésteres, haluro de acilo, anhídrido carboxílico, o amida etc. Un derivado de ácido graso preferido es un éster de ácido graso.

35 El ácido graso o derivado de este puede comprender un ácido graso C1-C20 o derivado de este. Se prefiere que el ácido graso o derivado de este pueda comprender un ácido graso C3-C18 o derivado de este, con mayor preferencia, un ácido graso C5-C14 o derivado de este, y aún con mayor preferencia, un ácido graso C7-C9 o derivado de este. Se prefiere especialmente que el inhibidor de la unión de ligandos comprenda ácido octanoico (C8) o un derivado de este, por ejemplo, octanoato: Preferentemente, el inhibidor de la unión de ligandos se adiciona como un octanoato de metal alcalino, preferentemente un octanoato de metal alcalino del Grupo I, por ejemplo, octanoato de sodio o potasio.

40 Preferentemente, entre aproximadamente 10-400 mM del inhibidor de la unión de ligandos se adiciona a la muestra antes del análisis, con mayor preferencia, entre aproximadamente 20-200 mM, y aún con mayor preferencia, entre aproximadamente 30-80 mM. Se prefiere especialmente que se adicione aproximadamente 50 mM del inhibidor. Por tanto, en una modalidad preferida del método, aproximadamente 50 mM de octanoato de sodio puede adicionarse a la muestra antes del análisis.

45 Los ligandos para los dominios de unión a fármacos de la HSA incluyen moléculas de fármacos tales como: tiroxina, ibuprofeno, diazepam, hormonas esteroideas y sus derivados (fármacos), hemo, bilirrubina, profármacos lipofílicos, warfarina, fármacos a base de cumarina, anestésicos, diazepam, ibuprofeno y antidepresivos (por ejemplo tioxantina), ácido benzoico o un derivado de este (por ejemplo ácido triclorobenzoico o ácido triyodobenzoico). Alternativamente los dominios de unión de la HSA pueden bloquearse o eliminarse mediante el uso de un instrumento de extracción de la HSA, por ejemplo, anticuerpos anti-HSA.

55 En modalidades particulares la muestra acuosa se usa 'pura', es decir, sin dilución de la muestra antes de usar.

60 En otras modalidades, la muestra acuosa puede diluirse antes de usar. Por ejemplo, cuando la muestra acuosa se deriva de la sangre, puede desearse la dilución de la muestra, por ejemplo mediante el uso de una dilución 1 en 80, antes de realizar el ensayo. Preferentemente el diluyente es solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y comprende al menos un inhibidor de la unión de ligandos. En modalidades particulares, el diluyente comprende dos inhibidores de la unión de ligandos, uno para el(los) sitio(s) de unión hidrofóbica y uno para el(los) sitio(s) de unión a fármacos. Preferentemente los

inhibidores de la unión de ligandos comprenden ácido benzoico y ácido octanoico. Alternativamente, la muestra puede diluirse con PBS y el al menos un inhibidor de la unión de ligandos se combina con el polímero anfipático. Por lo tanto, el inhibidor de la unión de ligandos se adiciona a y se mezcla con la muestra acuosa a medida que esta se desplaza por flujo lateral, por ejemplo, a lo largo del tubo, capilar, canal o pista.

5

En un método preferido una pluralidad de, y al menos dos o tres, ensayos de fluorescencia se llevan a cabo en paralelo bajo condiciones similares.

10

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona un proceso para mejorar el flujo lateral del fluido que comprende recubrir una superficie a lo largo de la cual puede fluir un fluido con un polímero anfipático.

Preferentemente, la superficie está definida por un tubo, capilar, canal, pocillo, membrana o similares.

15

Por lo tanto, un polímero anfipático puede usarse para recubrir una superficie definida por el interior de un tubo, capilar, canal, pocillo, membrana o similares, por ejemplo. Resultará evidente que el polímero anfipático puede usarse además como un recubrimiento para membranas usadas en ensayos de flujo lateral 'estándar' para acelerar y proporcionar mayor control sobre el flujo del fluido. El polímero hidrofóbico o anfipático puede recubrirse, imprimirse y/o rociarse sobre una superficie por ejemplo formando 'pistas' y/o capas, por métodos de impresión tales como mediante impresión por chorro de tinta o por chorro de burbujas u otros métodos de aplicación. En modalidades particulares del proceso el polímero anfipático está en forma de una película. En otras modalidades, la película puede triturarse a material particulado o puede formarse en, por ejemplo, gránulos, perlas, bolitas, microesferas, nanoesferas o picoesferas. El al menos un polímero anfipático puede estar en forma de gránulos, perlas, bolitas, microesferas, nanoesferas o picoesferas.

20

25

De acuerdo con un aspecto adicional, se proporciona el uso de Gafquat para la estabilización de una proteína, en particular una enzima.

30

Sorprendentemente se ha descubierto que los copolímeros de vinilpirrolidona y metacrilato de dimetilaminoetil, vendido por International Speciality Products bajo el nombre comercial Gafquat (RTM), por ejemplo, son reactivos estabilizantes de enzimas adecuados. Gafquat (CAS Número de registro: 53633-54-8; 7732-18-5) es el nombre para una serie de copolímeros solubles en agua tales como policuaternio-11. Es el principal ingrediente activo en muchos productos para el cabello tales como espumas, geles, lacas para el cabello y en el maquillaje de efectos especiales pero nunca antes se ha usado para los propósitos de estabilización de una enzima o proteína. Las enzimas preferidas para la estabilización con Gafquat incluyen colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante aunque Gafquat puede utilizarse para la estabilización de una amplia variedad de enzimas.

35

De acuerdo con un aspecto adicional se proporciona el uso del dispositivo en un ensayo.

Breve descripción de las figuras

40

La invención se describe con la ayuda de las siguientes figuras, aunque no se limita a ellas. Debe entenderse, que las figuras son sólo para propósitos ilustrativos.

45

La Figura 1 muestra los componentes de una modalidad de un cartucho de prueba adecuado para el uso en un punto de asistencia.

Las Figura 2 y 3 ilustran modalidades adicionales de un dispositivo de ensayo.

50

La Figura 4 ilustra modalidades de un canal capilar que define un área de aplicación, una vía de flujo de fluido, una zona de detección y una junta de detención del flujo.

La Figura 5 ilustra el efecto del peso molecular del PEG sobre el régimen de flujo vertical. Las barras de error indican la desviación estándar +/- 1 (los tubos capilares no recubiertos y su orden 1 de desviación estándar se muestran en el peso molecular cero).

55

Descripción detallada de la invención

Con referencia a la Figura 1 de los dibujos, un dispositivo de ensayo (1) comprende generalmente una carcasa que tiene una base (2a) y una cubierta (2b) que protege el área de aplicación (3), las vías de flujo (5) y las áreas de prueba (4) de la contaminación o el daño.

El dispositivo está provisto de una porción de mango estriado (7) que permite a un médico o clínico sostener el dispositivo. La carcasa sobre el área de aplicación (3) comprende un pocillo (3a), en este caso, que tiene lados inclinados para guiar la muestra sobre el área de aplicación. Una ventana (4a) proporciona acceso a las áreas de prueba lo que permite determinar los resultados del ensayo.

Dentro de la carcasa (2a y 2b) hay una tira de plástico hidrofóbica (6) que actúa como un soporte para las vías de flujo de PEG. Las vías de flujo (5) están impresas sobre el soporte las que conducen desde el área de aplicación (3) hasta, en este caso, cuatro áreas de prueba (4). Un filtro (8) está pegado sobre el soporte para filtrar las partículas de la muestra acuosa.

En el uso, un médico o clínico aplica una muestra acuosa al área de aplicación (3). El fluido de la muestra acuosa se desplaza por flujo lateral a lo largo de la vía de flujo hacia y a través del filtro (8). El filtro, que se ha recubierto con PEG, bloquea el desplazamiento de cualquier célula en la muestra más allá a lo largo de las vías de flujo. Una vez que el fluido alcanza las áreas de prueba, las juntas formadas en la vía de flujo separan la muestra en cuatro alícuotas.

Cuando se utiliza en la preparación de un perfil de lípidos, a medida que la primera alícuota se desplaza a lo largo de la vía de flujo 5(a), esta se presenta con y se mezcla con el colorante K37 combinado con el PEG en la vía de flujo. La segunda alícuota se desplaza a lo largo de la vía de flujo 5(b) y se mezcla con un segundo colorante, rojo del Nilo. La tercera alícuota se desplaza a lo largo de la vía de flujo 5(c) y a medida que lo hace, se mezcla con tres enzimas secas, colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante y un colorante, Amplex Rojo. Cada una de las tres alícuotas de muestra, mezclada con los respectivos colorantes fluye a y se recolecta en las áreas de prueba (4). La cuarta área de prueba (5d) se usa como un control para medir la fluorescencia de fondo.

El dispositivo se carga en un lector que a su vez excita cada una de las áreas de prueba y mide cualquier emisión de fluorescencia posterior. El chip de procesamiento dentro del lector calcula la concentración de analitos (tales como colesterol total, triglicéridos, HDL y otros componentes lipídicos) dentro de la muestra y visualiza los resultados en una pantalla LCD.

Las Figuras 2 y 3 ilustran modalidades adicionales de un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención que puede usarse, por ejemplo, en la determinación de los niveles de lipoproteínas en la sangre.

En esta modalidad, el dispositivo de ensayo comprende, una primera superficie de soporte (1). La superficie de soporte generalmente comprende o consiste de un material opaco, por ejemplo un material de plástico que incorpora una cantidad de un pigmento tal como negro de carbón. En este caso, una superficie de soporte se forma a partir de un polímero de calidad médica compatible con la medición fluorescente, luminiscente o fotométrica. Los polímeros de olefinas cíclicas generalmente tienen excelentes propiedades mecánicas, baja autofluorescencia y alta transmisión de UV. Los polímeros adecuados incluyen copolímeros de olefinas cíclicas tales como Topas® COC (número CAS 26007-43-2), Zeonor® COP, Zeonex® COP o Udel® polisulfona (número CAS 25135-51 -7). En este ejemplo el soporte está formado de TOPAS COC que comprende 1 % de negro de carbón. El uso de negro de carbón tiene la ventaja adicional de que, durante la soldadura por láser por ejemplo, se reduce la necesidad de energía lo que aumenta la facilidad de fabricación del dispositivo y protege los componentes lábiles al calor en las cámaras de reacción. El uso de negro de carbón además puede tener beneficios en relación con la disipación/el aislamiento del calor.

La superficie de soporte de esta modalidad está moldeada pero puede formarse mediante cualquier técnica de moldeo o mecanización estándar conocida en la técnica. Aunque es generalmente plana, comprende áreas perfiladas, en este ejemplo de relieve hundido que forman, en este caso cuatro, canales capilares (3) dispuestos en forma de circunferencia alrededor de un área de aplicación (4). En este caso cada uno de los cuatro canales están espaciados equidistantemente entre sí en un ángulo de alrededor de 90°.

La superficie de soporte moldeada forma un área de aplicación (4), vías de flujo de fluido (5) y zonas de detección (6).

Cada extremo de las vías de flujo de fluido (5) más alejado del área de aplicación (4) se caracteriza por un estrechamiento gradual de una o más de las paredes del canal capilar. Este estrechamiento aumenta la anchura y/o profundidad y por extensión el área de la sección transversal del canal de flujo capilar que forma una junta de detención del flujo (7) que evita el flujo capilar del fluido más allá. Aquí, el canal forma un extremo protuberante y puede adoptar una variedad de otras formas. La estructura del canal capilar que define el área de aplicación, la vía de flujo de fluido, la zona de detección y la junta de detención del flujo se muestra en más detalle en la Figura 4. Resultará evidente a un experto en la técnica que los canales pueden disponerse en cualquier serie de formatos o pueden ser de diferentes formas para adecuarse a un ensayo en particular. Por ejemplo, y a manera de ejemplo no limitante, los canales pueden ser de forma ovoide o de 'gota de lágrima', trapezoidal, triangular, en columna o tubular. Otros ejemplos se muestran en la Figura 4. Para el uso en hospitales,

laboratorios o en grandes volúmenes, se concibe que pueden disponerse 10-20, 20-40, 40-60 o 50-100 canales capilares en un dispositivo de ensayo del tamaño y la forma de un disco compacto.

5 La Figura 4 ilustra modalidades adicionales de juntas de detención del flujo. En esta figura la vía de flujo de fluido (5) mantiene un área de la sección transversal pareja a lo largo de sustancialmente su longitud total antes de estrecharse o constreñirse para formar una sección de vía de flujo de fluido de área de sección transversal reducida (13) hacia el extremo distal. Esta sección de vía de flujo de fluido está a su vez adyacente a, y en comunicación continua con una cámara (14). La cámara está dividida en regiones mediante una pared inferior o barrera (15) - en este caso en dos partes (15a) y (15b). En el uso, un fluido entra a la parte de relleno (15a) de la cámara (14). La pared (15), o más exactamente la fuerzas capilares que actúan sobre el fluido de muestra en la región de la pared, detiene el flujo del fluido en la segunda parte de la cámara (15b).
 10 En otras modalidades la pared se reemplaza por una porción elevada (16). De nuevo, las fuerzas capilares que actúan sobre el fluido de muestra en la región de la porción elevada (16), evitan que el fluido rellene la totalidad de la cámara. Un experto en la técnica notará que la configuración (por ejemplo tamaño, forma, altura) de la cámara (14) y la pared (15) o porción elevada (16) puede adoptar una serie de formas que incluyen diferentes formas geométricas tales como círculos, trapecoides y similares. Un puerto de ventilación localizado adyacente a la segunda parte o región distal de la cámara (15b) permite el movimiento de aire desde dentro de la cámara hacia la atmósfera lo que iguala las presiones dentro de las vías de flujo de fluido del dispositivo.

20 La superficie de soporte comprende además una serie de puestos de alineación (8) para alinear la superficie de soporte con la segunda superficie - el elemento de cubierta (2).

El elemento de cubierta (2) también se forma a partir de un polímero de calidad médica adecuado tal como los descritos anteriormente. En este ejemplo el copolímero de olefina cíclica (Topas COC), número CAS 26007-43-2 se usó de nuevo pero en este caso sin negro de carbón. Como resultado el elemento de cubierta es ópticamente claro/transparente - al menos a las longitudes de onda de excitación/emisión del lector del ensayo.

El elemento de cubierta (2) también es moldeado y generalmente plano que comprende una serie de aberturas. El elemento de cubierta puede montarse en el elemento de soporte, que comprende opcionalmente una junta o elemento espaciador posicionado entre ellos. La abertura (9) está alineada al área de aplicación y permite a un usuario aplicar una muestra de fluido al área de aplicación. Una serie adicional de aberturas más pequeñas funcionan como orificios de ventilación (10).

35 En las modalidades mostradas, los orificios de alineación (11) orientan al elemento de cubierta con respecto al elemento de soporte al acomodar los puestos de alineación (8). En modalidades alternativas las aberturas y los orificios de alineación se proporcionan en el elemento de soporte, el elemento de cubierta simplemente cumple el papel de una cubierta.

Los elementos de alineación pueden ser simplemente elementos elevados con orificios o ranuras de alineación correspondientes. Los elementos de soporte y de cubierta pueden fijarse o unirse entre sí por ejemplo mediante instrumentos mecánicos tales como mediante el uso de tornillos, remaches, pernos o lengüetas. Alternativamente los elementos de soporte y de cubierta pueden mantenerse unidos mediante ajuste por fricción. En otras modalidades los elementos de cubierta y soporte se unen entre sí, por ejemplo mediante el uso de pegamentos, solventes, cinta adhesiva y similares. En este caso los elementos de cubierta y soporte se unen entre sí mediante el uso de soldadura por calor y por láser.

45 Uno o ambos de los elementos de soporte y de cubierta pueden comprender instrumentos de identificación, para proporcionar un identificador único y/o para proporcionar unos instrumentos para un lector del ensayo, por ejemplo, para monitorear el número de veces que se usó el dispositivo de ensayo o cuándo se aplicó la muestra de manera que pasa un tiempo de ensayo adecuado. Dichos instrumentos de identificación pueden contener además instrucciones o datos tales como datos de calibración o de control de calidad. Los instrumentos de identificación pueden adoptar una variedad de formas que incluyen, pero sin limitarse a, texto, Braille, datos numéricos, código(s) de barras lineales, código(s) de barras 2D, etiqueta(s) RFID y similares.

Un filtro (12) se sostiene firmemente entre los elementos de soporte y de cubierta adyacentes a y en comunicación continua con el área de aplicación (4) y la abertura (9) y las vías de flujo de fluido.

55 En el uso, se aplica una muestra acuosa no diluida o diluida directamente al filtro por la abertura (9).

El fluido en la muestra migra a través del filtro y a medida que lo hace las partículas muy grandes se eliminan por filtración pasiva. En el caso de la sangre total, dichas partículas incluyen las células rojas de la sangre. Como resultado se reduce la interferencia de fondo de las partículas grandes.

5 Cuando se usa con sangre, por ejemplo sangre total, venosa, el filtro puede comprender además un instrumento de extracción de HSA que comprende anticuerpos anti-HSA que eliminan la HSA de la muestra como se discutió anteriormente, lo que reduce de nuevo el fondo. La sangre puede obtenerse mediante la punzada del dedo o en el caso de los neonatos, una punzada en el talón. Esta es una forma de abrir una herida pequeña, por ejemplo en la punta del dedo, la que produce no más de unas pocas gotas de sangre (~menor que 50 µl tal como de aproximadamente 10 µl a 20 µl). Luego de formarse la gotita de sangre esta puede aplicarse directamente al área de aplicación del dispositivo de ensayo o aspirarse por una pipeta y después aplicarse en consecuencia. Otros instrumentos para obtener una muestra de sangre se conocen en la técnica. La capacidad para utilizar la sangre obtenida mediante, por ejemplo una punzada en el dedo, representa directamente una ventaja significativa sobre los ensayos conocidos en la técnica.

10 Alternativamente el dispositivo de ensayo puede utilizarse para probar una muestra que se deriva del plasma, en cuyo caso puede realizarse una dilución 1 en 80 de la muestra. Generalmente el diluyente que se usa es la solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y esta puede comprender al menos un inhibidor de la unión de ligandos. El diluyente puede comprender además dos inhibidores de la unión de ligandos, uno para el(los) sitio(s) de unión hidrofóbica y uno para el(los) sitio(s) de unión a fármacos.

15 El fluido se desplaza por medio del flujo capilar a partir del área de aplicación (4) en las vías de flujo de fluido (5) con las que el área de aplicación está en comunicación continua. Cuando el líquido se desplaza hidrata los reactivos en forma seca, tales como los colorantes fluorescentes y las enzimas, y se mezcla con ellos. Por lo tanto, la muestra se mueve por flujo capilar o lateral sin que requiera la aplicación de fuerzas externas, tales como bombas, para mover la muestra acuosa. El polímero anfipático o no iónico mejora el flujo capilar y la eficiencia de la mezcla de los reactivos.

20 El uso del término 'forma seca' se refiere a los componentes que se mantienen en una forma en la que generalmente están sustancialmente en su forma libre, o carentes de, líquido o humedad; es decir que no están en solución hasta que se reconstituyen mediante la realización del ensayo en sí, en vez de reconstituirse antes de y separados de los procedimientos del ensayo. Por lo tanto, la muestra acuosa en sí reconstituye el reactivo o los reactivos secos, lo que elimina de esta manera la necesidad de separar los amortiguadores y las etapas de reconstitución. Como se describe anteriormente, el uso del polímero anfipático o no iónico ayuda a la mezcla de los reactivos secos con la muestra acuosa.

25 Cuando se usan las enzimas u otros reactivos, en particular cuando se usan en la forma seca, se prefiere que tales enzimas u otros reactivos se estabilicen. En el contexto de esta invención, un 'reactivo estabilizado' es un reactivo que tiene mejorada la estabilidad con respecto a, por ejemplo, la estabilidad durante el almacenamiento, la estabilidad térmica etcétera. Por lo tanto, en modalidades particulares los reactivos que se usan comprenden un agente estabilizante. Métodos de estabilización particulares se describen en la solicitud de patente internacional números WO90/005182 y WO91/014773. Otros reactivos estabilizantes adecuados incluyen los copolímeros de vinilpirrolidona y metacrilato de dimetilaminoetilo, por ejemplo, vendidos por International Speciality Products bajo el nombre comercial Gafquat (RTM). Gafquat (Número de Registro CAS: 53633-54-8; 7732-18-5) es el nombre para una variedad de copolímeros solubles en agua tal como el Polyquatemium-11.

30 A medida que el frente del fluido se mueve hacia adelante, un volumen equivalente de aire se desplaza a través de los orificios de ventilación lo que iguala la presión dentro del dispositivo. Una vez que el fluido alcanza la junta de detención del flujo, la tensión superficial evita el flujo capilar más allá.

35 En esta etapa el dispositivo puede colocarse dentro de un lector del ensayo adecuado y los niveles de analitos, por ejemplo colesterol y lípidos de la sangre, se miden.

40 La carcasa del dispositivo de ensayo usualmente se adapta para permitir colocarlo en comunicación funcional con el lector del ensayo. Por ejemplo, el dispositivo de ensayo puede insertarse, colocarse en o unirse al lector y el lector puede comprender instrumentos de acoplamiento, tales como una ranura, o instrumentos de alineación para permitir insertar, colocar o unir adecuadamente el dispositivo de ensayo. En esta modalidad, el dispositivo de ensayo tiene un corte en forma 'V' en el elemento de cubierta lo que facilita la alineación del dispositivo de ensayo con un lector. Generalmente el dispositivo de ensayo de la presente invención es desechable aunque el lector usualmente es reutilizable.

45 El dispositivo de ensayo puede usarse para una variedad de procesos o reacciones de ensayo tales como los inmunoensayos y los ensayos fluorimétricos que incluyen ensayos de colesterol, lipoproteínas o triglicéridos.

50 Un inmunoensayo en una prueba bioquímica que mide la concentración de una sustancia en una muestra acuosa, por ejemplo suero u orina. El ensayo utiliza la reacción de un anticuerpo o anticuerpos con sus antígenos que toma ventaja de la unión específica de un anticuerpo con su antígeno. Preferentemente se usan los anticuerpos monoclonales ya que ellos se unen a un sitio de una molécula particular lo que proporciona pruebas específicas y exactas. La presencia del antígeno o los

anticuerpos puede medirse, por ejemplo, cuando se detecta la infección puede medirse la presencia de anticuerpo contra el patógeno. Alternativamente cuando se miden moléculas biológicas tales como hormonas, y similares, la molécula biológica hormonal puede actuar como el antígeno. La respuesta del fluido acuoso que se mide puede compararse con estándares de una concentración conocida, por ejemplo, la línea de una curva estándar en un gráfico. La detección de la cantidad de anticuerpo o antígeno puede lograrse mediante una variedad de métodos tales como el marcaje ya sea del antígeno o del anticuerpo. A manera de ejemplo no limitante, el marcador puede consistir en una enzima (EIA o ELISA), un radioisótopo tal como el I-125, un marcador magnético o un marcador luminiscente o fluorescente.

De manera favorable, el dispositivo de la presente invención se basa en el flujo capilar para el transporte del fluido de muestras de poco volumen ayudado por el uso de un polímero anfipático o no iónico y por ello no existe necesidad de usar partes en movimiento. Por lo tanto, el dispositivo supera los problemas de escala, economía, fabricación y fallos mecánicos encontrados en la técnica anterior.

Un lector de ensayo para usar con el dispositivo de ensayo de la presente invención puede adaptarse para recibir dos o tres dispositivos de ensayo, por ejemplo, de múltiples pacientes o para múltiples pruebas de una muestra acuosa de un paciente individual. Dicho lector puede comprender dos (o más) instrumentos de excitación que pueden alinearse con las zonas de detección del dispositivo de ensayo. Los 'instrumentos de excitación' son factibles para excitar la muestra en la detección, por ejemplo, de manera que esta flourece. El aparato comprenderá además al menos un instrumento de detección el que es factible para detectar, por ejemplo, la fluorecscencia emitida por la muestra en la(s) zona(s) de detección.

Generalmente los instrumentos de excitación comprenden una fuente de iluminación factible para iluminar la muestra a aproximadamente 400 nm-600 nm. En consecuencia la fuente de luz es preferentemente capaz de iluminar la muestra entre aproximadamente 400 nm-600 nm. La fuente de iluminación puede comprender una o más bombillas, o uno o más LED, u otras fuentes tales como uno o más láseres. Las longitudes de onda de excitación pueden variarse utilizando al menos un filtro de interferencia. Los instrumentos de excitación pueden comprender además los instrumentos de polarización factibles para polarizar la luz producida por la fuente de iluminación. Los instrumentos de excitación pueden comprender además instrumentos de enfoque adaptados para enfocar la luz en la muestra. Los instrumentos de enfoque pueden comprender un lente, o guía de luz tal como un filamento de fibra óptica o una película de luz óptica (3M).

Los instrumentos de detección pueden comprender un fotodiodo, CCD, o sensor fotomultiplicador u óptico, el que es preferentemente sensible al amarillo-rojo. La fluorecscencia emitida por la muestra puede detectarse dentro de un intervalo que incluye aproximadamente 440 -650 nm en dependencia del colorante o los colorantes usados. Los instrumentos de detección deben ser capaces de detectar la fluorecscencia emitida a aproximadamente 490 nm, aproximadamente 495 nm, aproximadamente 570 nm, aproximadamente 600 nm y aproximadamente 610 nm. La fluorecscencia puede recolectarse mediante una lente secundaria, y puede pasar a través de un polarizador. La luz de excitación dispersada puede eliminarse mediante un(os) filtro(s) de corte o un(os) filtro(s) de paso de banda. Para la medición de la intensidad de la fluorecscencia, la corriente del fotodiodo o la velocidad de conteo del fotomultiplicador puede leerse a partir de un amperímetro, un voltímetro, o un módulo de velocímetro. Otros instrumentos resultarán evidentes para una persona con experiencia en la técnica.

El lector puede comprender además un sistema de corrección de la excitación de manera que las fluctuaciones en la fuente de luz puedan explicarse. El aparato puede comprender al menos un estándar de fluorecscencia para usar en la calibración antes de determinar la concentración de un analito o analitos. El estándar puede ser un estándar interno.

En modalidades particulares el lector del ensayo se configura para detectar y medir las intensidades de la fluorecscencia de un único o una pluralidad de ensayos simultáneamente o a su vez cuando el dispositivo de ensayo entra al lector o en algún momento después de eso.

El lector puede comprender además instrumentos de procesamiento adaptados para determinar la concentración de un analito o analitos en la muestra basado en la fluorecscencia detectada.

El lector puede comprender además instrumentos de visualización para visualizar las mediciones determinadas a partir de la muestra, preferentemente como una lectura. Por ejemplo, los instrumentos de visualización pueden comprender una pantalla LCD, o pueden basarse en una computadora para energizar y/o calcular y/o visualizar. En sus formas más básicas, los instrumentos de visualización pueden ser simplemente una ventana en la que se visualiza un indicio o una medición.

Usualmente, el lector del ensayo es portátil y de manera favorable, el dispositivo y el lector del ensayo pueden usarse para llevar a cabo ensayos de forma simple, de forma rápida y de forma simultánea para determinar la presencia/ausencia o la concentración de un analito a partir de una muestra acuosa tal como un fluido biológico. Por ejemplo, un clínico con conocimiento de las concentraciones de colesterol, lipoproteínas y HDL puede usar el dispositivo para decidir el curso eficaz

del tratamiento. En adición, el dispositivo y el lector del ensayo son portátiles y pueden usarse por GP, o enfermeras quienes llevan a cabo visitas a domicilio, o incluso como estuches de prueba para uso a domicilio.

5 En modalidades particulares, los instrumentos de procesamiento se adaptan para determinar directamente la concentración de uno o más analitos tales como, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, VLDL e IDL en la muestra basado en el análisis de la fluorescencia. Alternativamente, los instrumentos de procesamiento pueden adaptarse para calcular la concentración de LDL, VLDL e IDL, en la muestra basada en las concentraciones de lipoproteínas totales, colesterol y HDL.

10 Uso del dispositivo en el análisis de colesterol y lípidos

El ejemplo siguiente describe un método de medición de lipoproteínas en una muestra biológica acuosa mediante el uso de un dispositivo de ensayo de la presente invención.

15 En este ejemplo, las vías de flujo de fluido se recubren con un polímero anfipático, PEG, para acelerar el transporte del fluido. Para el perfil de lípidos el polímero anfipático se combina además con un colorante fluorescente tal como Amplex Rojo, K37 o Rojo del Nilo y/u otros reactivos tales como enzimas, fijados o impresos dentro de la(s) vía(s) de flujo de fluido o dentro de la zona de detección.

20 El(los) colorante(s) fluorescente(s) y/u otros reactivos pueden imprimirse como uno o más conjuntos de gotitas de pico litro. De manera adecuada dicho conjunto puede comprender entre aproximadamente 150 a 4500 gotitas a lo largo de un primer eje por 25 a 100 gotitas a lo largo de un segundo eje. Los tamaños particulares del conjunto incluyen aproximadamente 3400 x 65 gotitas, aproximadamente 3000 x 65 gotitas, aproximadamente 1500 x 65 gotitas, aproximadamente 1900 x 65 gotitas, 600 x 65 gotitas, 450 x 65 gotitas o aproximadamente 400 x 65 gotitas por mm². Resultará evidente para un experto en la técnica que, aunque estas densidades de las gotitas pueden variarse con efecto pequeño en la realización del ensayo, resultará evidente además que por el contrario dichas densidades pueden optimizarse además para mejorar la realización del ensayo. Por ejemplo, las gotitas pueden aplicarse además como gotitas de nano litro o femto litro, pueden aplicarse como conjuntos traslapados, pueden aplicarse una (o más) en la parte superior de otra, pueden aplicarse como conjuntos individuales distintos, pueden separarse o aplicarse como bloques de diversos conjuntos que forman un conjunto de un tamaño más grande (es decir aditivo). El tamaño del conjunto puede optimizarse además con respecto a la concentración de un reactivo o colorante en particular por ejemplo.

35 Cuando se 'imprimen', las gotitas de colorante fluorescente pueden aplicarse al dispositivo a concentraciones de entre aproximadamente 0.1 mM a 3.0 mM, de forma más adecuada, entre aproximadamente 0.3 a 2.5 mM, y aun de forma más adecuada, entre aproximadamente 0.5 a 2.0 mM. Alternativamente, cuando el dispositivo es para usar con muestras de sangre diluidas, la concentración de colorante fluorescente puede estar entre aproximadamente 0.8 a 1.2 mM. Una concentración útil de colorante fluorescente es 1.0 mM y para muestras de sangre sin diluir una concentración útil es aproximadamente 2.0 mM. El colorante se seca subsecuentemente para su uso.

40 En el uso el fluido de la muestra hidrata al polímero anfipático y diluye al colorante fluorescente el que puede después unirse a las lipoproteínas en la muestra. Cuando se une el marcador fluoresce bajo la excitación adecuada. La concentración total de lipoproteínas en la muestra puede determinarse mediante el uso de análisis de fluorescencia.

El método generalmente comprende:

- 45 (i) poner en contacto una muestra biológica acuosa con al menos un colorante o luminóforo y al menos un polímero anfipático en donde, el al menos un colorante o luminóforo se une a al menos una lipoproteína en la muestra biológica acuosa y cuando se une a ella fluoresce bajo la excitación adecuada;
- 50 (ii) excitar el(los) producto(s) de la etapa (i) a una longitud de onda de excitación de entre aproximadamente 400 nm-620 nm;
- (iii) medir la emisión de la fluorescencia después de la etapa (ii) a una longitud de onda de entre aproximadamente 440-650 nm.

El método puede usarse para preparar un perfil de lípidos a partir de una muestra biológica acuosa.

55 Mediante el uso del término "lipoproteína total", se quiere decir la concentración conjunta de al menos VLDL, HDL, LDL, IDL y quilomicrones en otras palabras, la suma de las concentraciones de triglicérido y colesterol total en una muestra. Mediante el uso del término "colesterol total", se quiere decir la concentración total de colesterol en una muestra. Mediante el uso del término "perfil de lípidos", se quiere decir la concentración(es) o concentración(es) relativas de los componentes lipídicos (es decir las lipoproteínas totales y el colesterol total y los triglicéridos) en una muestra.

La mayoría de los lípidos presentes en una muestra de sangre o suero están unidos a las lipoproteínas. Las pruebas convencionales realizadas en los laboratorios clínicos no miden las lipoproteínas totales. Por tanto, de forma convencional, se requiere determinar primero, y después adicionar la concentración de colesterol y los ésteres de colesterol, a los triglicéridos para determinar la concentración total de lipoproteínas. La medición convencional de triglicéridos en un laboratorio clínico está sometida a errores sustanciales debido a que se basa en la medición del glicerol, el que circula de forma natural en la sangre. De manera favorable, debido a que el número (volumen) de partículas de lipoproteínas se mide de forma directa para determinar la concentración de lipoproteína total (la que se corresponde a la concentración total de lípidos) el ensayo del colesterol de acuerdo con la presente invención no se somete a este error. Por lo tanto, se obvian los errores tales como en la concentración de triglicéridos provocados por el glicerol circulante en la muestra.

En su anterior solicitud de patente internacional PCT/GB2005/004757, publicada como WO2006/061646, los inventores desarrollaron un ensayo simplificado basado en el uso de, por ejemplo, K37 para la medición de lipoproteínas en una macromolécula biológica que es particularmente útil cuando un clínico desea obtener de forma rápida y eficiente un perfil de lípidos. Para determinar la concentración de lipoproteína total (es decir HDL, LDL, IDL y VLDL) en una muestra de sangre mediante el uso de las mediciones de la fluorescencia de K37, los inventores notaron que la respuesta de fluorescencia de K37 unido a varias clases de lipoproteínas sustancialmente puede hacerse la misma para una concentración total de lipoproteínas, es decir la concentración total de lipoproteínas, independientemente de su composición (es decir la relación de HDL:LDL:IDL:VLDL en la muestra). En consecuencia, se prefiere que el K37 se use de tal manera que la respuesta de la intensidad de la fluorescencia sea sustancialmente lineal en el intervalo de concentraciones de moléculas de lipoproteínas que deberían esperarse de las muestras que deberían encontrarse en las pruebas clínicas.

Sin desear estar atado a cualquier hipótesis, se cree que la intensidad de la fluorescencia del colorante fluorescente depende de su afinidad por una molécula de lipoproteína en particular (HDL, LDL, IDL o VLDL) en la muestra. El rendimiento cuántico de la fluorescencia depende del medio ambiente dentro de ese complejo molecular de lipoproteína, y además del grado de inhibición de la fluorescencia provocado por la transferencia de energía entre las moléculas de sonda compactadas juntas de forma cercana. Por tanto, en sus solicitudes anteriores, los inventores razonaron que debería ser posible seleccionar una concentración adecuada de la sustancia sonda y las longitudes de onda de excitación y emisión que pueden usarse para hacer una medición exacta de lipoproteína total mediante la medición simple de la fluorescencia. Los inventores notaron que la concentración de la sonda debería preferentemente equilibrar el rendimiento cuántico superior de K37 en la HDL comparado con la VLDL y la LDL con su superior afinidad por HDL, y por ello un grado de inhibición superior dentro de la HDL para producir una respuesta constante de la señal de fluorescencia en todas las partículas de lipoproteínas.

Los inventores realizaron una serie de experimentos para investigar si es posible obtener una relación lineal e igual entre la fluorescencia de la sustancia sonda, K37, y la concentración de lipoproteínas para cada tipo de partícula de lipoproteínas (HDL, LDL, y VLDL), en el intervalo de concentraciones de lipoproteínas que deberían encontrarse en muestras clínicas reales de suero. Para su sorpresa, encontraron que había una concentración definida de K37 y longitudes de onda de excitación y emisión a las que había una relación lineal entre la fluorescencia de K37 y la concentración de lipoproteínas. Por lo tanto, mediante el uso de la metodología de su solicitud de patente anterior (PCT/GB2005/004757) la persona con experiencia puede identificar otros colorantes adecuados que demuestran además tal relación con la concentración de lipoproteínas.

El uso de enzimas en un ensayo de colesterol es ventajoso porque el colesterol se encuentra frecuentemente en un estado esterificado, por lo tanto preferentemente se usa la colesterol esterasa para hidrolizar el éster de colesterol a colesterol libre. El colesterol libre después puede convertirse a colest-4-eno-3-ona cetona mediante la acción de la colesterol oxidasa, la que genera el peróxido de hidrógeno en el proceso. De manera favorable, el Amplex Rojo y el peróxido de hidrógeno se convierten a resorufina y agua mediante la peroxidasa de rábano picante. La resorufina después puede detectarse como un compuesto fluorescente con un máximo de absorción de aproximadamente 563 nm y una longitud de onda de emisión con un pico de 587 nm. El contenido de colesterol total puede medirse al excitar la muestra a alrededor de 485 nm y al medir la fluorescencia resultante a aproximadamente 600 nm.

Cuando se utiliza una enzima esta puede proporcionarse a un nivel muchas veces en exceso de la relación que debería usarse para medir, por ejemplo, la Km de las enzimas, por ejemplo. Dicha relación puede ser extremadamente alta cuando se compara con las usadas en la técnica las que son de alrededor de 1:1000. Sorprendentemente, la combinación de una diferencia en las energías superficiales del dispositivo acoplada con el uso de enzimas estabilizadas secas y opcionalmente un polímero anfipático permite usar cantidades más pequeñas de la muestra y el reactivo. Sin desear estar atado a una teoría, se cree que la diferencia en las energías superficiales de las dos superficies opuestas al menos parcialmente crea un movimiento circular dentro del flujo laminar de la muestra acuosa que conduce a una mezcla más eficiente. Como resultado de este incremento en la eficiencia, niveles más grandes de enzima pueden usarse en volúmenes de reacción más

pequeños lo que conduce a reacciones aún más eficientes y rápidas que las posibles anteriormente en los métodos de la técnica anterior.

La segunda etapa para el método puede comprender:

- (ii) excitar el producto(s) de la etapa (i) a una longitud de onda de excitación de entre aproximadamente 400 nm-520 nm.

La longitud de onda de excitación puede estar entre aproximadamente 420 nm-480 nm o entre aproximadamente 440 nm-470 nm. La longitud de onda de excitación o las longitudes de ondas usadas dependerán de los colorantes fluorescentes específicos que se usan en el ensayo. Para Amplex rojo la longitud de onda de excitación es aproximadamente 480 nm, para K37 la longitud de onda de excitación es aproximadamente 440 nm y para Rojo del Nilo la longitud de onda de excitación es aproximadamente 580 nm.

Una tercera etapa del método comprende:

- (iii) medir la emisión de la fluorescencia a una longitud de onda de aproximadamente entre 490-650 nm.

Alternativamente la emisión de la fluorescencia puede medirse a una longitud de onda de aproximadamente entre 520 nm-620 nm. A longitudes de ondas de emisión de aproximadamente 540 nm, o superiores, pueden observarse lecturas más exactas para determinar la concentración total de lipoproteínas (es decir la concentración de HDL, IDL, LDL y VLDL, pero además los quilomicrones si están presentes). Sin embargo, la(s) longitud(es) de onda de emisión de la fluorescencia que se mide(n) dependerán de los colorantes fluorescentes específicos que se usan en un ensayo. Para Amplex Rojo la fluorescencia se mide a aproximadamente 600 nm, para K37 la fluorescencia se mide a aproximadamente 495 nm y para Rojo del Nilo la fluorescencia se mide a aproximadamente 610 nm.

Se debería apreciar que las longitudes de ondas de excitación y emisión no necesitan medirse a las longitudes de ondas óptimas para cada colorante específico. Pueden seleccionarse las longitudes de ondas que den la mejor separación o desempeño cuando los colorantes se usan en combinación o en paralelo, por ejemplo cuando los ensayos se realizan al mismo tiempo en un dispositivo de ensayo único. Resultará evidente que las etapas (ii) y (iii), de excitación y detección, pueden llevarse a cabo además sustancialmente de forma simultánea.

En adición, la concentración de triglicéridos puede calcularse al restar la concentración de colesterol total de la concentración total de lipoproteínas. Por tanto, un perfil de lípidos más detallado de la muestra se genera de esta manera que consiste en la concentración total de lipoproteínas, la concentración de colesterol total, y además la concentración de triglicéridos, las que deberían serle útil al clínico.

Los inventores descubrieron anteriormente que una serie de colorantes se unirán a las lipoproteínas y exhibirán respuestas de fluorescencia diferentes que dependen de la lipoproteína unida en particular. La medición de la fluorescencia de estos colorantes hace posible distinguir entre los tipos de lipoproteínas presentes en una muestra. Esto se hace al comparar la fluorescencia mejorada o reducida provocada por un tipo de lipoproteína en una mezcla de lipoproteínas con la fluorescencia esperada de las otras lipoproteínas (en la ausencia de la lipoproteína de propiedad específica) como se determina a partir de una curva de calibración y un valor conocido del contenido total de lipoproteínas. Por ejemplo el colorante fluorescente, Rojo del Nilo, exhibe una fluorescencia considerablemente superior en HDL que en otras lipoproteínas, tales como LDL y VLDL. Por ello, otros colorantes fluorescentes (por ejemplo Rojo del Nilo, K37 o cualquier otra sonda lipofílica que muestra especificidad, o mejora o reducción de la fluorescencia hacia una lipoproteína en particular), puede usarse para discriminar entre las clases o subclases de lipoproteínas en la muestra.

En consecuencia el método permite la determinación de la concentración de una clase, o subclase particular de lipoproteínas en una muestra mediante el uso del análisis de la fluorescencia. Generalmente esto implica determinar la concentración de una clase o subclase particular de lipoproteínas por el cambio en la respuesta de la fluorescencia de un colorante específico a esa lipoproteína que usa un segundo y/o un tercer colorante fluorescente.

A manera de ejemplo, con el fin de determinar la concentración de HDL en una muestra mediante el uso de Rojo del Nilo, se hace un cálculo de la fluorescencia en exceso del Rojo del Nilo debida a la presencia de HDL. En primer lugar, la concentración total de lipoproteínas (medición "A") se mide mediante la correlación lineal de la fluorescencia de K37 con la concentración de lipoproteínas (como se determina en la etapa (i)). En segundo lugar, la fluorescencia del Rojo del Nilo se calibra después con LDL (y/o VLDL como la fluorescencia para la respuesta de la concentración debe ser esencialmente la misma) a varias concentraciones para obtener una curva de calibración con pendiente "X" e intercepto "Y". Un técnico con experiencia debería conocer cómo preparar una variedad de concentraciones de LDL (y/o VLDL), y cómo determinar la respectiva fluorescencia para cada concentración.

Las curvas de calibración pueden elaborarse para una serie de concentraciones de HDL y una concentración constante de LDL para dar una pendiente "Z". Al conocer la concentración total de lipoproteínas de la medición "A" de K37 y el exceso de fluorescencia de Rojo del Nilo de una muestra "B" desconocida, la concentración de HDL "C" en la muestra desconocida puede determinarse mediante la ecuación siguiente: $C = (B - (AX - Y))/Z$.

Se apreciará que, en la práctica, pueden usarse curvas de calibración preparadas con antelación o estándares. Además los dispositivos de ensayo de la presente invención o los lectores del ensayo para el uso con tales dispositivos desarrollados para generar perfiles de lípidos pueden comprender estándares internos y/o tener instrumentos de procesamiento que permitirán el cálculo automático de las concentraciones de lipoproteínas sin la intervención del usuario.

Por ello, se apreciará que las mediciones de la fluorescencia pueden usarse para determinar la concentración de HDL, VLDL (mediante el cálculo), LDL (mediante el cálculo), lipoproteína total, triglicéridos (mediante el cálculo) y además colesterol total. Todos estos parámetros pueden determinarse de forma simultánea, en paralelo, al excitar y medir la fluorescencia sobre un intervalo similar de longitudes de ondas. Como se discute anteriormente, esta es una mejora considerable sobre los ensayos convencionales, los que tienen que llevarse a cabo de forma separada, y frecuentemente en los laboratorios especializados, que causan un retraso en la generación de los resultados. En adición, el hecho de que los múltiples parámetros de los lípidos pueden medirse al mismo tiempo simplifica considerablemente la instrumentación requerida para llevar a cabo las mediciones.

El perfil de lípidos generado incluye la determinación de la concentración de colesterol unido a LDL en la muestra. Es especialmente ventajoso conocer la concentración de LDL-colesterol ya que es muy aterogénico. Por tanto, el método proporciona una lectura múltiple de al menos tres, preferentemente cuatro o cinco, o más parámetros de la composición de lípidos en la muestra. Además, es posible calcular/estimar la concentración de Colesterol-VLDL-Colesterol a partir de la concentración de triglicéridos, ya que generalmente se asume que la mayoría de los triglicéridos se transportan en VLDL y el componente de colesterol de VLDL es 20 %. Esto es particularmente ventajoso para ayudar al clínico a decidir un curso apropiado de tratamiento.

Ejemplos

La invención ahora se describirá con referencia a los siguientes ejemplos los que describen la exposición completa de las modalidades de la invención como se describe anteriormente.

Ejemplo 1 Ensayo de colesterol total

El ensayo utiliza un sistema triple de enzimas capaz de convertir una molécula de colesterol o éster de colesterol en una molécula de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno generado se usa después para oxidar el colorante Amplex Rojo (no fluorescente) para generar el producto muy fluorescente Resorufina.

Estabilización de las Enzimas en Plástico

El ensayo de colesterol total usa las siguientes enzimas y colorante:

Colesterol esterasa (3.1.1.13)
 Colesterol oxidasa (1.1.3.6)
 Peroxidasa de rábano picante (1.11.1.7)
 Amplex Rojo: 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina

Las enzimas se estabilizaron en plástico mediante el uso de Gafquat como un agente estabilizante. Las tres enzimas se adicionaron a una solución de amortiguador fosfato de potasio 0.01 M, pH 7.0. La actividad final de cada enzima se midió a 200 U/ml de amortiguador. Después la solución se diluyó 1:1 con la formulación Gafquat (polímero muy cargado positivamente) y 5 μ l de la solución resultante se depositó en una superficie plástica y se secó a 30 °C en la presencia de gel de sílice por 2 horas. El proceso resultó en una biosuperficie de enzimas secas, con 0.5 U de cada enzima depositada.

Procedimiento del ensayo - que utiliza una dilución de la muestra 1/80

Se tomaron dos enfoques, a) reacción de la muestra de colesterol (plasma) con enzimas secas y Amplex Rojo en solución, b) reacción de la muestra de colesterol con las enzimas secas y el colorante Amplex Rojo estabilizado seco:

(a) Reacción de la muestra de colesterol (plasma) con enzimas secas y Amplex Rojo en solución.

Amortiguador de dilución A: Amplex Rojo 4.16 mM, Ácido cólico 10 mM, Tritón X-100 al 0.2 % en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco pH 7.2.

- 5 La muestra a ensayarse primero se diluyó 1 parte en 80 partes del amortiguador de dilución A, después se usaron 50 ul de la muestra diluida para reconstituir y activar la mezcla de tres enzimas secas (estabilizada antes como se describe anteriormente) en la cámara del ensayo de la muestra.
El contenido de colesterol se midió al excitar la mezcla de la muestra a 480 nm y al medir la fluorescencia resultante a 600 nm. La concentración de colesterol se determinó de forma directa a través de la medición de la fluorescencia del estado estable luego de 40 segundos, o de la Vmax (velocidad máxima de generación de sustrato). Cada evaluación se hizo como referencia a los datos de ensayo estándares.

(b) Reacción de la muestra de colesterol (plasma) con las enzimas secas y el Amplex Rojo.

- 15 Amortiguador de dilución B: Ácido cólico 10 mM, Tritón X-100 al 0.2 % en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco pH 7.2.

- 20 Este procedimiento es similar al proceso anterior. Sin embargo, en este proceso el colorante Amplex Rojo se secó en la vía de flujo junto con la mezcla de tres enzimas. En primer lugar, una región definida de la cámara de ensayo se recubrió con 0.5 U de Colesterol Esterasa (3.1.1.13), 0.5 U de Colesterol Oxidasa (1.1.3.6) y 0.5 U de Peroxidasa de rábano picante (1.11.1.7) como se describe anteriormente. Una segunda y separada región de la cámara de ensayo se recubrió después con 10pl de solución de Amplex Rojo / PEG2000 y se secó a 30 °C en presencia de gel de sílice por 2 hr. La solución de recubrimiento del colorante se compuso de Amplex Rojo 5.35 mg/ml, PEG2000 al 5 % p/v en dimetilsulfóxido (DMSO).

- 25 La muestra a ensayar se diluyó, 1 parte en 80 partes de amortiguador de dilución B, y 50 ul de la muestra diluida se usó para reconstituir y activar el colorante Amplex Rojo seco y la mezcla de tres enzimas en la cámara de ensayo de la muestra.

- 30 El contenido de colesterol se midió al excitar la mezcla de la muestra a 480 nm y medir la fluorescencia resultante a 600 nm. La concentración de colesterol se determinó de nuevo de forma directa a través de la medición de Vmax (velocidad máxima de generación de sustrato) o de la fluorescencia del estado estable luego de 40 segundos. Cada evaluación se hizo como referencia a los datos de ensayo estándares.

- 35 Se determinó que ambos ensayos eran capaces de determinar niveles de colesterol clínicamente relevantes de entre 2-11 mM.

Procedimiento de ensayo - que utiliza una muestra sin diluir

- 40 Las muestras biológicas puras se ensayaron al aplicar la muestra a un filtro de borosilicato impregnado con anticuerpo anti-HSA localizado dentro del dispositivo consumible, el cual sirve para filtrar y dirigir la muestra a un área de lectura o de detección de 200 µm de profundidad adecuada. El pre-recubrimiento del área de lectura en primer lugar con gotitas de 400 x 65 pico litro de reactivo enzimático por mm², seguido por gotitas de 600 x 65 pico litro de reactivo colorante por mm² y gotitas de 450 x 65 pico litro de reactivo inhibidor por mm² facilita el flujo rápido de la muestra hacia el área de lectura. La excitación subsecuente de la muestra a 480 nm (paso de banda de 10 nm) genera la fluorescencia que puede detectarse a través de un filtro de 600 nm (paso de banda de 10nm) para permitir determinar el contenido total de colesterol de la muestra como referencia para mediciones estándares adecuadas.

Reactivo Enzimático: colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante, cada una disuelta en una mezcla de estabilizante Gafquat a 200 unidades por ml.

- 50 Solución detergente: 1.63 g de ácido cólico, 10 g de polietilenglicol 2000, 800 ul de Tritón X-100 y 253.3 ul de maleato de dietilo se disuelven en dimetilformamida (DMF) y el volumen final se ajusta a 40 ml.

Reactivo Colorante: 5 mg de Ampliflu Rojo sólido adicionado a 480 µl de solución detergente.

- 55 Reactivo Inhibidor: 260 mg de azida sódica y 912.92 mg de fosfato potásico dibásico trihidratado se disuelven en agua y el volumen final se ajusta a 40ml.

Ejemplo 2 - Ensayo de Lípidos Totales

El colorante K37 se disolvió en DMF a una concentración final de 1.0 mM. A continuación se disolvió PEG-2000 al 5% p/v en la solución colorante y se depositó 60 nanolitros de la solución resultante en una superficie plástica y se secó al eliminar el solvente bajo vacío por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

5 Procedimiento de ensayo - que utiliza la muestra diluida

La muestra a ensayarse (plasma) primero se diluyó 1 parte en 80 partes de solución salina amortiguada con fosfato que contiene octanoato sódico 50 mM, pH 7.4.

10 Se aplicó 5µl del plasma diluido al colorante seco el que se hidrata de forma espontánea. El contenido total de lípidos se midió al excitar la muestra a 440 nm (paso de banda de 10 nm) y se midió la fluorescencia resultante que pasa a través de un filtro de 495 nm (paso de banda de 10nm). El contenido total de lípidos se determinó de forma empírica como referencia a estándares conocidos.

15 Procedimiento de ensayo - que utiliza la muestra sin diluir

Las muestras biológicas puras se ensayaron al aplicar la muestra a un filtro de borosilicato impregnado con anticuerpo anti-HSA localizado dentro del dispositivo consumible, el cual sirve para filtrar y dirigir la muestra a un área de lectura de 200 µm de profundidad adecuada. El pre-recubrimiento del área de lectura con gotitas de 3000 x 65 pico litros de K37 2 mM / PEG2000 al 5% (p/v) en DMF por mm² facilita el flujo rápido de la muestra en el área de lectura y la división espontánea del colorante en las lipoproteínas contenidas dentro de la muestra. La excitación subsecuente de la muestra a 440 nm (paso de banda de 10 nm) genera la fluorescencia que puede detectarse a través de un filtro de 495 nm (paso de banda de 10 nm) para permitir determinar el contenido total de lípidos de la muestra como referencia a mediciones estándares adecuadas.

25 Ejemplo 3 - Ensayo de colesterol HDL

El Rojo del Nilo se disolvió en DMF una concentración final de 0.5 mM. A continuación se disolvió PEG-2000 al 5% p/v en la solución colorante y se depositó 60 nanolitros de la solución resultante en una superficie plástica y se secó al eliminar el solvente bajo vacío por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

30 Procedimiento de ensayo - que utiliza la muestra diluida

La muestra a ensayarse (plasma) primero se diluyó 1 parte en 80 partes de solución salina amortiguada con fosfato que contiene Octanoato sódico 50mM, pH 7.4

35 Se aplicó 5µl del plasma diluido al colorante seco el que se hidrata de forma espontánea. El contenido de colesterol HDL se midió al excitar la muestra a 580 nm (paso de banda de 10 nm) y se midió la fluorescencia resultante que pasa a través de un filtro de 610nm (paso de banda de 10 nm). El contenido de colesterol HDL se calculó mediante el uso del algoritmo descrito en la especificación principal. Un ensayo equivalente puede realizarse además al utilizar sangre total, sin diluir.

40 Procedimiento de ensayo - que utiliza la muestra sin diluir

Las muestras biológicas puras se ensayaron al aplicar la muestra a un filtro de borosilicato impregnado con anticuerpo anti-HSA localizado dentro del dispositivo consumible, el cual sirve para filtrar y dirigir la muestra a un área de lectura de 200µm de profundidad adecuada. El pre-recubrimiento del área de lectura con gotitas de 3400 x 65 pico litros de Rojo del Nilo 0.5 mM / PEG2000 al 5% (p/v) en DMF por mm² facilita el flujo rápido de la muestra hacia el área de lectura y la división espontánea del colorante en las lipoproteínas contenidas dentro de la muestra. La excitación subsecuente de la muestra a 580nm (paso de banda de 10nm) genera la fluorescencia que puede detectarse a través de un filtro de 610nm (paso de banda de 10nm) para permitir determinar el contenido de HDL-c de la muestra como referencia a mediciones estándares adecuadas.

La manipulación de los datos de las tres pruebas descritas en los ejemplos 1, 2 y 3 proporciona lo siguiente:

- 55 Medición del colesterol total - es decir prueba (1)
- Medición de la concentración total de lípido - es decir prueba (2)
- Medición del colesterol HDL - es decir prueba (3)
- Valor calculado de triglicéridos - es decir pruebas (2) menos (1)
- Valor calculado de VLDL- es decir valor de triglicérido/2.2
- 60 Valor calculado de LDL - es decir determinado por la ecuación de Friedwald

Ejemplo 4 - Uso de PEG para mejorar el flujo lateral del fluido en capilares casi horizontales

Los capilares de vidrio de 100 mm de largo y que tienen diámetros internos de 2 mm, 1 mm y 0.5 mm no se trataron, se trataron con detergente o se recubrieron con PEG. Los capilares tratados con detergente se prepararon al lavar con una solución de virkon y Tritón X100 al 5% seguido por el secado. Los capilares tratados con PEG se prepararon al dejar fluir PEG al 5% (p/v) en cloroformo a través de los capilares, lo que permite al excedente drenar seguido por el secado.

Los capilares tratados y sin tratar se fijaron en una posición casi horizontal (aproximadamente 10° de ángulo de flujo ascendente) y las puntas de los capilares se sumergieron en agua. Se midió la distancia desplazada y el régimen de flujo del agua que se mueve en cada capilar:

Capilares sin tratar

- 2 mm - alcanzó 20 mm en ~30 segundos
- 1 mm - alcanzó 90 mm en 15 segundos
- 0.5 mm - alcanzó el extremo del tubo (100 mm) en 18 segundos

Capilares tratados con detergente

- 2 mm - alcanzó 20 mm en ~20 segundos
- 1 mm - alcanzó 90 mm en 12 segundos
- 0.5 mm - alcanzó el extremo del tubo (100 mm) en 15 segundos

Capilares recubiertos con PEG:

- 2 mm - alcanzó 80 mm en ~20 segundos
- 1 mm - alcanzó el extremo en 1-2 segundos
- 0.5 mm - alcanzó el extremo del tubo (100 mm) en 1-2 segundos

Estos datos demuestran que el régimen de flujo capilar en capilares recubiertos con PEG es aproximadamente cuatro veces más rápido que en los capilares tratados con detergente y aproximadamente seis veces más rápido que en los capilares sin tratar.

Los capilares se hicieron hidrofóbicos al tratar con un agente siliconizante (diclorosilano de dimetilo) y calentar a 120°C. El agua no entró al lumen de estos capilares. Al recubrir los capilares hidrofóbicos con PEG (como anteriormente) se restablecen las condiciones de flujo del fluido comparables a los capilares recubiertos con PEG sin silación. En algunos de los experimentos donde el recubrimiento superficial de PEG fue discontinuo el flujo del fluido se detuvo en la interrupción en el recubrimiento con PEG.

Experimento 5 - Uso de PEG para mejorar el flujo del fluido en capilares verticales

Los capilares que tienen una longitud de 100mm y diámetros de 2 mm, 1 mm, o 0.5 mm se trataron como se describe anteriormente. Los capilares se fijaron en una posición vertical y las puntas de los capilares se sumergieron en agua. Se midió la altura alcanzada por el agua en los tubos capilares verticales:

Tubos sin tratar:

- 2 mm diámetro - 9 mm
- 1 mm diámetro - 22 mm
- 0.5 mm diámetro - 51 mm

Tubos tratados con detergente

- 2 mm diámetro - 10 mm
- 1 mm diámetro - 22 mm
- 0.5 mm diámetro - 53 mm

Tubos recubiertos con PEG

- 2 mm diámetro - 11 mm

1 mm diámetro - 25 mm
0.5 mm diámetro - 54 mm

5 El agua no entró a los tubos capilares silados hidrofóbicos. Al recubrir los capilares silados con PEG las alturas del flujo capilar se restablecieron y fueron similares a los capilares sin silar recubiertos con PEG.

10 Las alturas máximas teóricas al nivel del mar se determinaron mediante el uso de la ecuación $h = \frac{2\gamma \cos\theta}{pgr}$, donde h es la altura (m); γ es la tensión superficial; θ el ángulo de contacto; p es la densidad; g es la aceleración debido a la gravedad, y r es el radio del tubo (m) son:

14 mm a 2 mm ID
28 mm a 0.5 mm ID

15 Ejemplo 6 - Reproducibilidad de la transferencia y de la estabilidad a largo plazo

La reproducibilidad de la transferencia y la estabilidad a largo plazo de la mezcla de molécula hidrofóbica (es decir el colorante)/polímero anfipático se midió como sigue:

20 El PEG con un peso molecular de 2000 Da se disolvió en una solución de colorante hidrofóbico (Rojo del Nilo o K37) en dimetilformamida (DMF), a una concentración al 5 % p/v. Las películas de PEG/colorante se hicieron al depositar 25 μ l de PEG/solución colorante en DMF en un frasco de vidrio de 5 ml. La solución se esparció sobre la base del frasco y después se colocó en una cámara de vacío por una hora para evaporar el solvente.

25 La reproducibilidad de la transferencia se midió al comparar la intensidad de la fluorescencia del colorante en DMF adicionado a una solución de lipoproteína con la intensidad de la fluorescencia de una solución de lipoproteína idéntica en la que la película de colorante/PEG se redisolvió. La reproducibilidad se calculó al obtener los Coeficientes de variación (CV) de las intensidades de la fluorescencia de diez películas de colorante/PEG en soluciones de lipoproteínas.

30 La estabilidad se evaluó al depositar las películas por un almacenamiento a largo plazo, y medir la intensidad de la fluorescencia de estas películas cuando se redisolvieron en soluciones de lipoproteínas luego de tiempos de almacenamiento variables. Las películas se almacenaron en la oscuridad bajo una variedad de condiciones: en aire sin agente desecante, en aire en la presencia de gel de sílice, y bajo vacío en la presencia de gel de sílice. Las películas se almacenaron bajo estas condiciones a temperaturas de 20 y 37 °C.

35 Se determinaron las intensidades de la fluorescencia para colorantes en soluciones de lipoproteínas disueltas en DMF o en PEG:

40

	K37	Rojo del Nilo
De DMF	268000	297000
De la película de PEG	269000	296000

45

50 Se obtuvieron lecturas idénticas de la intensidad de la fluorescencia (dentro de 0.5%) para películas de PEG como se obtuvieron al adicionar colorante disuelto en DMF. Se calculó la reproducibilidad de las lecturas de la fluorescencia de las películas de colorante/PEG con lipoproteína:

55

60

5

10

15

20

25

	K37	Rojo del Nilo
Película 1	6.23E+05	4.27E+05
Película 2	6.25E+05	4.27E+05
Película 3	6.24E+05	4.29E+05
Película 4	6.25E+05	4.26E+05
Película 5	6.24E+05	4.27E+05
Película 6	6.26E+05	4.30E+05
Película 7	6.23E+05	4.30E+05
Película 8	6.25E+05	4.28E+05
Película 9	6.22E+05	4.28E+05
Película 10	6.22E+05	4.26E+05
Media	6.24E+05	4.28E+05
SD	1370.32	1475.73
CV (%)	0.22	0.34

30 Se obtuvieron CV menores que 0.5% para ambos colorantes.

Mediciones de estabilidad

Tiempo	K37 en DMF 20 C	K37 en PEG 20 C al aire	K37 en PEG 20 Cal aire sobre gel de sílice	K37 en PEG 20 C al vacío sobre gel de sílice	K37 en PEG 37 C al aire	K37 en PEG 37 C al aire sobre gel de sílice	K37 en PEG 37 C al vacío sobre gel de sílice
Cero	138630	139320	137241	138624	137440	138317	136942
1 semana	137500	137113	137840	138801	137640	136922	136817
4 semanas	134890	134641	133980	134202	135016	135412	134097
8 semanas	135254	136021	135972	136671	135926	136201	135552
%CV	1.31	1.44	1.25	1.56	0.92	0.90	0.98
Tiempo	NR en DMF 20 C	NR en PEG 20 C al aire	NR en PEG 20 C al aire sobre gel de sílice	NR en PEG 20 C al vacío sobre gel de sílice	NR en PEG 37 C al aire	NR en PEG 37 C al aire sobre gel de sílice	NR en PEGS 37 C al vacío sobre gel de sílice
Cero	495197	496130	494590	495760	494118	494241	494829
1 semana	495002	495600	494802	494400	494636	493907	494621
4 semanas	493128	492686	493440	493662	494017	492506	492906
8 semanas	493492	494620	494525	493986	493920	492500	493650
%CV	0.21	0.31	0.12	0.19	0.06	0.19	0.18

Conclusiones:

- (1) Los colorantes incorporados en las películas de PEG se redisuelven completamente cuando se reconstituyen con soluciones acuosas, y dan las mismas intensidades de fluorescencia que los colorantes adicionados en solventes orgánicos.
- (2) Las películas de colorante/PEG son reproducibles y las películas hechas de la misma manera resultan en la misma intensidad de fluorescencia.
- (3) Las películas de colorante/PEG son estables por al menos 52 semanas cuando se almacenan bajo las condiciones de almacenamiento más severas probadas (37°C, sin desecante).

Ejemplo 7 - Comparación de los polímeros anfipáticos/no iónicos

Los capilares de borosilicato (100 mm de largo, 1 mm ID de Composite Metal Services Ltd - CV1012) se recubrieron al arrastrar 7 mm de una solución de polímero al 5% en varios solventes y se balanceó hasta secar. El solvente usado dependió de la solubilidad con cloroformo favorecida debido a su alta velocidad de evaporación.

Los experimentos en los capilares recubiertos se realizaron por triplicado y un capilar sin recubrir se corrió cada vez como una referencia. Los 4 capilares se mantuvieron verticales en una tarjeta de referencia revestida mediante 2 ranuras cortadas en la tarjeta por cada capilar. Los extremos de los capilares se extienden de forma exacta 7 mm después del fondo de la tarjeta.

El experimento se grabó mediante el uso de una Cámara a color de baja Lux y alta resolución de Sunkwang conectada a una tarjeta Winnov 500050G V1000 + OV PC y el programa Videum Capture se usó para capturar y analizar los datos. La velocidad de encuadre se ajustó a 5 cuadros por segundo (para evitar los cuadros alargados) a menos que se exponga de cualquier otra manera. El líquido de flujo (10-4M Rosa Bengala en agua) se contuvo en un vidrio reloj de fondo plano y la tarjeta simplemente se hizo descender hasta que la parte inferior de la tarjeta descansó en las paredes del vidrio reloj. Los capilares se sumergieron en el líquido de flujo a una profundidad de 2 mm. Esto produce una interrupción de 5 mm en la parte inferior de la tarjeta, 9 mm desde la parte inferior de la tarjeta hasta la primera línea y 6 mm adicionales en la segunda línea de la tarjeta. Los regímenes de flujo se calcularon al contar cuántos cuadros transcurrieron por los 9 mm de desplazamiento entre la parte inferior de la tarjeta y la primera línea.

Tabla 1. Desempeño de los sistemas de recubrimientos de polímero/solventes en la altura de la columna de agua y el régimen de flujo capilar. * = un resultado de un único capilar () = un resultado de 2 de 3 capilares cuando el capilar tuvo una altura de la columna más abajo de la primera línea de la tarjeta y por ello se estimó.

Revestimiento	Disolvente	Altura promedio de la columna de agua mm	STDEV en la altura de la columna	Régimen de flujo promedio mm/s	STDEV en régimen de flujo promedio mm/s	Tasa más rápida mm/s
PEG2000	cloroformo	17.8	0.76	21.9	3.3	25.7
PEG2000	DMF	19.8	1.89	27.6	28.1	60
PEG2000	Agua	13.5	5.77	29.7	37.2	72
PEG6000	cloroformo	19.3	0.76	21.5	4.8	25.7
PEG12.000	cloroformo	16.5	0.87	7.6	3.3	9.5
PEG20,000	cloroformo	15.3	1.04	3.2	1.6	4.9
Triton X100	Agua	14.2	1.04	7.9	2.2	10
Carboximetilcelulosa	Agua	18.0	*	180	*	180
0,0'-Bis(2-aminoetilo) polietilenglicol 2000	cloroformo	17.0	3.5	38.8(52.5)	25.0(10.6)	60
Éter metílico de PEG 5000	cloroformo	17.8	1.26	2.4	0.2	2.6

La Figura 5 ilustra el efecto del peso molecular del PEG sobre el régimen de flujo vertical.

Aunque ciertas de las modalidades preferidas de la presente invención se describieron y ejemplificaron específicamente anteriormente, no se pretende que la invención se limite a dichas modalidades. Varias modificaciones pueden hacerse a ellas sin salirse del alcance de la presente invención, como se exponen en las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

- 5
1. Un dispositivo de ensayo para detectar la presencia o cantidad de un analito que reside en una muestra acuosa, el dispositivo comprende:
- 10
- (i) al menos un área de aplicación adecuada para la aplicación de una muestra acuosa al dispositivo;
- (ii) al menos una sonda, reportero o reactivo en donde, en uso la al menos una sonda, reportero o reactivo es capaz de reaccionar con un analito que reside en la muestra acuosa;
- (iii) al menos un área de prueba en donde, en uso puede determinarse el resultado y/o progreso de una reacción entre el analito y la al menos una sonda, reportero o reactivo;
- (iv) al menos una vía de flujo que está en comunicación continua con el al menos un área de aplicación y el al menos un área de prueba,
- 15
- caracterizado porque** la al menos una vía de flujo se recubre con al menos un polímero anfipático que es soluble en agua y en donde, en uso el paso del fluido a lo largo de la al menos una vía de flujo es mayor que el esperado por la acción capilar sola.
2. El dispositivo de la reivindicación 1 en donde el polímero anfipático se imprime y/o se rocía sobre una superficie del dispositivo.
- 20
3. El dispositivo de la reivindicación 2 en donde el polímero anfipático forma uno o más conjuntos de gotitas en nano litro, pico litro o femto litro.
4. El dispositivo de cualquier reivindicación precedente en donde la al menos una vía de flujo comprende la al menos una sonda, reportero o reactivo.
- 25
5. El dispositivo de la reivindicación 4 en donde la al menos una sonda, reportero o reactivo se combinan con el polímero anfipático.
- 30
6. El dispositivo de la reivindicación 4 en donde la al menos una sonda, reportero o reactivo se disponen por encima, por debajo o al lado del polímero anfipático.
7. El dispositivo de la reivindicación 1 en donde el resultado y/o progreso de una reacción se determina por medio de un ensayo fluorimétrico.
- 35
8. El dispositivo de la reivindicación 7 en donde el dispositivo comprende al menos dos componentes separables.
9. El dispositivo de la reivindicación 8 en donde los al menos dos componentes separables son un lector y un cartucho de prueba.
- 40
10. El dispositivo de la reivindicación 9 en donde cartucho de prueba comprende la al menos una vía de flujo.
11. El dispositivo de la reivindicación 1 en donde la reacción es un inmunoensayo.
- 45
12. El dispositivo de la reivindicación 11 en donde la reacción es un ELISA.
13. El dispositivo de la reivindicación 7 en donde el ensayo fluorimétrico es un ensayo de colesterol, un ensayo de lipoproteínas o un ensayo de triglicéridos.
- 50
14. El dispositivo de la reivindicación 1 en donde la al menos una sonda, reportero o reactivo se selecciona a partir de un grupo que consiste en Amplex Rojo, K37, Rojo del Nilo, colesterol esterasa, colesterol oxidasa o peroxidasa de rábano picante.
- 55
15. El dispositivo de cualquier reivindicación precedente en donde la al menos una sonda, reportero o reactivo está en forma seca.
16. El dispositivo de la reivindicación 15 en donde la al menos una sonda, reportero o reactivo comprende un agente estabilizante.

17. El dispositivo de cualquier reivindicación precedente en donde el polímero anfipático es polietilenglicol (PEG).

5

18. El dispositivo de la reivindicación 17 en donde el polímero anfipático es polietilenglicol con un peso molecular de 1000 Da a 20,000 Da.

19. Un proceso para mejorar el flujo lateral del fluido en un dispositivo libre de membrana para el uso en puntos de asistencia que comprende una superficie a lo largo de la que un fluido puede fluir con un polímero anfipático que es soluble en agua.

10

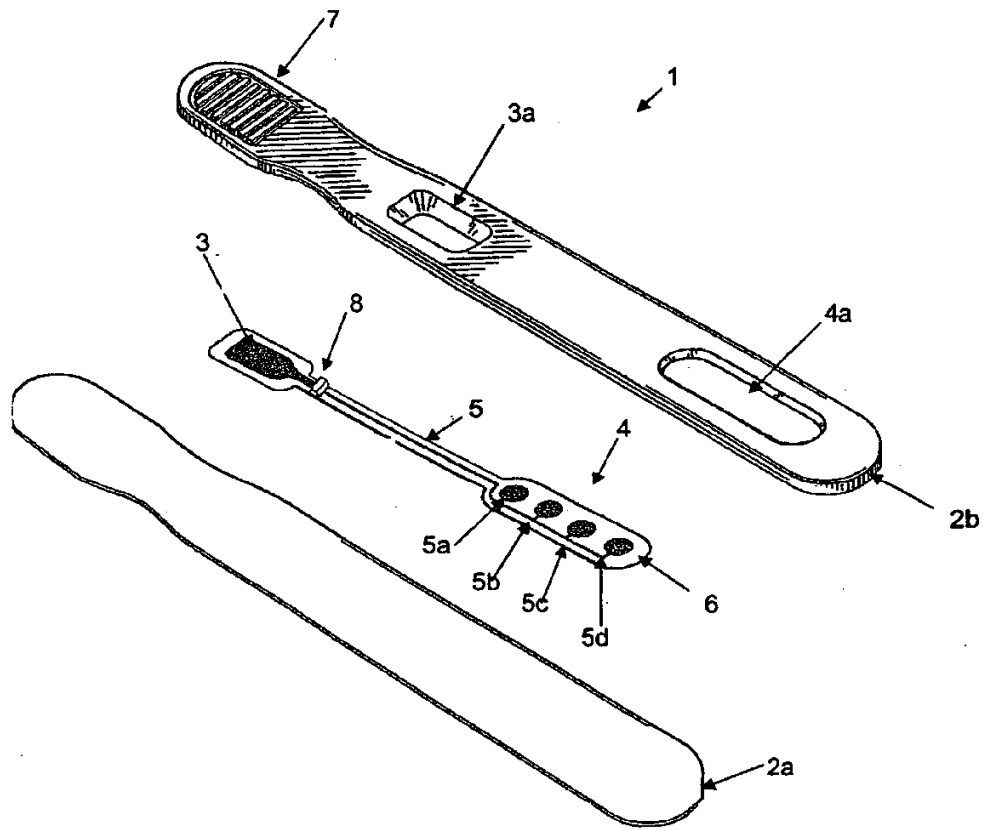


Fig. 1

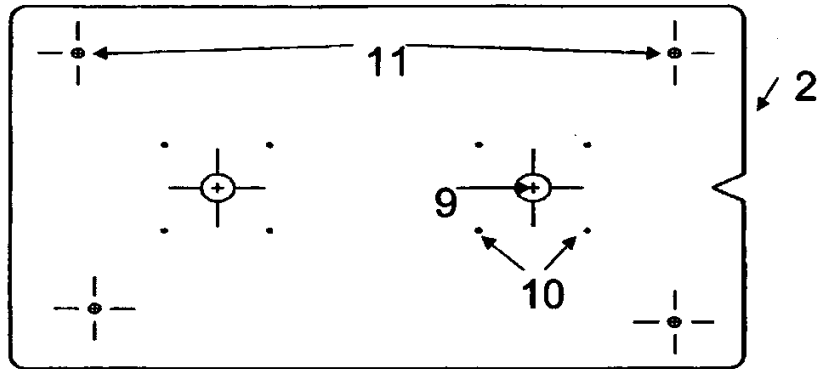


Fig. 2a

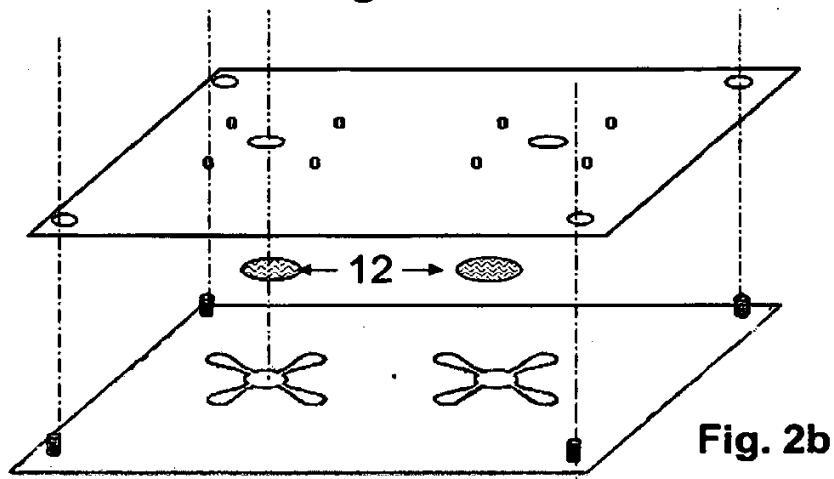


Fig. 2b

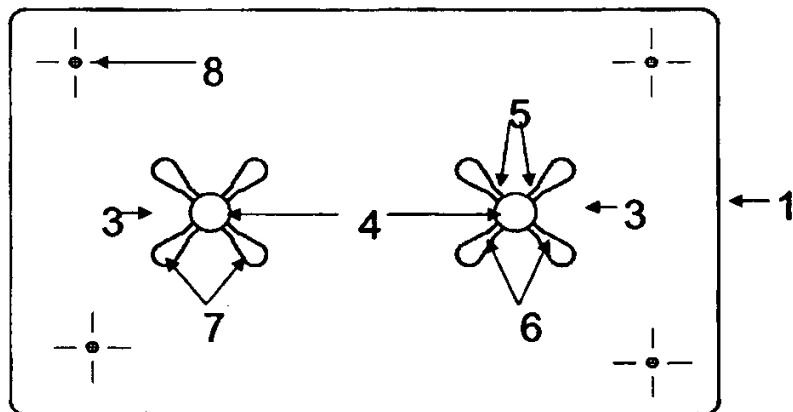


Fig. 2c

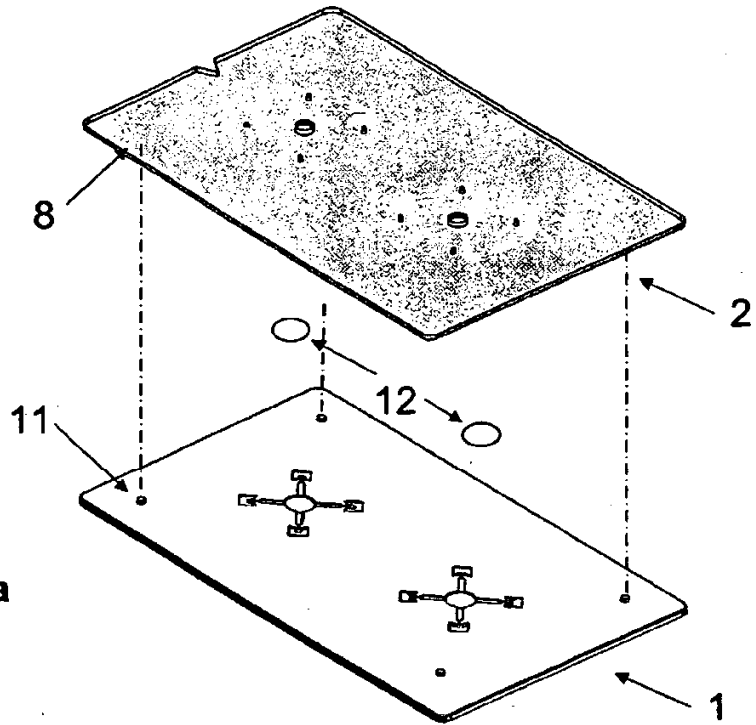


Fig. 3a

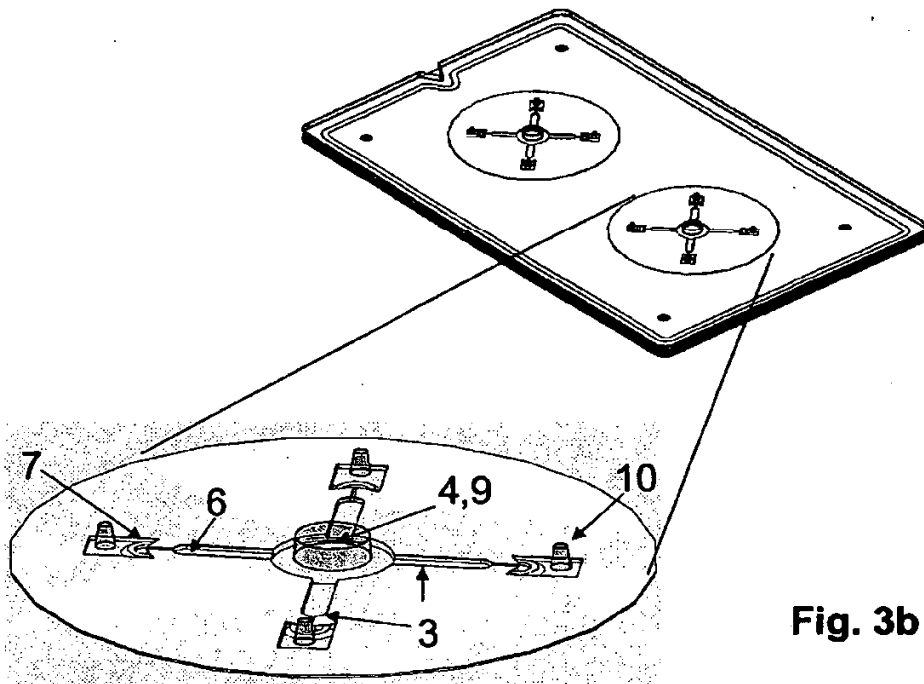


Fig. 3b



Fig. 4a

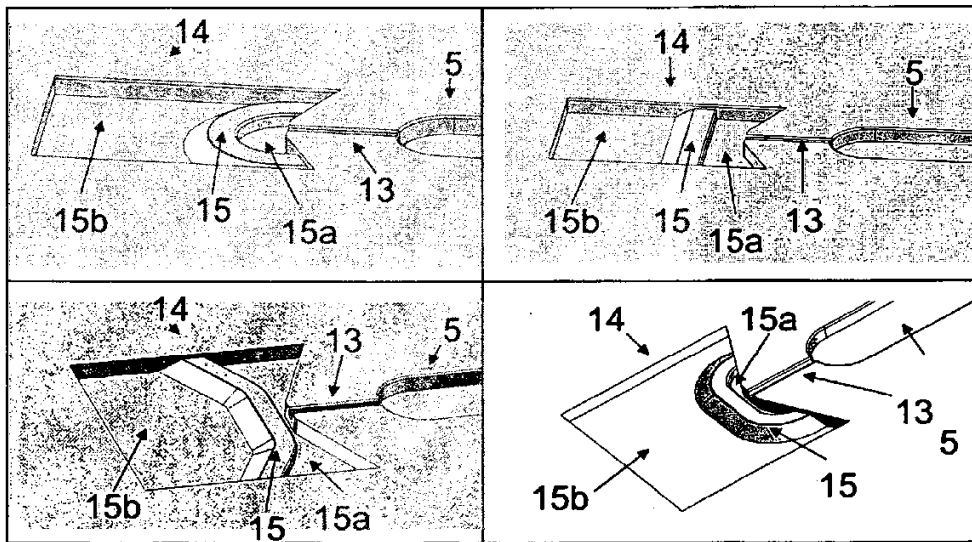


Fig. 4b

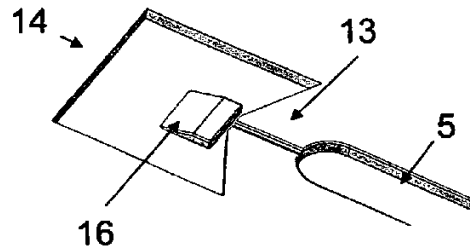


Fig. 4c

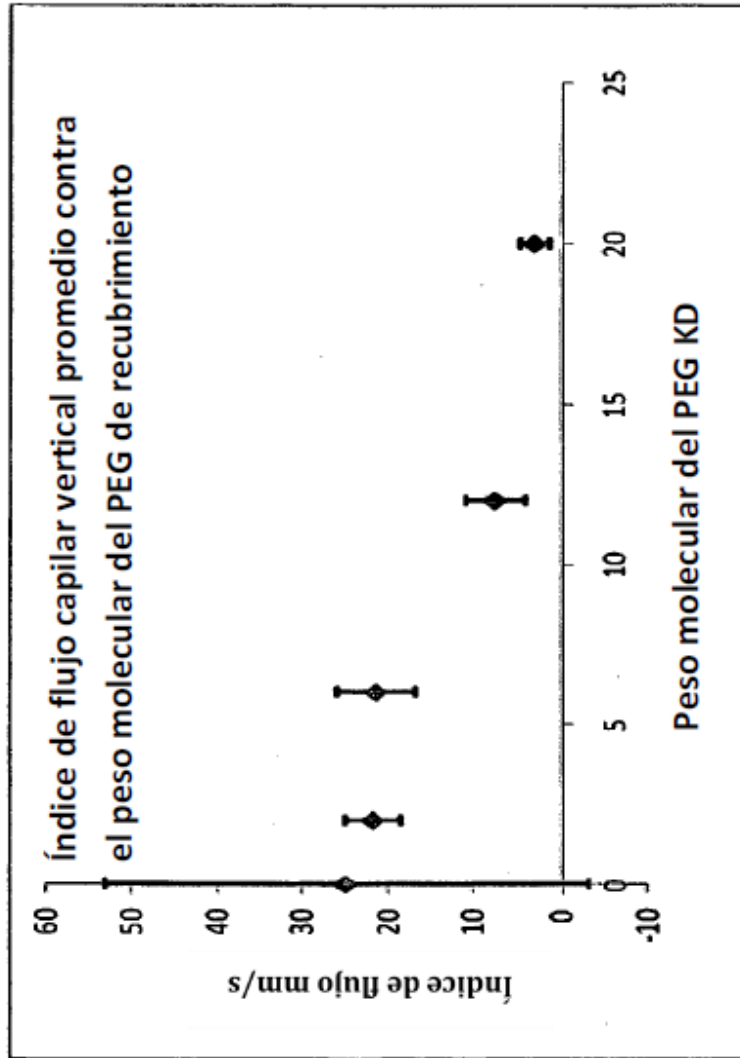


Fig. 5