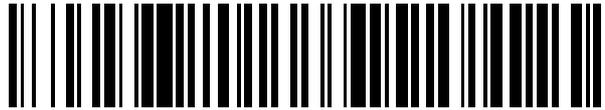


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 400**

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 09785336 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2328681**

54 Título: **Tarjeta de prueba**

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:
13.03.2015

73 Titular/es:

L3 TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
The Elms Courtyard
Bromesberrow Ledbury Hereford and Worcester
HR8 1RZ, GB

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 531 400 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

Tarjeta de prueba

5 Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona en general con el campo de dispositivos desechables de ensayo, particularmente para uso en pruebas realizadas en puntos de atención. La invención se relaciona además con el uso de tales dispositivos, incluyendo kits que comprenden tales dispositivos, para facilitar la determinación precisa de los niveles de diferentes lipoproteínas en la sangre. Los kits de prueba pueden comprender uno o más dispositivos de ensayo y opcionalmente incluyen folletos instructivos, dispositivos que sirven como lanceta, hisopos antisépticos de alcohol o vendajes adhesivos.

Antecedentes de la invención

15 Se hace referencia a varias publicaciones y documentos de patente en esta solicitud con el fin de describir con más detalle el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

20 Los dispositivos de ensayo de flujo lateral y los métodos son conocidos en la técnica. Anteriormente tales dispositivos se habían desarrollado para probar las muestras que se encuentran fácilmente disponibles en grandes cantidades. Generalmente, tales dispositivos comprenden una matriz de flujo lateral, tal como una matriz de nitrocelulosa por ejemplo, a la que se le aplica una muestra de fluido. El fluido dentro de la muestra se desplaza a lo largo de la matriz y uno o más analitos en la muestra reaccionan con los reactivos contenidos en la matriz de flujo lateral. Típicamente, al menos uno de estos reactivos está inmovilizado dentro de la matriz permitiendo que cualquier reacción con los analitos sea detectada en un área específica de la matriz, por ejemplo, mediante inspección visual.

25 Cuando la muestra es sangre, o un componente de la sangre, la recolección de una muestra grande no siempre es posible o conveniente, por ejemplo en un punto de atención tal como una farmacia o la consulta de un médico. Además, los dispositivos de flujo lateral son generalmente inadecuados para pequeñas muestras de fluidos, tales como para el análisis de volúmenes de sangre mediante 'pinchazo de un dedo'. En este caso la membrana puede secarse antes de que se complete el ensayo o puede haber fluido insuficiente para recorrer la longitud del dispositivo de ensayo antes de que sea posible realizar la medición. También, como se disminuye la escala de los dispositivos en los que se manipulan fluidos, se presenta la desventaja significativa de que existe una tendencia de que tales fluidos mantengan un flujo laminar estable. Esto hace eficiente la mezcla de líquidos y, por ejemplo, los reactivos difícilmente limitan el grado en que los dispositivos de ensayo pueden ser exitosamente reducidos en escala sin aumentar la complejidad del dispositivo. La Figura 2 proporciona ejemplos del estado del arte de los dispositivos de prueba complejos existentes.

30 Por lo tanto, existe actualmente la necesidad de dispositivos simples y eficaces que permitan una prueba rápida al mismo tiempo que permiten el uso de volúmenes más pequeños de una muestra a analizar. Un área donde tales dispositivos serían útiles es en el campo de prueba de colesterol y de lípidos en sangre.

40 Resumen de la invención

45 En un primer aspecto, la invención proporciona un dispositivo de ensayo que comprende dos superficies al menos parcialmente opuestas que exhiben diferentes energías superficiales donde la diferencia en energías superficiales está configurada para interrumpir el flujo laminar capilar de un fluido que se desplaza entre las dos superficies como se reivindica en la reivindicación 1.

50 Cuando se coloca un líquido sobre una superficie, el grado en que se propaga a través de la superficie está determinado por la tensión superficial. En una superficie hidrofílica, el líquido es atraído a la superficie y se propaga en una película fina. En una superficie hidrófoba, un líquido se propagará menos y puede 'formar espuma'. La energía superficial está generalmente estrechamente relacionada con la hidrofobicidad / hidrofiliidad de la superficie. Mientras la energía de la superficie describe interacciones con una gama de materiales, generalmente la hidrofobicidad de la superficie describe estas interacciones solamente con agua. Debido a que el agua tiene una gran capacidad de enlazamiento, un material de alta energía superficial (es decir, alto potencial de enlazamiento) puede crear más interacciones con el agua y por lo tanto será más hidrófilo. Por lo tanto, la hidrofobicidad generalmente disminuye a medida que aumenta la energía superficial. Las superficies hidrofílicas tales como el vidrio tienen por lo tanto energías superficiales altas, mientras que las superficies hidrófobas tales como PTFE o poliestireno tienen baja energías superficiales.

60 Una medición adecuada para la evaluación de la naturaleza hidrofílica / hidrófoba de una sustancia, y por lo tanto su energía superficial, es el ángulo de contacto (θ) de un líquido sobre la superficie respectiva.

El ángulo de contacto es el ángulo formado entre una línea tangencial a la superficie de una gotita de líquido y el plano de la superficie sobre la que se forma la gotita. Una superficie hidrófoba crea menos tensión interfacial con una gotita de líquido creando un mayor ángulo de contacto. La medición de los ángulos de contacto es bien conocida en la técnica, por ejemplo, los ángulos de contacto pueden determinarse como se describe en Robert J. Good y Robert J. Stromberg, Ed., "Surface and Colloid Science - Experimental Methods", Vol II, (Plenum Press, 1979), páginas 63-70. La Figura 2a proporciona una figura generalizada que demuestra la medición de un ángulo de contacto.

El término "menos hidrófobo" cuando se comparan dos superficies significa que el ángulo de contacto de una gotita de líquido sobre una primera superficie es menor que el ángulo de contacto de una gotita de líquido similar sobre la segunda superficie. Por el contrario, el término también puede referirse, por ejemplo, a dos superficies hidrofílicas que demuestran un diferencial similar, es decir una es más hidrofílica que la otra. El término "hidrófoba" se refiere a las superficies que tienen un ángulo de contacto de un líquido en el aire de al menos 90 grados. Por el contrario, el término "hidrófilo" se refiere a un material que tiene un ángulo de contacto de un líquido en el aire menor de 90 grados. La figura 2b proporciona una figura generalizada que demuestra las diferencias en el ángulo de contacto entre superficies hidrófobas e hidrofílicas.

Por lo tanto, debido a que las energías superficiales se cuantifican más comúnmente utilizando ángulos de contacto, las dos superficies al menos parcialmente opuestas deben exhibir una diferencia en el ángulo de contacto del fluido de al menos 1 a 5°, aproximadamente de 10°, por lo menos de 20° o en y por encima de 30°. En general, la superficie que tiene la energía superficial inferior debe tener un ángulo de contacto con el fluido de al menos 90°, preferiblemente de al menos 100°, más preferiblemente de al menos 110°, más preferiblemente de al menos 120°.

En general, el movimiento de líquido en canales micro o capilares mediante flujo capilar es laminar, y no turbulento, y en consecuencia, no es propicio para la mezcla del reactivo/muestra. Sorprendentemente los inventores han descubierto que, una diferencia en las energías superficiales de dos superficies al menos parcialmente opuestas estimula la mezcla del reactivo en un fluido de muestra sin disminuir la velocidad de llenado producida por el flujo laminar a medida que el fluido viaja a lo largo de una trayectoria de flujo. Esto, junto con ventajas del tamaño de los microcanales donde la mezcla de difusión es de gran beneficio supera un problema considerable con la reducción en el tamaño / escala de los dispositivos de ensayo, donde es duro o difícil de lograr una mezcla turbulenta.

En general, "flujo capilar" o "flujo lateral" se refiere al flujo pasivo de un líquido resultante de un gradiente potencial capilar o de un gradiente potencial de superficie que puede dirigir el flujo de líquido a través, por ejemplo, de tensión superficial. La velocidad de flujo capilar se refiere a la velocidad a la que un frente de la muestra se mueve a lo largo de una trayectoria de flujo, tal como una tira de membrana, cuando el líquido es aplicado en un extremo. Sin embargo, la velocidad decae exponencialmente a medida que el líquido viaja a lo largo de la trayectoria. Por lo tanto, el tiempo requerido para que un líquido se nueva a lo largo y llene una tira de membrana o un tubo capilar de longitud definida se mide a menudo y se denomina como el tiempo de flujo capilar. El tiempo de flujo capilar por lo general se expresa en seg/cm y está inversamente relacionado con la velocidad de flujo. Los términos se refieren generalmente al movimiento de un fluido sobre una superficie en donde el fluido fluye/viaja en una dirección particular o a lo largo de una trayectoria particular. Cabe señalar que el término "flujo lateral" pretende ser descriptivo y no limitante, ya que los dispositivos pueden ser configurados de otras maneras con el mismo efecto. Por ejemplo, se puede prever fácilmente un flujo radial o vertical empleando los mismos principios generales. En realizaciones particulares, el fluido reacciona en forma coincidente con diversos reactivos a medida que fluye o se desplaza.

Las superficies pueden comprender o consistir de materiales conocidos en la técnica, tales como, cartón, vidrio, silicio, plástico y similares. Preferiblemente, el material comprende o consiste de un material hidrófobo o tiene regiones que son hidrófobas por ejemplo por estar recubiertas o laminadas con materiales adecuados incluyendo, pero sin limitarse a, materiales fluorados tales como fluoropolímeros (por ejemplo, politetrafluoroetileno (PTFE)) y clorofluoropolímeros. Otros materiales que pueden resultar adecuados para alterar la energía superficial incluyen hidrocarburos tales como vaselina, látex, parafinas y similares.

Las dos superficies al menos parcialmente opuestas actúan esencialmente para apoyar las etapas de un procedimiento de ensayo, tales como una serie de reacciones químicas, que pueden tener lugar, en o entre dichas superficies. Por lo tanto, el dispositivo de ensayo que comprende las superficies puede tomar una variedad de formas, por ejemplo, una tarjeta, un chip, cartucho o portaobjetos, y puede ser un solo elemento unitario o formar parte de un estuche de múltiples componentes.

Las dos superficies al menos parcialmente opuestas pueden ser superficies sustancialmente paralelas. Por lo tanto, en una forma de realización, una de las dos superficies al menos parcialmente opuestas define un canal, por ejemplo hundido o en relieve, la otra de las dos superficies al menos parcialmente opuestas formando una tapa o sello de cierre de la parte superior del canal. Alternativamente, las superficies estarán orientadas una con respecto a la otra en un ángulo de menos de 180°. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la primera y segunda superficies pueden estar en ángulo adyacente a y con respecto a la otra formando canales en ángulo en la forma de una 'V'. En aún otras realizaciones, una de las dos superficies

al menos parcialmente opuestas es generalmente plana y la otra de las superficies al menos parcialmente opuestas puede formar columnas o acanaladuras en dicha superficie, en un ángulo, por ejemplo de alrededor de 90° o menos, en forma de 'L'. Será evidente para un experto en la técnica que estas variantes no son mutuamente excluyentes y se pueden combinar.

5 Las dos superficies al menos parcialmente opuestas definen al menos una trayectoria de flujo para el fluido. Una trayectoria de flujo para el fluido es para la transferencia de una muestra de fluido, por ejemplo, desde una primera región del dispositivo a una segunda región del dispositivo.

10 En una forma de realización, las dos superficies al menos parcialmente opuestas definen un canal capilar abierto que tiene una geometría de sección transversal suficiente para crear un canal abierto configurado para formar un canal capilar cerrado con la segunda de las dos superficies al menos parcialmente opuestas.

15 Por lo tanto, al menos una trayectoria de flujo de fluido puede ser un canal, ranura, capilar, pista o trayectoria de acceso y similares que comprende paredes laterales físicas, definidas al menos en parte por las dos superficies parcialmente opuestas.

En otra forma de realización se configuran elementos separadores para mantener las dos superficies al menos parcialmente opuestas a cierta distancia para crear un canal capilar entre dichas superficies.

20 La trayectoria de flujo tendrá una superficie superior y una inferior separadas pero sin paredes laterales físicas, y puede ser abierta (por ejemplo, a la atmósfera), que se basa en regiones hidrófobas para contención del líquido. Por lo tanto, en esta forma de realización, las superficies son superficies generalmente planas, sustancialmente paralelas separadas por espaciadores y que tienen una trayectoria hidrofílica definida entre las mismas o sobre las mismas. En este caso, un fluido de una muestra se desplazará por acción de las fuerzas capilares entre, y en contacto con, las dos superficies, a lo largo de la trayectoria hidrofílica pero permaneciendo confinada por regiones/áreas hidrófobas. Por lo tanto, las dos superficies al menos parcialmente opuestas y de la trayectoria de flujo de fluido pueden ser configuradas en una cantidad de formas.

25 Independientemente de la configuración, cuando una muestra de fluido se desplaza por fuerzas capilares a lo largo de, y en contacto con las dos superficies, sorprendentemente la diferencia en energía superficial entre las dos superficies, y por extrapolación la diferencia en hidrofobicidad/hidrofiliidad, aumenta la tendencia a la turbulencia en un fluido de una muestra a medida que se desplaza sin aparente disminución en la velocidad de flujo. En ciertas realizaciones, y en términos relativos, en donde una de las dos superficies al menos parcialmente opuestas es una superficie superior y la otra de las dos superficies al menos parcialmente opuestas es una superficie inferior, se puede prever que se puede mejorar adicionalmente la turbulencia o flujo "circular" del fluido cuando la superficie superior es una superficie menos hidrófoba o una superficie hidrofílica, mientras que la superficie inferior es una superficie menos hidrofílica o hidrófoba.

30 En formas de realización del dispositivo de ensayo, dicho dispositivo comprende además un área de aplicación en comunicación fluida con una primera región del dispositivo para la introducción de una muestra de fluido.

40 Un área de aplicación es una región en el aparato en la que se introduce una muestra acuosa a - y está en comunicación fluida con - la trayectoria de flujo de fluido. Generalmente solo hay un área de aplicación de la que se pueden tomar al menos una, dos, tres, cuatro o más alícuotas de una muestra acuosa de fluido para realizar un ensayo o ensayos. Alternativamente, puede haber una pluralidad de áreas de aplicación separadas para una cantidad de diferentes muestras de fluidos o diferentes alícuotas de la misma muestra.

45 El término "muestra acuosa" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier muestra de líquido, preferiblemente una a partir de la cual se puede detectar un analito. Los ejemplos no limitantes de tales muestras incluyen sangre entera, muestras de suero o plasma, orina, fluido cefalorraquídeo (CSF), linfa, exudado seroso u otros fluidos biológicos, homogeneizados de tejido animal, homogeneizados de tejido desproteinizado, leche, huevo crudo, caldos de fermentación, pienso para animales, y piensos marinos. Se debe apreciar que una muestra sólo necesitan estar en forma líquida o acuosa para al menos una parte esencial de cualquier ensayo. Por lo tanto, un experto en la técnica podrá prever que también se puede llevar a cabo un ensayo a temperaturas por encima del punto de fusión de una muestra, tal como una cera por ejemplo, que sea normalmente sólida a temperatura ambiente.

50 El dispositivo de ensayo puede comprender una abertura en una de las dos superficies al menos parcialmente opuestas para la introducción de una muestra de fluido en la zona de aplicación.

60 Una u otra de las dos superficies al menos parcialmente opuestas pueden comprender una abertura o aberturas para facilitar o permitir la aplicación de una muestra a la zona de aplicación. La abertura es una abertura en comunicación fluida con el área de aplicación y pueden ser una apertura moldeada o perforada o simplemente una abertura definida por las dos superficies al menos parcialmente opuestas.

El dispositivo de ensayo puede comprender además al menos un puerto de purga, que se encuentra preferiblemente en la segunda región del dispositivo.

5 Un puerto de purga es generalmente una pequeña abertura, preferiblemente en el otro extremo de una trayectoria de flujo de fluido, es decir, alejado de la primera región, y que conecta el canal capilar, a la atmósfera que rodea el dispositivo. Un puerto de purga permite el movimiento del aire o de fluido desde dentro hacia fuera del dispositivo (o viceversa) para igualar la presión entre el dispositivo y la atmósfera que podría de otro forma inhibir el flujo capilar.

10 El dispositivo de ensayo puede comprender una unión que detiene el flujo entre la primera y segunda regiones del dispositivo configurado para detener o pausar el flujo de fluido capilar de un fluido que se desplaza entre las dos superficies.

15 Una unión de detención del flujo es una región en el canal capilar en el que la muestra acuosa normalmente no fluiría sin la aplicación de una fuerza externa. Tal unión no tiene partes móviles que cuenten generalmente con una contrapresión de la tensión superficial de la muestra líquida para detener el flujo de fluido. Será evidente que dicha contrapresión puede ser creada en una cantidad de formas. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se crea la contrapresión por el aumento del área de sección transversal de la trayectoria de flujo del líquido, es decir, el canal capilar. El aumento en el área de sección transversal puede ser abrupta tal como cuando una trayectoria de flujo de un área de sección transversal pequeña entra en una cámara no capilar más grande o gradual, por ejemplo, como la paredes de una trayectoria de flujo de fluido ahusadas, que divergen o se ensanchan en un tramo. Alternativamente, una unión puede ser creada mediante el uso de paredes o barreras o modificando las propiedades superficiales del interior del dispositivo, tal como por medio de tratamientos físicos y/o químicos, para disminuir la adhesión entre la muestra acuosa y las paredes de la trayectoria de flujo, por ejemplo, formando regiones sustancialmente más hidrófobas que cualquiera de las dos superficies al menos parcialmente opuestas. La unión para detención del flujo puede detener el flujo de fluido por completo durante el resto del ensayo o simplemente puede provocar un retraso temporal en el flujo de líquido durante un período de tiempo requerido.

25 En ciertas realizaciones, el dispositivo de ensayo comprende además una membrana filtrante dispuesta entre el área de aplicación y al menos una trayectoria de flujo de fluido.

30 Los componentes celulares de la sangre entera, tal como los glóbulos rojos, pueden interferir con los ensayos de analitos tales como los ensayos de colesterol. Por lo tanto, cuando la muestra acuosa es sangre, se prefiere que tales componentes celulares sean separados del suero o plasma antes del análisis. Idealmente, la separación se realiza antes de la primera etapa del ensayo y se realiza de forma pasiva y sin la necesidad de etapas de procesamiento manual. Por lo tanto, la membrana o almohadilla filtrante actúa para remover partículas, tales como glóbulos de la sangre, de la muestra acuosa a medida que el líquido se desplaza por acción capilar a través del filtro. Preferiblemente, la almohadilla filtrante comprende o consiste en al menos un material absorbente.

40 El filtro generalmente permite la filtración de una muestra acuosa antes de que la muestra se combine con reactivos para realizar un ensayo. El filtro puede estar dispuesto dentro de la abertura en una de las dos superficies en comunicación/contacto fluido con el área de aplicación. Alternativamente, puede estar situado entre la zona de aplicación y la trayectoria de flujo de fluido.

45 El filtro puede estar formado por una matriz fibrosa para retardar el movimiento de, por ejemplo, glóbulos rojos. Los materiales adecuados incluyen espumas, fibras de vidrio (tales como borosilicato), filtros de sol-gel, medios cromatográficos tales como papeles o membranas filtrantes, tales como nitrocelulosa, polisulfona o poliéster. En algunas realizaciones, el filtro puede comprender reactivos, por ejemplo, agentes de enlazamiento tales como anticuerpos o perlas que se enlazan a y remueven componentes no deseados de una muestra acuosa. El filtro también puede comprender uno o más pretratamientos, agentes de precipitación, tensoactivos/ detergentes, reactivos de ensayo, colorantes, agentes bloqueadores o inhibidores de enlazamiento al ligando. Los agentes bloqueadores e inhibidores de enlazamiento del ligando pueden limitar la interferencia de componentes particulares de la muestra acuosa, por ejemplo albúmina de suero humano (HSA), con el ensayo. Por lo tanto, el filtro puede comprender un medio de extracción de HSA tal como por ejemplo anticuerpos anti-HSA, o cualquier otro medio que utilice, por ejemplo, precipitación, inmovilización y similares.

55 En general, la trayectoria(s) de flujo de fluido(s) del dispositivo de ensayo comprende al menos un reactivo seleccionado entre el grupo que consiste en polímeros anfipáticos, colorantes, sondas, enzimas o inhibidores de enlazamiento del ligando.

60 La trayectoria de flujo puede comprender reactivos requeridos para un ensayo o ensayos. Por ejemplo, colorantes, medicamentos, luminóforos, anticuerpos, nucleótidos, sondas de ácido nucleico, cebadores, enzimas y similares. Diferentes trayectorias de flujo pueden comprender diferentes reactivos o combinaciones de reactivos. Una trayectoria de flujo también puede comprender diferentes reactivos a lo largo de su longitud, por ejemplo, permitiendo la adición secuencial de reactivos a través del flujo capilar o lateral de la muestra acuosa.

La trayectoria o las trayectorias de flujo de fluido pueden comprender uno o más colorantes o sondas seleccionadas del grupo que consiste de Rojo Amplex, K37 y Rojo Nilo.

5 El Rojo Amplex (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), disponible a través de Invitrogen (números de catálogo A12222 y A22177), entre otros, reacciona con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) con una estequiometría 1:1 para producir resorufina altamente fluorescente. K37 (4-dimetilamino-4'-difluorometil-sulfonil-benciliden-acetófono) es divulgado por los inventores en su solicitud de patente internacional anterior PCT/GB2005/004757. Rojo Nilo, un colorante lipofílico, también conocido como oxazona azul Nilo, está disponible a través de Invitrogen (número de catálogo N1142) o puede ser producido por ebullición de una solución de azul Nilo con ácido sulfúrico. El Rojo Nilo tiñe gotitas de lípido intracelular de color rojo y también es
10 intensamente fluorescente, con una fuerte emisión de color amarillo-dorado cuando está en un ambiente rico en lípidos.

La trayectoria o trayectorias de flujo de fluido pueden comprender una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste de colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante.

15 El colesterol esterasa (la 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 esteroles, para liberar el colesterol además de un anión de ácido graso. El colesterol oxidasa (colesterol:oxígeno oxidoreductasa, número de registro: EC 1.1.3.6) es una enzima que cataliza la oxidación de colesterol en presencia de oxígeno molecular hasta 4-colesten-3-ona y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich, número de registro: EC 1.11.1.7) es una peróxido de hidrógeno oxidoreductasa. Otras hidrógeno peróxido óxido reductasas equivalentes son conocidas y se pueden derivar, por ejemplo, del haba de soja.
20

En otras realizaciones, la trayectoria de flujo de fluido comprende uno o más inhibidores de enlazamiento de ligandos seleccionados del grupo que consiste en octanoato de metal alcalino y ácido octanoico. Los octanoatos de metales alcalinos adecuados incluyen octanoato de sodio y octanoato de potasio.
25

Los inventores han establecido que los colorantes/luminóforos pueden enlazarse a sitios/dominios de enlazamiento hidrófobos de albúmina de suero humano (HSA) y pueden emitir fluorescencia cuando se enlazan a la HSA. La HSA es un componente importante del suero sanguíneo que tiene una concentración de aproximadamente 30-50 mg/ml. Los inventores creen que esta fluorescencia adicional puede causar una señal de fondo sustancial, que potencialmente distorsiona las mediciones y que conduce a errores en la determinación de la concentración de las lipoproteínas.
30

Se sabe que la HSA tiene al menos dos tipos de sitio de enlazamiento que son capaces de unirse a diversos ligandos. Un primer tipo se denomina aquí como "un dominio hidrófobo" que enlaza ácidos grasos mientras que un segundo tipo de dominio se denomina en este documento como "dominios de enlazamiento a medicamentos" (que consta de dos o más dominios). Estos dominios son conocidos por un experto en la técnica y se distinguen unos de otros en un artículo publicado en Nature Structural Biology (V5, página 827 (1998)). Este artículo identifica un dominio hidrófobo como uno al cual se pueden enlazar ácidos grasos mientras que los dominios de enlazamiento de fármacos son capaces de enlazar una cantidad de fármacos que pueden estar asociados con la HSA.
35

Por lo tanto, en realizaciones preferidas, los sitios de enlazamiento hidrófobos de la HSA en los que se pueden enlazar luminóforos, son bloqueados antes del análisis de una muestra mediante la adición de un inhibidor de enlazamiento del ligando.
40

El inhibidor de enlazamiento del ligando puede ser hidrófobo. El inhibidor puede ser anfipático. El inhibidor de enlazamiento del ligando puede comprender un ácido graso o un derivado funcional del mismo, así como otras moléculas hidrófobas. Los ejemplos de derivados adecuados de ácidos grasos, que pueden bloquear los sitios de enlazamiento hidrófobos de la HSA pueden comprender un ácido graso, sus ésteres, haluro de acilo, anhídrido carboxílico, o amida etc. Un derivado preferido de ácido graso es un éster de ácido graso.
45

El ácido graso o un derivado del mismo pueden comprender un ácido graso C1-C20 o un derivado del mismo. Se prefiere que el ácido graso o derivado del mismo puedan comprender un ácido graso C3-C18 o un derivado del mismo, más preferiblemente, un ácido graso C5-C14 o un derivado del mismo, e incluso más preferiblemente, un ácido graso C7-C9 o un derivado del mismo. Se prefiere especialmente que el inhibidor de enlazamiento del ligando comprenda ácido octanoico (C8) o un derivado del mismo, por ejemplo, octanoato. Preferiblemente, se añade el inhibidor de enlazamiento del ligando como un octanoato de metal alcalino, preferiblemente un octanoato de metal alcalino del Grupo I, por ejemplo, octanoato de sodio o de potasio.
50
55

Preferiblemente, se añade entre aproximadamente 10-400 mM del inhibidor de enlazamiento del ligando a la muestra antes del análisis, más preferiblemente, entre aproximadamente 20-200 mM, e incluso más preferiblemente, se añade entre aproximadamente 30-80 mM. Se prefiere especialmente que se añada aproximadamente 50 mM del inhibidor como
60

concentración final. Por lo tanto, en una realización preferida del método, se puede añadir aproximadamente 50 mM de octanoato de sodio a la muestra antes del análisis.

5 En realizaciones particulares se pueden usar también un ligando o ligandos para bloquear el dominio de enlazamiento de fármacos a la HSA. Los ligandos para los dominios de enlazamiento de fármacos a la HSA incluyen moléculas de fármacos tales como: tiroxina, ibuprofeno, diazepam, hormonas esteroideas y sus derivados (fármacos), hemo, bilirrubina, profármacos lipofílicos, warfarina, fármacos basados en cumarina, anestésicos, diazepam, ibuprofeno y antidepresivos (por ejemplo tiioxantina), ácido benzoico o un derivado del mismo (por ejemplo ácido triclorobenzoico o ácido triyodobenzoico), ácido fusídico o un derivado del mismo. Alternativamente, los dominios de enlazamiento a HSA pueden ser bloqueados o eliminado mediante el uso de un medio de extracción de HSA, por ejemplo, anticuerpos anti-HSA.

10 El dispositivo de ensayo generalmente comprenderá al menos una zona de detección configurada para la medición de los resultados y/o el progreso de una reacción entre al menos una parte de una muestra de fluido y al menos un reactivo.

15 La zona de detección puede ser una región discreta o zona del dispositivo o simplemente podría ser un área, punto o región, por ejemplo, de la trayectoria de flujo de fluido en donde se determina o mide el resultado y/o el progreso de una reacción entre una parte de la muestra acuosa, tal como un analito, y al menos un reactivo. Al menos una trayectoria de flujo de fluido puede transferir un fluido de una muestra de la zona de aplicación a la zona de detección. Al menos la trayectoria de flujo de fluido se configura para estar en comunicación fluida con al menos un área de aplicación y una zona de detección.

20 En ciertas realizaciones, el aparato comprende una pluralidad de trayectorias de flujo de fluido y zonas de detección. En general, al menos una trayectoria de flujo conecta, por ejemplo, mediante comunicación fluida, el área o áreas de aplicación con al menos una zona de detección. Usualmente el aparato comprenderá una sola área de aplicación y uno a ocho, tres a cinco o hasta cuatro trayectorias de flujo que conducen a al menos uno a ocho, tres a cinco o al menos cuatro zonas de detección. Debe quedar claro que el dispositivo puede comprender diferente cantidad de trayectorias de flujo y de zonas de detección y estas pueden ser de diferentes longitudes y/o volúmenes. Las áreas de aplicación, las trayectorias de flujo y/o la zona de detección se definen generalmente como una parte o todo el canal capilar.

25 El resultado y/o el progreso de una reacción o ensayo que se lleva a cabo sobre/en el dispositivo de ensayo se puede determinar por medio de una medición óptica. Alternativamente, el resultado y/o el progreso de una reacción puede ser determinada por medio de inspección visual, tal como por colorimetría. En otras realizaciones, el resultado y/o el progreso de una reacción se determinan por medio de fluorescencia.

30 Cuando el resultado y/o el progreso de una reacción se determinan por fluorescencia, la(s) zona(s) de detección pueden ser dispuestas de manera que puedan ser puestas en contacto óptico con un medio de excitación de un lector del ensayo. La zona de detección debe estar dispuesta además de tal manera que la fluorescencia producida a partir del ensayo pueda ser detectada por el medio de detección del lector del ensayo. Es posible que haya zonas de detección separadas para los distintos aspectos del mismo ensayo o para diferentes ensayos. Generalmente la(s) zona(s) de detección estará(n) dentro o hacia la segunda región del dispositivo.

35 En una realización, el dispositivo de ensayo comprende al menos tres trayectorias de flujo de fluido y al menos tres zonas de detección en donde, una primera trayectoria de flujo está en comunicación fluida con el área de aplicación y una primera zona de detección, una segunda trayectoria de flujo de fluido está en comunicación fluida con el área de aplicación y una segunda zona de detección y una tercera trayectoria de flujo de fluido está en comunicación fluida con el área de aplicación y una tercera zona de detección. Cuando el dispositivo de ensayo es para medición de colesterol y lípidos en sangre, por lo general la primera trayectoria de flujo de fluido comprenderá un primer colorante tal como Rojo Amplex, la segunda trayectoria de flujo de fluido comprenderá un segundo colorante tal como K37 y la tercera trayectoria de flujo de fluido comprenderá un tercer colorante, Rojo Nilo. En este caso la primera trayectoria de flujo de fluido puede comprender además colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante.

40 El uso de enzimas en los ensayos de colesterol y de lípidos en sangre es ventajoso porque el colesterol se encuentra a menudo en un estado esterificado, por tanto se usa preferentemente colesterol esterasa para hidrolizar el éster de colesterol hasta colesterol libre. El colesterol libre se puede convertir entonces en la cetona colest-4-eno-3-ona por la acción del colesterol oxidasa, generando peróxido de hidrógeno en el proceso. Ventajosamente, el Rojo Amplex y el peróxido de hidrógeno se convierten en resorufina y agua por la peroxidasa de rábano picante. La resorufina puede entonces ser detectada como un compuesto fluorescente con un máximo de absorción de alrededor de 563 nm y una longitud de onda de emisión máxima de 587 nm. El contenido total de colesterol se puede medir por la excitación de la muestra alrededor de 485 nm y midiendo la fluorescencia resultante a aproximadamente 600 nm.

45 En algunas realizaciones, la trayectoria de flujo de fluido puede comprender un polímero anfipático.

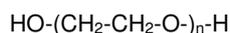
Los inventores han encontrado que los polímeros anfipáticos se pueden utilizar para recubrir superficies, por ejemplo, plásticos o vidrio o materiales hidrófobos para mejorar aún más el flujo de fluido.

Un polímero anfipático es un polímero que posee propiedades tanto hidrofílicas como hidrófobas. Tal compuesto también puede ser llamado un compuesto anfílico o un polímero hidrofílico no iónico. En realizaciones particulares, un polímero anfipático es una sustancia que es soluble tanto en agua como en una amplia gama de disolventes orgánicos.

Los polímeros anfipáticos se pueden utilizar para promover el flujo de fluido y/o la mezcla de soluciones acuosas, por ejemplo, con componentes 'secos' combinados dentro o como capas por encima o por debajo de un recubrimiento de un polímero anfipático. El uso de polímeros anfipáticos también tiene la ventaja de que mejora el flujo lateral de los fluidos, por ejemplo, sobre la 'absorción por capilaridad' tradicional con materiales porosos tal como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.485.982. 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, tal como una membrana, con el efecto de que los líquidos pueden desplazarse a mayores distancias o a mayores velocidades, por ejemplo, a lo largo de microtubos, superficies, superficies hidrófobas y similares que por acción capilar únicamente. Por lo tanto, a través del uso de un polímero anfipático, se incrementa la velocidad de flujo capilar y/o el fluido fluye/se desplaza mayores distancias de lo que se esperaría mediante acción capilar únicamente.

Un polímero anfipático puede ser utilizado para recubrir una trayectoria de flujo de fluido. Alternativamente, el polímero anfipático puede estar en la forma de un recubrimiento o película sobre la superficie de la trayectoria de flujo o puede estar en forma de un polvo, pellas, micropartículas, nanopartículas, picopartículas o rellenando un hueco o cavidad de la trayectoria de flujo. Cuando el polímero anfipático es un relleno dentro de una cavidad, puede llenar la cavidad totalmente o puede llenarla parcialmente, por ejemplo, con vacíos. El polímero anfipático puede formar la trayectoria de flujo, por ejemplo, como una pista o camino sobre una superficie hidrófoba a lo largo de la cual puede ocurrir el flujo de fluido. Por ejemplo, el polímero anfipático se puede imprimir (por ejemplo, mediante impresión por inyección de tinta o de chorro de burbujas), pintar, rociar o aplicar sobre una superficie, tal como una superficie plana, por ejemplo para formar 'pistas' y/o capas. Los reactivos se pueden combinar, por ejemplo mediante mezcla, con el polímero anfipático o pueden ser dispuestos en forma de capas por encima, por debajo o al lado del polímero anfipático.

El polietilenglicol (PEG) es un polímero anfipático. Los pesos moleculares útiles de PEG incluyen aproximadamente desde 600 hasta 10.000 Da, y entre aproximadamente 1.000 a 3.000 Da. El polietilenglicol, también conocido como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE), es un oligómero o polímero de óxido de etileno. Los PEG están disponibles en una amplia gama de pesos moleculares desde 300 g/mol hasta 10.000.000 g/mol. PEG tiene la siguiente estructura general:



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

Generalmente los PEG incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares. Mientras que los PEG que tienen diferentes pesos moleculares encuentran uso en una variedad de aplicaciones debido a sus diferentes propiedades físicas, tales como viscosidad, sus propiedades químicas son casi idénticas. También se encuentran disponibles diferentes formas de PEG dependiendo del iniciador usado para el proceso de polimerización, tal como PEG metil éter monofuncional (metoxipoli (etilenglicol)), abreviado mPEG. Los PEG también están disponibles con diferentes geometrías. Los PEG ramificados tienen 3 a 10 cadenas de PEG que emanan de un grupo nuclear central. Los PEG estrella tienen de 10 a 100 cadenas de PEG que emanan de un grupo nuclear central. Los PEG tipo peine tienen múltiples cadenas de PEG injertadas normalmente en una cadena principal de polímero. Los PEG también pueden estar acoplados de forma covalente a otras moléculas en un proceso conocido como PEGilación que puede ser ventajoso cuando se utilizan las propiedades de flujo de fluido de PEG para la mezcla del reactivo por ejemplo. Preferiblemente, cuando el polímero anfipático es polietilenglicol (PEG) tiene 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. Los PEG particularmente útiles incluyen PEG2000, PEG6000, PEG12000 y PEG20000.

Un ejemplo adicional de un polímero anfipático es un polipéptido anfipático, es decir, un polipéptido que tiene una estructura secundaria de tal manera que el polipéptido tiene un frente hidrofílico y uno hidrófobo. El diseño de estructuras de péptidos anfipáticos (por ejemplo polipéptidos de hélice alfa) se conoce en la técnica. Por ejemplo, en: Grell y colaboradores (2001) J Pept Sci 7(3): 146-51; Chen y colaboradores (2002) J Pept Res 59(1): 18-33; Iwata y colaboradores (1994) J Biol Chem 269(7): 4928-33; Cornut y colaboradores (1994) FEBS Lett 340(1): 29-33; Negrete y colaboradores (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.

5 El uso de un polímero anfipático, particularmente en combinación con las realizaciones descritas, puede ayudar además a reducir el tiempo de un ensayo que toma de varias horas o incluso días hasta aproximadamente tan poco como un minuto.

En realizaciones particulares, el dispositivo de ensayo se usa para la preparación de perfiles lipídicos y/o para la realización de ensayos de colesterol y de lipoproteína.

10 El dispositivo de ensayo se puede utilizar para generar el perfil lipídico de un paciente mediante la toma de una muestra de un paciente y luego realizar el ensayo en el sitio donde se toma la muestra. Por lo tanto, el dispositivo de ensayo debe ser adaptado para una muestra que puede ser cualquier fluido biológico, por ejemplo, sangre, suero, linfa, etc. El dispositivo de ensayo puede ser adaptado para determinar la concentración de uno o más, por ejemplo, entre colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, VLDL e IDL en una muestra basada en análisis de fluorescencia.

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende un paquete de componentes para la preparación de un perfil lipídico o la realización de un ensayo, más preferiblemente un ensayo de colesterol.

20 El kit puede comprender uno o más de un número de componentes tales como (i) un medio para la esterilización de la piel de un paciente antes de tomar una muestra de sangre, preferiblemente por una muestra obtenida por pinchazo en el dedo. Un medio convencional es un pedazo de tela o gasa que incluye un agente esterilizante tal como un alcohol, o un agente antibacteriano tal como bisbiguanidas, por ejemplo clorhexidina como una sal soluble en solución acuosa o alcohólica; (ii) un medio para penetrar la piel, tal como un dispositivo de lanceta convencional que comprende preferiblemente un manguito de seguridad. Alternativamente, la aguja puede ser parte de un montaje de jeringa convencional que incluye el cilindro y el émbolo; (iii) un dispositivo de ensayo de acuerdo con el primer aspecto de la invención; (iv) emplastos adhesivos o de gaza para cubrir la herida causada por la punción de la piel; (v) folletos instructivos que proporcionan detalles sobre el uso del dispositivo; (vi) guantes desechables para evitar el contacto con la sangre; (vii) un lector de la prueba. Los componentes del kit pueden suministrarse en un medio de embalaje, tal como un empaque de cartón o de plástico dividido en compartimientos, preferiblemente con una cubierta sellable herméticamente.

30

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 a y b son figuras generalizadas que muestran la medición del ángulo de contacto (θ).

La Figura 2 proporciona ejemplos de dispositivos de ensayo de la técnica anterior.

35 La Figura 3 ilustra una realización del dispositivo de ensayo que utiliza una unión de detención del flujo con forma de 'lágrima'.

La Figura 4 ilustra alternativas de diseños/formatos para el ensayo.

Las Figuras 5 y 6 ilustran configuraciones alternativas de las trayectorias de flujo de fluido, uniones para detención del flujo y una realización adicional del dispositivo.

40 La Figura 7 ilustra el efecto del peso molecular de PEG sobre la tasa de flujo vertical.

Descripción detallada de la invención

45 Las Figura 3a ilustra una forma de realización de un dispositivo de ensayo de acuerdo con la invención que puede usarse, por ejemplo, en la determinación de los niveles de lipoproteína en sangre.

50 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 plástico que incorpora una cantidad de un pigmento tal como negro de humo. En este caso, se forma una superficie de soporte a partir de un polímero de grado médico 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 (CAS número 26007-43-2), Zeonor® COP, Zeonex® COP o polisulfona Udel® (CAS número 25135-51-7). En este ejemplo el soporte esta formado por TOPAS COC que comprende 1 % de negro de humo. El uso de negro de humo tiene la ventaja adicional de que, durante la soldadura con láser por ejemplo, se reduce el requerimiento 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 humo además puede tener beneficios en relación con la disipación/aislamiento del calor.

60 La incorporación de pigmentos, tales como negro de humo, en plásticos altera la energía superficial de tales plásticos y, por extensión, su hidrofobicidad/hidrofiliidad. Esto tiene la ventaja de que no se requiere la modificación de la superficie, por

ejemplo modificación química, para crear una diferencia en la energía superficial entre la primera superficie de soporte (1) y la segunda superficie - en este caso un elemento de cubierta (2).

5 La superficie de soporte de esta realización está moldeada pero puede formarse mediante cualquier técnica de moldeo o maquinado estándar conocida en la técnica. Aunque es generalmente plana, comprende áreas perfiladas, en este ejemplo de relieve hundido que forma, 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 en forma equidistante entre sí en un ángulo de alrededor de 90°.

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

15 Cada extremo de las trayectorias 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 el ancho y/o la profundidad y por extensión el área de sección transversal del canal de flujo capilar que forma una unión de detención del flujo (7) que evita el flujo adicional del fluido capilar. 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 trayectoria de flujo de fluido, la zona de detección y la unión de detención del flujo, se muestra en forma más detallada en la Figura 3b. 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 'lágrima', trapezoidal, triangular, de columna o tubular. Otros ejemplos se muestran en la Figura 4. Para el uso en hospitales, laboratorios o en grandes volúmenes, es posible disponer 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.

25 La Figura 5 ilustra formas de realización adicionales de uniones de detención del flujo. En la Figura 5a la trayectoria de flujo de fluido (5) mantiene un área de la sección transversal lisa sustancialmente a lo largo de su longitud total antes de estrecharse o constreñirse para formar una sección de trayectoria de flujo de fluido de área de sección transversal reducida (13) hacia el extremo distal. Esta sección de trayectoria de flujo de fluido está a su vez adyacente a, y en comunicación fluida con una cámara (14). La cámara está dividida en regiones mediante una pared o barrera baja (15) - en este caso en dos partes (15a) y (15b). En uso, un fluido entra a la parte de relleno (15a) de la cámara (14). La pared (15), o más exactamente las fuerzas capilares que actúan sobre el fluido de la muestra en la región de la pared, detiene el flujo de fluido en la segunda parte de la cámara (15b). En la Figura 5b se reemplaza la pared por una porción elevada (16). De nuevo, las fuerzas capilares que actúan sobre el fluido de la muestra en la región de la porción elevada (16), evitan que el fluido llene 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, trapezoides y similares. Un puerto de purga localizado en forma 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 igualando las presiones dentro de las trayectorias de flujo de fluido del dispositivo.

40 La superficie de soporte comprende también una serie de postes de alineación (8) para alinear la superficie de soporte con la segunda superficie - el elemento de cubierta (2).

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

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

55 En las formas de realización mostradas, los orificios de alineación (11) orientan al elemento de cubierta con respecto al elemento de soporte al acomodar los postes de alineación (8). En formas de realización 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.

60 Los elementos de alineación pueden ser simplemente elementos elevados con los orificios o ranuras de alineación correspondientes. Los elementos de soporte y de cubierta pueden fijarse o unirse entre sí por ejemplo por medios 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 formas de realización los elementos

de cubierta y de soporte se unen entre sí, por ejemplo mediante el uso de pegamentos, disolventes, cinta adhesiva y similares. En este caso los elementos de cubierta y de soporte se unen entre sí mediante el uso de soldadura por calor y por láser.

5 Uno o ambos de los elementos de soporte y de cubierta pueden comprender medios de identificación, para proporcionar un identificador único y/o para proporcionar un medio para un lector del ensayo, por ejemplo, para controlar el número de veces que se ha utilizado el dispositivo de ensayo o cuándo se aplicó la muestra de manera que pasa un tiempo de ensayo adecuado. Dichos medios de identificación pueden contener también instrucciones o datos tales como los datos de calibración o de control de calidad. Los medios de identificación pueden adoptar una variedad de formas que incluyen, pero no se limitan a, texto, Braille, datos numéricos, código(s) de barras lineales, código(s) de barras en dos dimensiones, etiqueta(s) RFID y similares.

10 Se mantiene firmemente un filtro (12) entre los elementos de soporte y de cubierta en forma adyacente a y en comunicación fluida con el área de aplicación (4) y la abertura (9) y las trayectorias de flujo de fluido.

15 En el uso, se aplica ya sea una muestra diluida o no diluida directamente al filtro a través de la abertura (9).

20 El dispositivo de ensayo puede ser utilizado para analizar sangre entera venosa, por ejemplo, obtenida mediante punción 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, que produce no más de unas pocas gotas de sangre (~ menos de 50 μ l tal como de aproximadamente 10 μ l a 20 μ l). Luego de formarse la gotita de sangre puede ser aplicada directamente al área de aplicación del dispositivo de ensayo o ser aspirada por una pipeta y después aplicada como corresponde. La capacidad para utilizar sangre obtenida, por ejemplo, mediante punción en un dedo, representa directamente un avance significativo sobre los ensayos conocidos en la técnica.

25 Alternativamente, el dispositivo de ensayo puede utilizarse para analizar 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 solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y esta puede comprender al menos un inhibidor de enlazamiento del ligando. El diluyente puede comprender además dos inhibidores de enlazamiento del ligando, uno para el(los) sitio(s) de enlazamiento hidrófobo y uno para el(los) sitio(s) de enlazamiento de fármacos.

30 El fluido en la muestra migra a través del filtro y a medida que lo hace igualmente lo hacen los glóbulos rojos, en el caso de sangre completa, y las partículas grandes se separan por filtración pasiva. Como resultado, se reduce la interferencia de fondo de tales células o partículas grandes. En este ejemplo, el filtro más un medio de extracción de HSA comprende anticuerpos anti-HSA que remueven la HSA de la muestra como se discutió previamente, reduciendo de nuevo el fondo.

35 El fluido se desplaza por medio de flujo capilar desde el área de aplicación (4) en las trayectorias de flujo de fluido (5) con las que el área de aplicación está en comunicación fluida. A medida que se desplaza el líquido hidrata los reactivos en forma seca, tal 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.

40 El uso del término 'forma seca' se refiere a los componentes que se mantienen en una forma en la que generalmente están sustancialmente libres de, o carentes de, líquido o humedad; es decir, que no están en solución hasta que se reconstituyen mediante la realización del ensayo mismo, en vez de reconstituirse antes de y en forma separada de los procedimientos del ensayo. Por lo tanto, la muestra acuosa misma reconstituye el reactivo o los reactivos secos, eliminando de esta forma la necesidad de etapas y reguladores de reconstitución separados.

45 Cuando se usan las enzimas u otros reactivos, en particular cuando se usan en forma seca, se prefiere que tales enzimas u otros reactivos estén estabilizados. En el contexto de esta invención, un 'reactivo estabilizado' es un reactivo que tiene una mejor estabilidad con respecto, por ejemplo, a la estabilidad durante el almacenamiento, la estabilidad térmica etc. Por lo tanto, en formas de realización particulares los reactivos que se usan comprenden un agente estabilizante. Métodos de estabilización particulares se describen en las solicitudes de patente internacional números WO90/005182 y WO91/014773. Otros reactivos de estabilización adecuados incluyen 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 tales como Polyquatemium-11.

50 La diferencia en energías superficiales entre los elementos de soporte y de cobertura con los que la muestra de fluido está en contacto aumenta la mezcla del fluido con los reactivos secos.

60

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

5 En esta etapa el dispositivo puede colocarse dentro de un lector adecuado del ensayo y se miden los niveles de analitos, en este caso colesterol y lípidos en sangre.

10 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 medios de acoplamiento, tales como una ranura, o medios de alineación para permitir insertar, colocar o unir adecuadamente el dispositivo de ensayo. En esta forma de realización, el dispositivo de ensayo tiene un corte en forma de '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 mientras que el lector usualmente es reutilizable.

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

20 Un inmunoensayo en un ensayo bioquímico 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 tomando ventaja del enlazamiento específico de un anticuerpo con su antígeno. Preferentemente se usan anticuerpos monoclonales ya que ellos se enlazan a un sitio de una molécula particular lo que permite pruebas específicas y precisas. Tanto la presencia del antígeno como de los anticuerpos puede medirse, por ejemplo, cuando al detectar 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, trazando una curva estándar en un gráfico. La detección de la cantidad de anticuerpo o antígeno puede lograrse mediante una variedad de métodos tales como la marcación 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.

30 Convenientemente, el dispositivo de la presente invención se basa en el flujo capilar para el transporte del fluido de muestras de poco volumen y no existe por lo tanto necesidad de usar partes móviles. Por lo tanto, el dispositivo supera los problemas de escala, economía, fabricación y fallas mecánicas encontradas en la técnica anterior.

35 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) medios de excitación que pueden alinearse con las zonas de detección del dispositivo de ensayo. Los 'medios de excitación' pueden operarse para excitar la muestra en la detección, por ejemplo, de manera que esta emita fluorescencia. El aparato comprenderá además al menos un medio de detección que puede ser operado para detectar, por ejemplo, la fluorescencia emitida por la muestra en la(s) zona(s) de detección.

40 Generalmente el medio de excitación comprende una fuente de iluminación que puede ser operada para iluminar la muestra aproximadamente a 400 nm - 600 nm. En consecuencia, la fuente de luz es preferiblemente 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. El medio de excitación puede comprender además un medio de enfoque adaptado para enfocar la luz sobre la muestra. El medio de enfoque puede comprender un lente, o guía de luz tal como un filamento de fibra óptica o una película de luz óptica (3M).

45 El medio de detección puede comprender un fotodiodo, CCD, o sensor óptico o fotomultiplicador, que es preferentemente sensible al amarillo-rojo. La fluorescencia emitida por la muestra puede detectarse dentro de un intervalo que incluye aproximadamente 440 nm - 650 nm dependiendo del colorante o los colorantes usados. El medio de detección debe ser capaz de detectar la fluorescencia emitida aproximadamente a 490 nm, aproximadamente 495 nm, aproximadamente 570 nm, aproximadamente 600 nm y aproximadamente 610 nm. La fluorescencia 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 intensidad de la fluorescencia, puede leerse la corriente del fotodiodo o la velocidad de conteo del fotomultiplicador a partir de un amperímetro, un voltímetro, o un módulo medidor de la velocidad. Otros medios resultarán evidentes para una persona capacitada en la técnica.

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

En formas de realización particulares el lector del ensayo se configura para detectar y medir las intensidades de fluorescencia de uno solo o de una pluralidad de ensayos en forma simultánea o, a su vez, cuando el dispositivo de ensayo entra al lector o en algún momento después de eso.

5

El lector puede comprender además medios de procesamiento adaptados para determinar la concentración de un analito o analitos en la muestra con base en la fluorescencia detectada.

10

El lector puede comprender además medios de visualización para visualizar las mediciones determinadas a partir de la muestra, preferiblemente como una lectura. Por ejemplo, el medio de visualización pueden comprender una pantalla LCD, o pueden basarse en un ordenador para alimentar y/o calcular y/o visualizar. En su forma más básica, los medios de visualización pueden ser simplemente una ventana en la que se visualiza una indicación o una medición.

15

Usualmente, el lector del ensayo es portátil y convenientemente, el dispositivo y el lector del ensayo pueden usarse para llevar a cabo ensayos de forma simple, rápida y 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 médico practicante con conocimiento de las concentraciones de colesterol, lipoproteínas y HDL puede usar el dispositivo para decidir el curso eficaz del tratamiento. Además, el dispositivo y el lector del ensayo son portátiles y pueden ser usados por GP, o enfermeras quienes llevan a cabo visitas a domicilio, o incluso como estuches de prueba para uso a domicilio.

20

En este caso, los medios de procesamiento se adaptan para determinar directamente la concentración de uno o más analitos, por ejemplo, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, VLDL e IDL en la muestra con base en el análisis de la fluorescencia. Alternativamente, el medio de procesamiento pueden adaptarse para calcular la concentración de LDL, VLDL e IDL, en la muestra con base en las concentraciones de lipoproteína total, colesterol y HDL.

25

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.

30

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

35

El(los) colorante(s) fluorescente(s) y/u otros reactivos pueden imprimirse como uno o más arreglos de gotitas a nivel de picolitros. Convenientemente, dicho arreglo 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 de los arreglos 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 mm^2 . Resultará evidente para un experto en la técnica que, aunque pueden variarse estas densidades de gotitas con poco efecto en la realización del ensayo, resultará evidente además que, por el contrario, dichas densidades pueden optimizarse también para mejorar la realización del ensayo. Por ejemplo, las gotitas pueden aplicarse además como gotitas de nanolitros o femtolitros, aplicadas como arreglos que se superponen, aplicadas una (o más) sobre la otra, aplicadas como arreglos individuales discretos, en forma separada o aplicadas como bloques de diversos arreglos que forman un arreglo de un tamaño más grande (es decir un aditivo). El tamaño del conjunto puede optimizarse también por ejemplo con respecto a una concentración particular de reactivo o colorante.

45

50

Cuando se 'imprimen', las gotitas de colorante fluorescente pueden aplicarse al dispositivo en concentraciones de entre aproximadamente 0,1 mM a 3,0 mM, de forma más adecuada, entre aproximadamente 0,3 a 2,5 mM, y aún de forma más adecuada, entre aproximadamente 0,5 a 2,0 mM. Alternativamente, cuando el dispositivo es para uso 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. Posteriormente se seca el colorante antes de usarlo.

55

En uso, el fluido de la muestra hidrata al polímero anfipático y diluye al colorante fluorescente el que puede enlazarse luego a las lipoproteínas en la muestra. Cuando se enlazan así, el colorante emite fluorescencia bajo una excitación adecuada. La concentración total de lipoproteína en la muestra puede determinarse mediante el uso de análisis de fluorescencia.

60

El método generalmente comprende:

- (i) poner en contacto una muestra biológica acuosa con al menos un colorante o luminóforo y opcionalmente al menos un polímero anfipático en donde, al menos un colorante o luminóforo se enlaza con al menos una lipoproteína en la muestra biológica acuosa y cuando se enlaza a ella emite fluorescencia bajo la excitación adecuada;
- (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 lipídico de una muestra biológica acuosa.

Mediante el uso del término "lipoproteína total", se entiende 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 entiende la concentración total de colesterol en una muestra. Mediante el uso del término "perfil lipídico", se entiende 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 enlazados a las lipoproteínas. Las pruebas convencionales realizadas en los laboratorios clínicos no miden la lipoproteína total. Por lo tanto, de forma convencional, se requiere determinar primero, y después adicionar la concentración de colesterol y de los ésteres de colesterol, a aquella de los triglicéridos para determinar la concentración total de lipoproteína. La medición convencional de triglicéridos en un laboratorio clínico está sometida a errores sustanciales debido a que se basa en la medición del glicerol, que circula de forma natural en la sangre. Convenientemente, debido a que el número (volumen) de partículas de lipoproteínas se mide de forma directa para determinar la concentración de lipoproteína total (que equivale a la concentración total de lípidos), el ensayo del colesterol de acuerdo con la presente invención no está sometido a este error. Por lo tanto, se obvian 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, por ejemplo, de K37 para la medición de las lipoproteínas en una macromolécula biológica que es particularmente útil cuando un médico clínico desea obtener de forma rápida y eficiente un perfil lipídico. 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 enlazado a diferentes clases de lipoproteínas puede ser sustancialmente la misma que para una concentración total dada de lipoproteínas, es decir la concentración total de lipoproteínas, independientemente de su composición (es decir la relación de HDL:LDL:LDL:VLDL en la muestra). En consecuencia, se prefiere usar K37 de tal manera que la respuesta de la intensidad de fluorescencia sea sustancialmente lineal en el intervalo de concentraciones de moléculas de lipoproteína que se esperarían a partir de las muestras que se encontrarían en las pruebas clínicas.

Sin desear estar atado a ninguna hipótesis, se cree que la intensidad de la fluorescencia de un colorante fluorescente depende de su afinidad por una molécula de lipoproteína en particular (HDL, LDL, IDL o VLDL) en la muestra. El rendimiento cuantitativo de la fluorescencia depende del medio ambiente dentro de ese complejo molecular de lipoproteína, y también del grado de inhibición de la fluorescencia provocado por la transferencia de energía entre las moléculas sonda empacadas en forma estrecha. Por tanto, en su solicitud anterior, los inventores razonaron que sería 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 precisa de lipoproteína total mediante la medición simple de la fluorescencia. Los inventores notaron además que tal concentración de la sonda debería preferiblemente equilibrar el mayor rendimiento cuantitativo de K37 en HDL comparado con VLDL y LDL con su mayor afinidad por HDL, y por lo tanto un mayor grado de inhibición dentro de la HDL para producir una respuesta constante de la señal de fluorescencia en todas las partículas de lipoproteína.

Los inventores han realizado una serie de experimentos para investigar si era posible obtener una relación lineal e igual entre la fluorescencia de la sustancia de la sonda, K37, y la concentración de lipoproteína para cada tipo de partícula de lipoproteína (HDL, LDL, y VLDL), a través del intervalo de concentraciones de lipoproteína que se encontrarían 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 cuales había una relación lineal entre la fluorescencia de K37 y la concentración de lipoproteína. 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 también demuestran tal relación con la concentración de lipoproteína.

El uso de enzimas en un ensayo de colesterol es ventajoso ya que el colesterol se encuentra frecuentemente en un estado esterificado, por lo tanto se usa preferiblemente el colesterol esterasa para hidrolizar el éster de colesterol hasta colesterol libre. El colesterol libre puede convertirse luego en la cetona colest-4-eno-3-ona mediante la acción del colesterol oxidasa, que genera el peróxido de hidrógeno en el proceso. Convenientemente, el Rojo Amplex y el peróxido de hidrógeno se

5
10
15
convierten en resorufina y agua mediante la peroxidasa de rábano picante. La resorufina puede ser luego detectada como un compuesto fluorescente con un máximo de absorción de aproximadamente 563 nm y una longitud de onda de emisión máxima de 587 nm. El contenido de colesterol total puede medirse al excitar la muestra alrededor de 485 nm y al medir la fluorescencia resultante aproximadamente a 600 nm.

20
25
30
35
40
45
50
55
60
Cuando se utiliza una enzima esta puede suministrarse a un nivel muchas veces en exceso de la relación que se utilizaría 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, que son de alrededor de 1:1000. Sorprendentemente, la combinación de una diferencia en las energías superficiales del dispositivo acopladas con el uso de enzimas estabilizadas secas y opcionalmente un polímero anfipático permite usar cantidades mucho más pequeñas tanto de la muestra como del reactivo. Sin desear estar atado a una teoría en particular, se cree que la diferencia en las energías superficiales de las dos superficies al menos parcialmente opuestas 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, se pueden usar niveles más grandes de enzima en volúmenes de reacción más pequeños lo que conduce a reacciones aún más eficientes y rápidas que aquellas anteriormente posibles en los métodos de la técnica anterior.

La segunda etapa para el método puede comprender:

(ii) excitar el(los) 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 o las longitudes de ondas de excitación usadas dependerán de los colorantes fluorescentes específicos que se usan en el ensayo. Para el Rojo Amplex la longitud de onda de excitación es aproximadamente de 480 nm, para K37 la longitud de onda de excitación es aproximadamente de 440 nm y para el Rojo Nilo la longitud de onda de excitación es aproximadamente de 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 fluorescencia puede medirse a una longitud de onda de entre aproximadamente 520 nm - 620 nm. A longitudes de ondas de emisión de aproximadamente 540 nm, o superiores, pueden observarse lecturas más precisas para determinar la concentración total de lipoproteína (es decir la concentración de HDL, IDL, LDL y VLDL, pero también los quilomicrones si están presentes). Sin embargo, la(s) longitud(es) de onda de emisión de fluorescencia que se mide(n) dependerán de los colorantes fluorescentes específicos que se usen en un ensayo. Para Rojo Amplex la fluorescencia se mide aproximadamente a 600 nm, para K37 la fluorescencia se mide aproximadamente a 495 nm y para Rojo Nilo la fluorescencia se mide aproximadamente a 610 nm.

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

Además, la concentración de triglicéridos puede calcularse al restar la concentración de colesterol total de la concentración de lipoproteína total. Por lo tanto, se genera un perfil de lípidos más detallado de la muestra que consiste de la concentración de lipoproteína total, la concentración de colesterol total, y también de la concentración de triglicéridos, que serían útiles para el especialista clínico.

Los inventores descubrieron anteriormente que una serie de colorantes se enlazarían a las lipoproteínas y exhibirán diferentes respuestas de fluorescencia que dependen de la lipoproteína particular enlazada. 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 ausencia de la lipoproteína específica de un propietario particular) como se determina a partir de una curva de calibración y un valor conocido del contenido de lipoproteína total. Por ejemplo el colorante fluorescente, Rojo Nilo, exhibe una fluorescencia considerablemente superior en HDL que en otras lipoproteínas, tales como LDL y VLDL. Por lo tanto, se pueden utilizar otros colorantes fluorescentes (por ejemplo Rojo Nilo, K37 o cualquier otra sonda lipofílica que muestre especificidad, o mejoría o reducción de la fluorescencia hacia una lipoproteína en particular), para discriminar entre las clases o subclases de lipoproteínas en la muestra.

En consecuencia, el método de la invención 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 usando un segundo y/o un tercer colorante fluorescente.

5

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

10

15

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

20

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

25

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

30

35

El perfil lipídico generado incluye la determinación de la concentración de colesterol enlazado a LDL en la muestra. Es especialmente ventajoso conocer la concentración de colesterol LDL 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 son transportados en VLDL y el componente de colesterol de VLDL es del 20%. Esto es particularmente ventajoso para ayudar al especialista clínico a decidir un curso apropiado de tratamiento.

40

Ejemplos

45

Visión de conjunto experimental

Los siguientes detalles experimentales describen la exposición completa de una forma de realización de la invención como se describió anteriormente.

50

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 Rojo Amplex (no fluorescente) para generar el producto altamente fluorescente Resorufina.

55

Estabilización de las enzimas sobre plástico

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

60

Colesterol esterasa (3.1.1.13)

Colesterol oxidasa (1.1.3.6)

Peroxidasa de rábano picante (1.11.1.7)

Rojo Amplex: 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina

- 5 Las enzimas se estabilizaron sobre plástico mediante el uso de Gafquat como agente estabilizante. Se añadieron las tres enzimas a una solución de regulador de fosfato de potasio 0,01 M, pH 7,0. La actividad final de cada enzima se midió a razón de 200 U/ml del regulador. Luego se diluyó la solución 1:1 con la formulación de Gafquat (polímero muy cargado positivamente) y se depositaron 5 µl de la solución resultante sobre una superficie plástica y se secó a 30 °C en presencia de gel de sílice durante 2 horas. El proceso dio como resultado una biosuperficie enzimática seca, con 0,5 U de cada enzima depositada.
- 10 Procedimiento del ensayo - utilizando una dilución de la muestra 1/80
- Se realizaron dos enfoques, a) reacción de la muestra de colesterol (plasma) con enzimas secas y Rojo Amplex en solución, b) reacción de la muestra de colesterol tanto con las enzimas secas como con el colorante Rojo Amplex estabilizado seco:
- 15 (a) Reacción de la muestra de colesterol (plasma) con enzimas secas y Rojo Amplex en solución.
- Regulador de dilución A: Rojo Amplex 4,16 mM, Ácido cólico 10 mM, Tritón X-100 al 0,2 % en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco pH 7,2.
- 20 La muestra a ensayarse se diluyó primero a razón de 1 parte en 80 partes del regulador de dilución A, después se usaron 50 µl de la muestra diluida para reconstituir y activar la mezcla de tres enzimas secas (previamente estabilizada como se describió anteriormente) en la cámara del ensayo de la muestra.
- 25 Se midió el contenido de colesterol 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 forma directa a través de la medición de la fluorescencia en estado estable luego de 40 segundos, o $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima de generación de sustrato). Cada evaluación se hizo con referencia a los datos estándar del ensayo.
- 30 (b) Reacción de la muestra de colesterol (plasma) tanto con enzimas secas como con Rojo Amplex.
- Regulador de dilución B: Ácido cólico 10 mM, Tritón X-100 al 0,2 % en solución salina regulada con fosfato de Dulbecco pH 7,2.
- 35 Este procedimiento es similar al proceso anterior. Sin embargo, en este proceso el colorante Rojo Amplex se secó en la trayectoria de flujo junto con la mezcla de tres enzimas. En primer lugar, se recubrió una región definida de la cámara de ensayo 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 describió anteriormente. Se recubrió luego una segunda región separada de la cámara de ensayo con 10 µl de solución de Rojo Amplex / PEG2000 y se secó a 30 °C en presencia de gel de sílice durante 2 h. La solución de recubrimiento del colorante se componía de 5,35 mg/ml de Rojo Amplex, PEG2000 al 5 % p/v en dimetilsulfóxido (DMSO).
- 40 Se diluyó la muestra a ensayar, 1 parte en 80 partes de regulador de dilución B, y se usaron 50 µl de la muestra diluida para reconstituir y activar el colorante Rojo Amplex seco y la mezcla de tres enzimas en la cámara de ensayo de la muestra.
- 45 Se midió el contenido de colesterol mediante excitación de la mezcla de la muestra a 480 nm y se midió la fluorescencia resultante a 600 nm. Se determinó nuevamente la concentración de colesterol directamente a través ya sea de la medición de $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima de generación de sustrato) o de la fluorescencia en estado estable luego de 40 segundos. Cada evaluación se hizo como referencia a los datos estándar del ensayo.
- 50 Se concluyó que ambos ensayos eran capaces de determinar los niveles de colesterol clínicamente relevantes entre 2-11 mM.
- Procedimiento de ensayo - utilizando una muestra sin diluir
- 55 Se analizaron muestras biológicas puras mediante la aplicación de la muestra a un filtro de borosilicato impregnado con anticuerpo anti-HSA localizado dentro del dispositivo consumible, que sirve para filtrar y dirigir la muestra a un área de lectura o de detección apropiada de 200 µm de profundidad. El recubrimiento previo del área de lectura en primer lugar con gotitas de 400 x 65 picolitros de reactivo enzimático por mm², seguido por gotitas de 600 x 65 picolitros de reactivo colorante por mm² y gotitas de 450 x 65 picolitros de reactivo inhibidor por mm² facilita el flujo rápido de la muestra en el área de lectura. La excitación posterior de la muestra a 480 nm (paso de banda de 10 nm) genera la fluorescencia que puede ser
- 60

detectada a través de un filtro de 600 nm (paso de banda de 10 nm) para permitir la determinación del contenido total de colesterol de la muestra como referencia para mediciones estándar adecuadas.

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

Solución detergente: se disuelven 1,63 g de ácido cólico, 10 g de polietilenglicol 2000, 800 µl de Tritón X-100 y 253,3 µl de maleato de dietilo en dimetilformamida (DMF) y se ajusta el volumen final en 40 ml.

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

Reactivo Inhibidor: se disuelven 260 mg de azida sódica y 912,92 mg de fosfato de potasio dibásico trihidratado en agua y el volumen final se ajusta en 40 ml.

15 Ejemplo 2 - Ensayo de lípidos totales

Se disolvió el colorante K37 en DMF hasta una concentración final de 1,0 mM. A continuación se disolvió PEG-2000 al 5% p/v en la solución colorante y se depositaron 60 nanolitros de la solución resultante en una superficie plástica y se secó removiendo el solvente al vacío durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

20 Procedimiento del ensayo - utilizando la muestra diluida

Se diluyó primero la muestra que iba a ser ensayada (plasma) a razón de 1 parte en 80 partes de solución salina regulada con fosfato que contenía octanoato sódico 50 mM, pH 7,4.

25 Se aplicaron 5 µl de la muestra de plasma diluido al colorante seco que se hidrató de forma espontánea. El contenido de lípidos totales 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 10 nm). El contenido de lípidos totales se determinó de forma empírica como referencia a estándares conocidos.

30 Procedimiento de ensayo - utilizando la muestra sin diluir

35 Se ensayaron las muestras biológicas puras mediante la aplicación de 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 adecuada de lectura de 200 µm de profundidad. El recubrimiento previo del área de lectura con gotitas de 3000 x 65 picolitros 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 posterior 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 la determinación del contenido de lípidos totales de la muestra como referencia a mediciones estándar adecuadas.

40 Ejemplo 3 - Ensayo de colesterol HDL

45 Se disolvió Rojo Nilo en DMF hasta una concentración final de 0,5 mM. A continuación se disolvió PEG2000 al 5% p/v en la solución colorante y se depositaron 60 nanolitros de la solución resultante sobre una superficie plástica y se secó mediante la remoción del disolvente al vacío durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad.

Procedimiento de ensayo - utilizando la muestra diluida

50 Se diluyó primero la muestra que iba a ser ensayada (plasma) a razón de 1 parte en 80 partes de solución salina regulada con fosfato que contenía octanoato sódico 50 mM, pH 7,4.

55 Se aplicaron 5 µl de la muestra de plasma diluido al colorante seco que se hidrató 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 610 nm (paso de banda de 10 nm). Se calculó el contenido de colesterol HDL mediante el uso del algoritmo descrito en la especificación principal. Un ensayo equivalente puede realizarse además utilizando sangre entera, sin diluir.

60 Procedimiento de ensayo - utilizando la muestra sin diluir

Se ensayaron las muestras biológicas puras mediante la aplicación de 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 adecuada de lectura de 200 μm de profundidad. El recubrimiento previo del área de lectura con gotitas de 3400 x 65 picolitros de Rojo Nilo 0,5 mM / PEG2000 al 5% (p/v) en DMF por mm^2 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 posterior de la muestra a 580 nm (paso de banda de 10 nm) genera la fluorescencia que puede detectarse a través de un filtro de 610 nm (paso de banda de 10 nm) para permitir la determinación del contenido de HDL-c de la muestra como referencia a mediciones estándar adecuadas.

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

Medición del colesterol total - es decir la prueba (1)
 Medición de la concentración de lípidos totales - es decir la prueba (2)
 Medición del colesterol HDL - es decir la prueba (3)
 15 Valor calculado de triglicéridos - es decir las pruebas (2) menos la (1)
 Valor calculado de VLDL- es decir el valor de triglicéridos/2.2
 Valor calculado de LDL - es decir el determinado por la ecuación de Friedwald

20 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 o bien se dejaron sin tratar, se trataron con detergente o se recubrieron con PEG. Los capilares tratados con detergente se prepararon mediante lavado 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 drenar el excedente seguido por el secado.

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

30 Capilares sin tratar

2 mm - alcanzó 20 mm en ~30 segundos
 1 mm - alcanzó 90 mm en 15 segundos
 35 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
 40 0,5 mm - alcanzó el extremo del tubo (100 mm) en 15 segundos

Capilares recubiertos con PEG:

45 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

50 Estos datos demuestran que el flujo capilar del fluido 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 volvieron hidrófobos al tratarlos con un agente formador de capa de silicona (dimetil diclorosilano) y calentarlos a 120°C. El agua no entró al lumen de estos capilares. Al recubrir los capilares hidrófobos con PEG (como anteriormente) se restablecen las condiciones de flujo de fluido comparables a los capilares recubiertos con PEG sin capa de silicona. En algunos de los experimentos donde el recubrimiento superficial de PEG fue discontinuo el flujo de fluido se detuvo en el punto de interrupción en el recubrimiento con PEG.

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

Los capilares que tienen una longitud de 100 mm y diámetros de 2 mm, 1 mm, o 0,5 mm fueron tratados como se describió 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:

- 5 Tubos sin tratar:
- 2 mm de diámetro - 9 mm
 - 1 mm de diámetro - 22 mm
 - 0,5 mm de diámetro - 51 mm

- 10 Tubos tratados con detergente
- 2 mm de diámetro - 10 mm
 - 1 mm de diámetro - 22 mm
 - 0,5 mm de diámetro - 53 mm

- 15 Tubos recubiertos con PEG
- 2 mm de diámetro - 11 mm
 - 1 mm de diámetro - 25 mm
 - 0,5 mm de diámetro - 54 mm

25 El agua no entró a los tubos capilares hidrófobos con silicona. Al recubrir los capilares con silicona con PEG se restablecieron las alturas del flujo capilar y fueron similares a aquellas de los capilares sin silicona recubiertos con PEG.

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

- 30 14 mm con 2 mm de ID
28 mm con 1 mm de ID
56 mm con 0,5 mm de ID

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

La reproducibilidad de la transferencia y la estabilidad a largo plazo de la mezcla de moléculas hidrófobas (es decir el colorante) / polímero anfipático se midió de la siguiente manera:

40 Se disolvió PEG con un peso molecular de 2000 Da en una solución de colorante hidrófobo (ya sea Rojo Nilo o K37) en dimetilformamida (DMF), a una concentración del 5% p/v. Se elaboraron las películas de PEG/colorante mediante la deposición de 25 μ l de PEG/solución colorante en DMF en un vial de vidrio de 5 ml. Se esparció la solución sobre la base del vial y luego se la colocó en una cámara de vacío durante una hora para evaporar el disolvente.

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

50 Se evaluó la estabilidad al depositar las películas durante un almacenamiento a largo plazo, y medir la intensidad de la fluorescencia de estas películas cuando se disolvieron nuevamente en soluciones de lipoproteínas después de diferentes períodos de almacenamiento. Las películas se almacenaron en la oscuridad bajo una variedad de condiciones: en aire sin agente desecante, en aire en presencia de gel de sílice, y al vacío en presencia de gel de sílice. Las películas se almacenaron bajo estas condiciones a temperaturas tanto de 20 como de 37 °C.

55 Se determinaron las intensidades de fluorescencia para colorantes en soluciones de lipoproteína disueltas en DMF o en películas de PEG:

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

Se obtuvieron lecturas idénticas de intensidad de fluorescencia (dentro del 0,5%) para películas de PEG como se obtuvieron al adicionar colorante disuelto en DMF. Se calculó la reproducibilidad de las lecturas de fluorescencia de las películas de colorante/PEG con lipoproteína:

	K37	Rojo 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
DE	1370,32	1475,73
CV (%)	0,22	0,34

5

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 C al 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
% de CV	1,31	1,44	1,25	1,56	0,92	0,90	0,98
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
% de CV	0,21	0,31	0,12	0,19	0,06	0,19	0,18

10

Conclusiones:

(1) Los colorantes incorporados en las películas de PEG se redissuelven completamente cuando se reconstituyen con soluciones acuosas, y producen las mismas intensidades de fluorescencia que los colorantes adicionados en disolventes orgánicos.

15

(2) Las películas de colorante/PEG son reproducibles y las películas elaboradas de la misma forma resultan en la misma intensidad de fluorescencia.

(3) Las películas de colorante/PEG son estables durante al menos 52 semanas cuando se almacenan bajo las condiciones de almacenamiento más severas probadas (37°C, sin desecante).

20

Ejemplo 7 - Comparación de los polímeros anfipáticos/no iónicos

Los capilares de borosilicato (100 mm de largo, 1 mm de ID de Composite Metal Services Ltd - CV1012) se recubrieron al extender 7 mm de una solución polimérica al 5% en diferentes disolventes y sacudir hasta secar. El disolvente usado dependió de la solubilidad con cloroformo favorecida debido a su alta velocidad de evaporación.

25

Los experimentos en los capilares recubiertos se realizaron por triplicado y se utilizó un capilar sin recubrir cada vez como referencia. Los 4 capilares se mantuvieron verticales en una tarjeta de referencia alineada mediante 2 ranuras cortadas en la tarjeta para cada capilar. Los extremos de los capilares se extienden exactamente 7 mm más allá de la parte inferior de la tarjeta.

30

El experimento se grabó en video mediante el uso de una cámara a color de baja iluminación y alta resolución marca Sunkwang conectada a una tarjeta Winnov 500050G V1000 + OV PC y se usó el programa de captura de video para capturar y analizar los datos. Se fijó la velocidad de los fotogramas en 5 cuadros por segundo (para evitar la pérdida de fotogramas) a menos que se establezca otra cosa. El líquido de flujo (10-4M Rose Bengal en agua) estaba contenido en un vidrio de reloj de fondo plano y simplemente se hizo descender la tarjeta hasta que la parte inferior de la tarjeta descansó en las paredes del vidrio de reloj. Se sumergieron los capilares en el líquido de flujo a una profundidad de 2 mm. Esto produjo un espacio de 5 mm con la parte interior de la tarjeta, 9 mm desde la parte inferior de la tarjeta hasta la primera línea y otros 6 mm hasta la segunda alineación de la tarjeta. Las velocidades de flujo se calcularon al contar cuántos cuadros transcurrieron durante los 9 mm de desplazamiento entre la parte inferior de la tarjeta y la primera línea.

Tabla 1. Desempeño de los sistemas de recubrimientos poliméricos/solvente en la altura de la columna de agua y la velocidad de flujo capilar. * = resultado de un solo capilar () = resultado de 2 de 3 capilares cuando el capilar tenía una altura de la columna por debajo de la primera línea de la tarjeta y se estimó de esta manera.

Recubrimiento	Disolvente	Altura promedio de la columna de agua mm	STDEV sobre la altura de la columna	Velocidad promedio de flujo mm/s	STDEV sobre la velocidad promedio de flujo mm/s	Velocidad más alta 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
Carboximetil celulosa	Agua	18,0	*	180	*	180
0,0'-Bis(2- aminoetil) polietilenglicol 2000	Cloroformo	17,0	3,5	38,8(52,5)	25,0(10,6)	60
Metil éter de PEG 5000	Cloroformo	17,8	1,26	2,4	0,2	2,6

La Figura 7 ilustra el efecto del peso molecular del PEG sobre la velocidad de flujo vertical.

Aunque ciertas de las formas de realización preferidas de la presente invención han sido descritas y tomadas específicamente como ejemplo más arriba, no se pretende que la invención se limite a dichas formas de realización. Pueden hacerse diferentes modificaciones a las mismas sin apartarse del alcance de la presente invención, como se exponen en las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

- 5 1. Un dispositivo de ensayo que comprende dos superficies al menos parcialmente opuestas que exhiben diferentes energías superficiales en donde la diferencia en energías superficiales está configurada para interrumpir el flujo laminar capilar de un fluido que se desplaza entre las dos superficies y en donde las dos superficies al menos parcialmente opuestas definen al menos una trayectoria de flujo de fluido para la transferencia de una muestra de fluido desde una primera región del dispositivo hasta una segunda región del dispositivo.
- 10 2. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 1 en donde una de las dos superficies al menos parcialmente opuestas define un canal capilar abierto que tiene una geometría de sección transversal suficiente para crear un canal abierto configurado para formar un canal capilar cerrado con la segunda de las dos superficies al menos parcialmente opuestas.
- 15 3. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 1, en donde los elementos espaciadores están configurados para mantener las dos superficies al menos parcialmente opuestas separadas una cierta distancia para crear un canal capilar entre dichas superficies.
- 20 4. Un dispositivo de ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3 que comprende además un área de aplicación en comunicación fluida con la primera región del dispositivo para la introducción de una muestra de fluido.
- 25 5. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 4, que comprende una abertura en una de las dos superficies al menos parcialmente opuestas para la introducción de una muestra de fluido a la zona de aplicación.
- 30 6. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 4 o 5, que comprende además al menos un puerto de purga localizado en la segunda región del dispositivo.
- 35 7. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 4, 5 o 6 que comprende además una unión de detención del flujo entre la primera y la segunda regiones del dispositivo configurada para detener o pausar el flujo de fluido capilar de un fluido que se desplaza entre las dos superficies.
- 40 8. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 7 en donde el dispositivo comprende además una membrana filtrante dispuesta entre el área de aplicación y al menos una trayectoria de flujo de fluido.
- 45 9. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la trayectoria de flujo de fluido comprende al menos un reactivo seleccionado del grupo que consiste en polímeros anfipáticos, colorantes, sondas, enzimas o inhibidores de enlazamiento del ligando.
- 50 10. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 9 en donde la trayectoria de flujo de fluido comprende uno o más colorantes o sondas seleccionadas del grupo que consiste de Rojo Amplex, K37 y Rojo Nilo.
- 55 11. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 9 o 10, en donde la trayectoria de flujo de fluido comprende una o más enzimas seleccionadas de entre el grupo que consiste en colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante.
- 60 12. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 9, 10 u 11, en donde la trayectoria de flujo de fluido comprende uno o más inhibidores de enlazamiento del ligando seleccionados del grupo que consiste en octanoato de metal alcalino y ácido octanoico.
13. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende además al menos una zona de detección configurada para la medición del resultado y/o el progreso de una reacción entre al menos una parte de una muestra de fluido y al menos un reactivo.
14. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 13 que comprende al menos tres trayectorias de flujo de fluido y al menos tres zonas de detección en donde, una primera trayectoria de flujo está en comunicación fluida con el área de aplicación y una primera zona de detección, una segunda trayectoria de flujo de fluido está en comunicación fluida con el área de aplicación y una segunda zona de detección y una tercera trayectoria de flujo de fluido está en comunicación fluida con el área de aplicación y una tercera zona de detección.
15. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 14 en donde la primera trayectoria de flujo de fluido comprende Rojo Amplex, la segunda trayectoria de flujo de fluido comprende K37 y la tercera trayectoria de flujo de fluido comprende Rojo Nilo.

16. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en la reivindicación 15 en donde la primera trayectoria de flujo de fluido comprende además colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa de rábano picante.

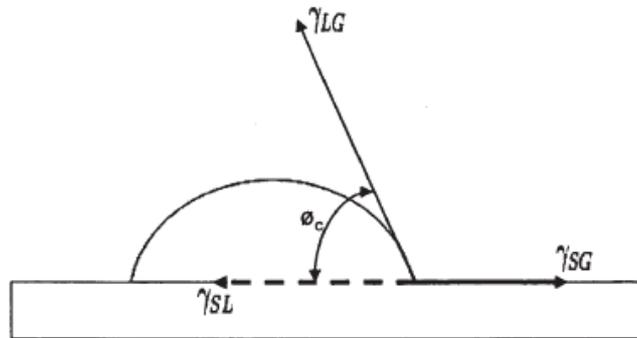
5

17. Un dispositivo de ensayo como el reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la trayectoria de flujo de fluido comprende un polímero anfipático.

10

18. Un kit de componentes que comprende al menos un dispositivo de ensayo como el reivindicado en las reivindicaciones 1 a 17 y que comprende además uno o más de (i) un medio para esterilización de la piel de un paciente; (ii) medios de penetración de la piel; (iii) gasa; (iv) esparadrapos; (v) guantes desechables y (vii) un lector de ensayo.

19. El uso de un dispositivo de ensayo como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para la medición del nivel de colesterol o al menos un lípido en una muestra de fluido.



en donde

- γ_{SG} = Tensión interfacial entre el sólido y el gas
- γ_{SL} = Tensión interfacial entre el sólido y el líquido
- γ_{LG} = Tensión interfacial entre el líquido y el gas
- θ_c = Ángulo de contacto

Fig. 1a

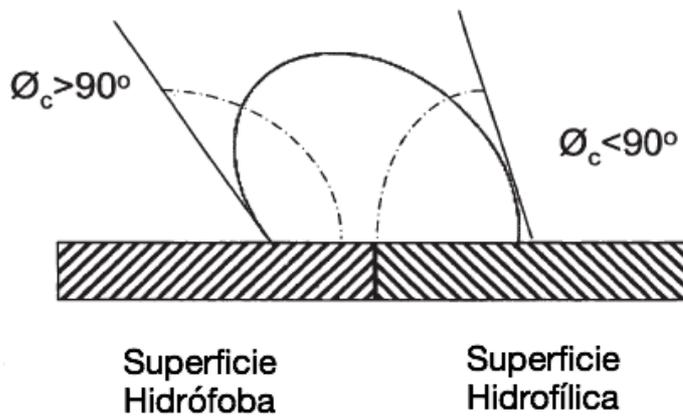
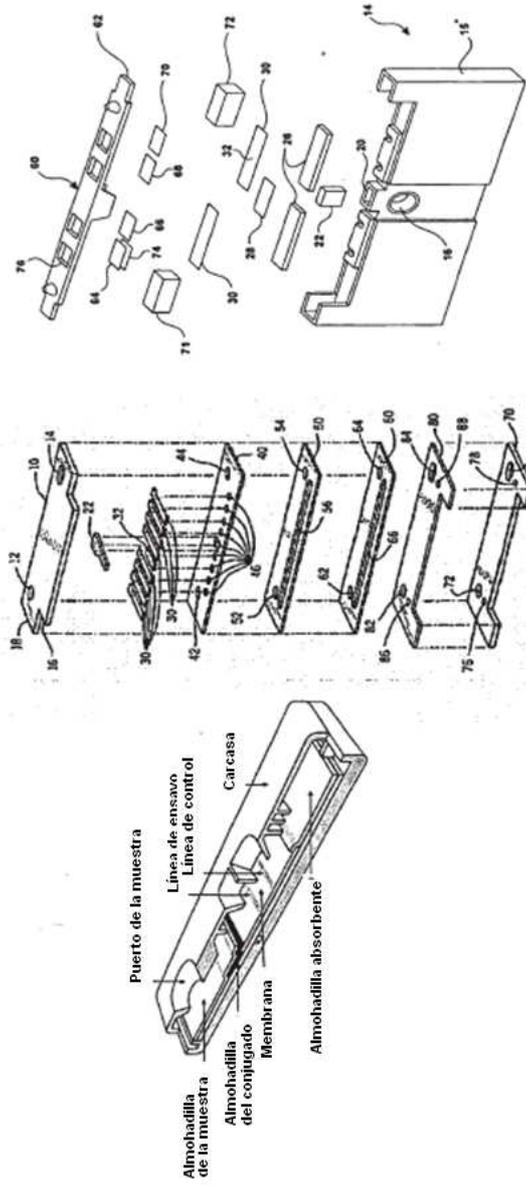


Fig. 1b



Dispositivo de Abbott US 5.520.787

Dispositivo de Cholestech - WO2008/086019

Fig. 2

Vista esquemática del dispositivo de flujo lateral - Millipore

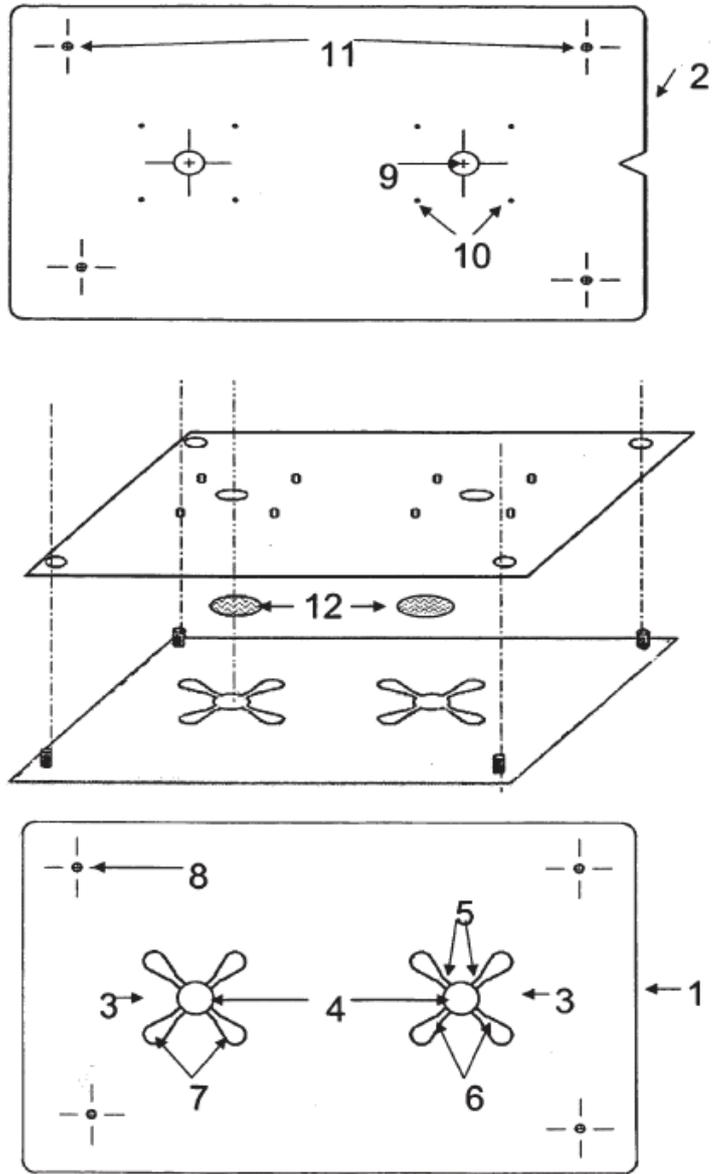


Fig. 3a

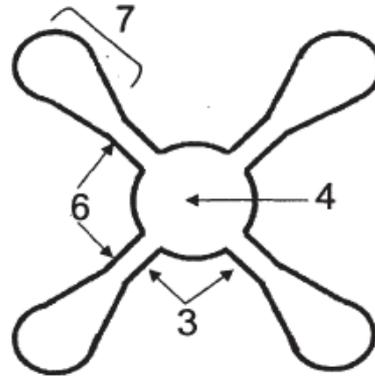


Fig. 3b

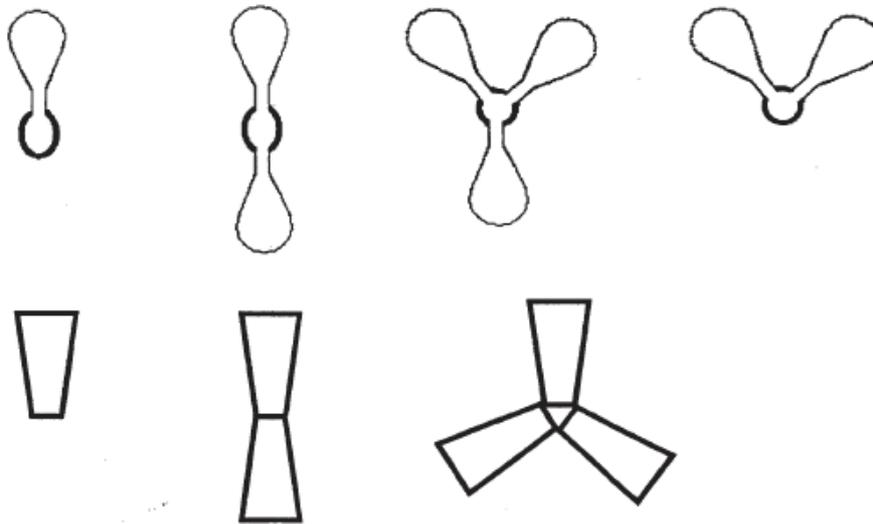


Fig. 4



Fig. 5

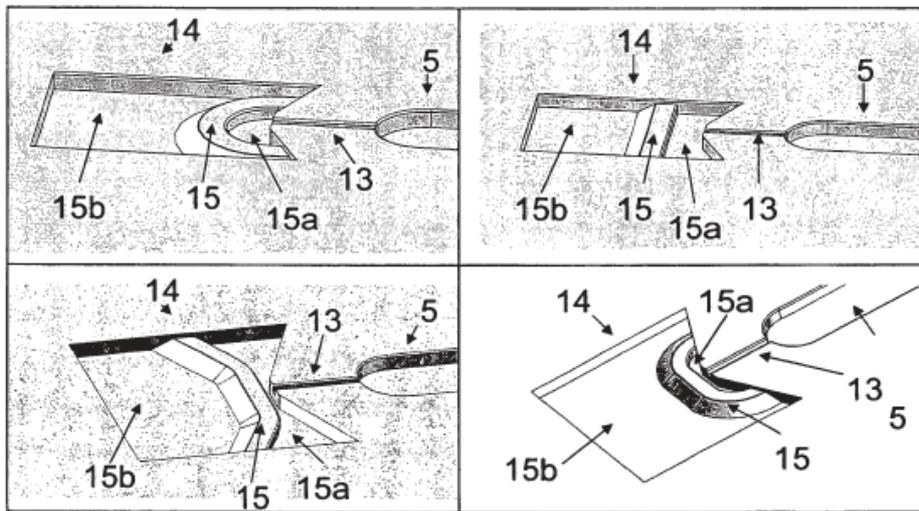


Fig. 5a

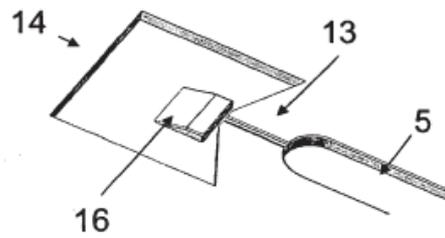


Fig. 5b

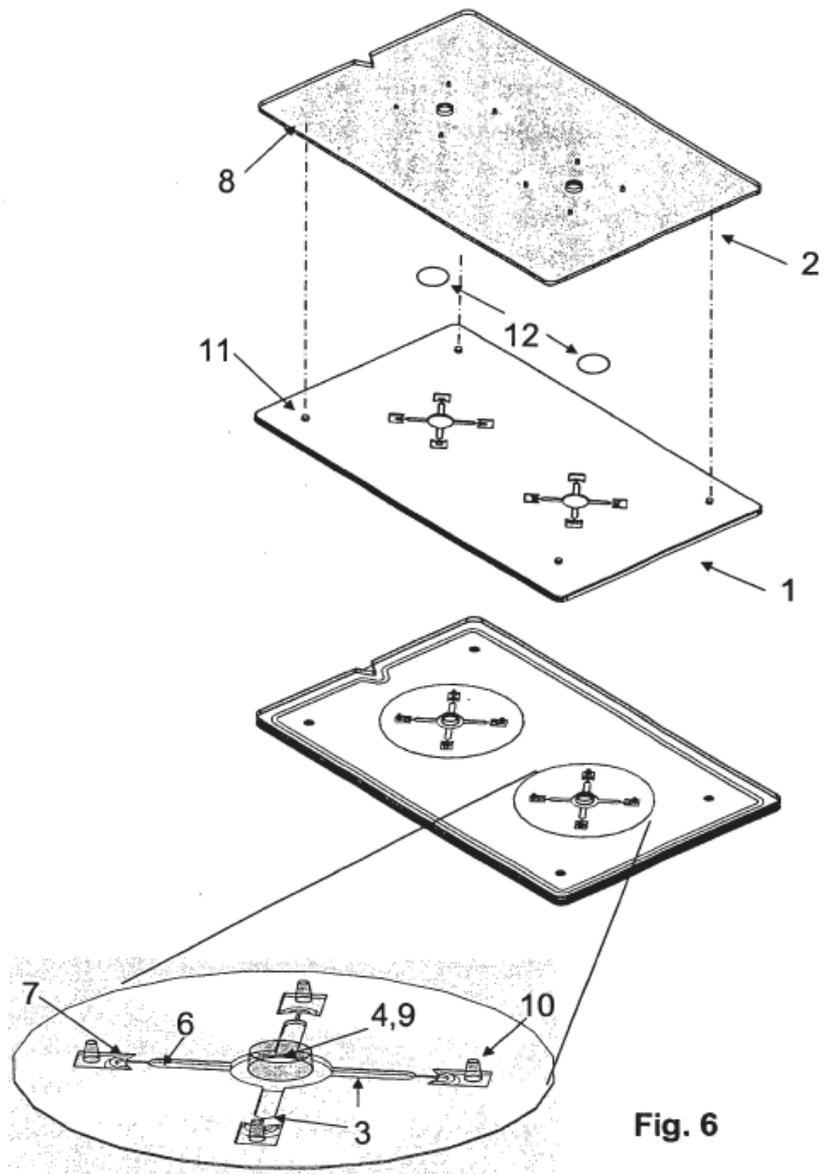


Fig. 6

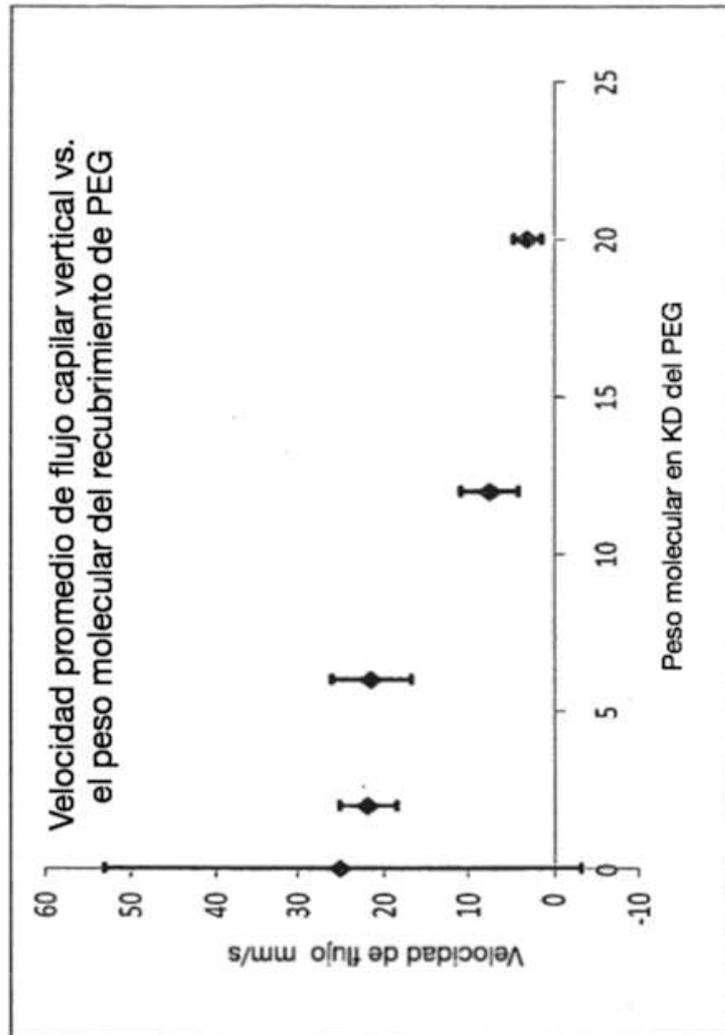


Fig. 7