

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 406**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2006 E 06701713 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 1843850**

54 Título: **Dispositivo capilar de flujo lateral de reacción multietapa**

30 Prioridad:

31.01.2005 US 647774 P

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

04.03.2016

73 Titular/es:

**REALBIO TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)
259 HAELA STREET
76875 KFAR-HANAGID, IL**

72 Inventor/es:

**ALAJEM, SARA y
REINHARTZ, AVRAHAM**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 562 406 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo capilar de flujo lateral de reacción multietapa

Campo y antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la biología y detección de analitos de fluidos biológicos y medioambientales, principalmente en puntos de atención más particularmente, a un dispositivo capilar de flujo lateral, por ejemplo, para realizar ensayos de unión específica.

10 El uso de ensayos de unión específica es de gran valor en varias aplicaciones clínicas y otras aplicaciones, véase por ejemplo, la solicitud de patente PCT US2004/031220 publicada como WO 2005/031335. Los ensayos de unión específica implican la detección y preferentemente la determinación cuantitativa de un analito en una muestra en la que el analito es un miembro de un par de unión específica que consiste en un ligando y un receptor. El ligando y el receptor que constituyen un par de unión específica están relacionados por el hecho de que el receptor y el ligando se unen mutua y específicamente. Los ensayos de unión específica incluyen ensayos inmunológicos que implican reacciones entre anticuerpos y antígenos, reacciones de hibridación de ADN y ARN, y otras reacciones de unión específica tales como las que implican hormonas y otros receptores biológicos. Los ensayos de unión específica se pueden practicar según varios métodos conocidos en la técnica. Tales ensayos incluyen ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich "directos" e "indirectos" como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 4.861.711; patente de EE.UU. No. 5.120.643; patente de EE.UU. No. 4.855.240 o documento EP 284.232.

20 Debido a que el complejo formado de o por una reacción de unión específica generalmente no es directamente observable se han ideado varias técnicas para marcar un miembro del par de unión específica para que se pueda observar la reacción de unión. Los marcadores conocidos incluyen radiomarcadores, cromóforos y fluoróforos y enzimas cuya presencia se puede detectar por medio de detectores de radiación, espectrofotómetros o a simple vista. Cuando se marca un miembro de un par de unión específica con un marcador enzimático, se puede detectar un complejo por la activación enzimática de un sistema de reacción que incluye un grupo substrato/cofactor que genera una señal en el que un compuesto tal como un colorante se activa para producir una señal detectable.

25 Los dispositivos capilares de flujo lateral, tales como el dispositivo 10 capilar de flujo lateral representado en la Figura 1, son bien conocidos en los campos de análisis y detección y se usan a menudo para la implementación rápida y simple de un ensayo de unión específica de analito en una muestra 12 líquida. La muestra 12 se coloca en el dispositivo 10 capilar de flujo lateral a través de un depósito 14 para entrar en contacto con una zona 16 de recepción del líquido de una matriz 18 de flujo capilar absorbente. La zona 16 de recepción incluye un reactivo marcado soluble configurado para unirse al analito que está presente en la muestra 12. La muestra 12 que incluye el analito unido al reactivo marcado, migra por flujo capilar para llenar toda la matriz 18 de flujo capilar y para migrar adicionalmente a un drenaje 23 de líquido. Durante el flujo capilar de la muestra 12 de la zona 16 de recepción del líquido hacia el drenaje 23 de líquido, la muestra 12 pasa por la zona 20 de reacción que es observable a través de una ventana 22 de observación. La zona 20 de reacción comprende un anti-analito que junto con el analito constituye un par de unión específica. El analito en la muestra 20 forma un complejo con el anti-analito y de este modo es capturado en la zona 20 de reacción. A medida que el reactivo marcado se une al analito, y a medida que el analito se concentra en la zona 20 de reacción, se produce una señal observable en la zona 20 de reacción, en la que la intensidad de la señal observable se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.

40 Los dispositivos capilares de flujo lateral tales como el dispositivo 10 son extremadamente útiles ya que estos son fáciles de utilizar incluso por una persona no experta o en condiciones no de laboratorio y son relativamente baratos de producir.

45 Un inconveniente de los dispositivos capilares de flujo lateral conocidos tales como el dispositivo 10 es que una muestra se extiende uniformemente en todas las direcciones hasta que encuentra un borde para fluir capilarmente, tal como un borde de la matriz de flujo capilar. De este modo, la muestra y cualquier analito en ella se distribuyen dentro de todo el volumen de la matriz de flujo capilar y se desperdician. Sería ventajoso ser capaces de permitir el transporte de toda la muestra añadida a una matriz de flujo capilar a la vecindad de una respectiva zona de reacción.

50 Un inconveniente adicional de los dispositivos capilares de flujo lateral conocidos es que estos no están configurados para reacciones multietapa. Para realizar un ensayo de unión multietapa usando un dispositivo capilar de flujo lateral tal como el dispositivo 10, se añaden reactivos líquidos en serie. Por ejemplo, se proporciona un dispositivo 10 en el que una zona 16 de recepción de líquido no incluye un reactivo marcado.

Primero, se añade una muestra 12 que incluye analito por medio del depósito 14, pasa a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 16 de recepción de líquido y se transporta por flujo capilar al drenaje 23. Cuando la muestra 12 pasa a través de la zona 20 de reacción, el analito en la muestra 20 forma un complejo con el anti-analito localizado en la zona de reacción y de este modo es capturado en la zona 20 de reacción.

55 Cuando toda la muestra 12 se ha drenado a la matriz 18 de flujo capilar, se añade un primer líquido reactivo que contiene un reactivo marcado configurado para unirse al analito a través del depósito 14, pasa a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 16 de recepción de líquido y se transporta por flujo capilar al drenaje 23. Cuando el primer

líquido reactivo pasa a través de la zona 20 de reacción, el reactivo marcado en el primer líquido reactivo se une al analito capturado en la zona de reacción.

5 Cuando el reactivo marcado incluye una enzima, entonces cuando todo el primer líquido reactivo se ha drenado a la matriz 18 de flujo capilar, se añade un segundo líquido reactivo que contiene un sustrato de enzima a través del depósito 14, pasa a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 16 de recepción de líquido y se transporta por flujo capilar al drenaje 23. Cuando el segundo líquido reactivo pasa a la zona 20 de reacción, el sustrato enzimático en él reacciona con el marcador enzimático, produciendo una fuerte señal observable en la zona 20 de reacción, en la que la intensidad de la señal observable está relacionada con la cantidad de analito en la muestra.

10 Es sabido que los ensayos de unión multietapa son significativamente más sensibles y precisos que los ensayos de unión de una sola etapa. De este modo, hay un deseo de realizar ensayos de unión multietapa como se describe anteriormente. Está claro, sin embargo, que es muy difícil si no imposible conseguir resultados precisos y repetibles para tal procedimiento complejo sin el uso de un caro sistema robótico situado en un laboratorio. Incluso con el uso de un sistema robótico, dado que cada líquido sucesivo se añade sobre una zona 16 de recepción de líquido ya húmeda con un líquido precedente, la mezcla de los dos líquidos ocurre invariablemente, lo que conduce a un resultado impredecible, que afecta adversamente a la duración de una etapa dada, evitando la realización de una reacción verdaderamente secuencial, y afectando a la repetitividad y precisión.

15 En la patente de EE.UU. No. 5.198.193 se enseña un dispositivo de flujo capilar con múltiples caminos capilares que conducen a una sola zona de reacción, teniendo cada camino una longitud diferente y/o una válvula para permitir la variación del tiempo de llegada de un líquido a la zona de reacción. Tal dispositivo no es efectivo ya que en cada intersección de caminos capilares que incluyen dos líquidos diferentes, se producen flujos paralelos, análogos a los producidos cuando se añade líquido sucesivamente sobre una matriz de flujo capilar ya húmeda como se discute anteriormente.

Además, las válvulas descritas en tal dispositivo capilar de flujo lateral son difíciles de fabricar.

25 En la patente europea No. EP 1044372 se enseña un dispositivo capilar de flujo lateral en el que se añade la muestra y líquidos reactivos a dos o más posiciones adyacentes junto con una matriz de flujo capilar que es substancialmente una tira de material absorbente, por ejemplo, nitrocelulosa soportada con poliéster de tamaño de poro de 8 micrómetros. Se colocan N+1 separadores estrechos (por ejemplo, 1 mm), se colocan tiras hidrófobas impermeables de material (cinta adhesiva de mylar o poliéster) perpendicularmente a la dirección de flujo para definir N zonas anchas (por ejemplo, 5 mm) de recepción de líquido aguas arriba de una zona de reacción localizada aguas arriba de un drenaje de líquido. Cuando se añaden líquidos simultáneamente a las zonas de recepción de líquido una porción de cada líquido se absorbe a través de la superficie superior de la matriz de flujo capilar en la zona de recepción de líquido. El líquido que no se absorbe inmediatamente permanece en forma de gotas sobre la superficie de una zona respectiva de recepción de líquido, en la que las gotas adyacentes se previene que se mezclen o fluyan a lo largo de la superficie de la matriz de flujo capilar por los separadores. En los casos en los que los líquidos se añaden simultáneamente se forma una interfase entre los dos líquidos en el volumen de la matriz debajo del separador, mientras que queda líquido en exceso sobre la superficie de una zona de recepción de líquido. El líquido de una primera, la más aguas abajo, zona de recepción de líquido, se transporta aguas abajo por flujo capilar pasada la zona de reacción hasta el drenaje de líquido. Cuando todo el líquido en la primera zona de recepción de líquido se agota, la segunda zona de recepción de líquido se transporta aguas abajo por flujo capilar pasada la zona de reacción hasta el drenaje de líquido.

Aparentemente las enseñanzas del documento EP 1044372 proporcionan la capacidad de realizar reacciones multietapa usando un dispositivo capilar de flujo lateral, pero en la práctica las enseñanzas están severamente limitadas por limitaciones impuestas por la estructura del dispositivo capilar de flujo lateral.

45 Una primera limitación es que la cantidad de líquido añadido a una zona de recepción de líquido es limitada. El líquido se añade en forma de una gota que descansa sobre una zona de recepción de líquido. Si la tensión superficial del líquido es insuficiente, por ejemplo, debido al tamaño o debido a detergentes en el líquido, si la matriz de flujo capilar es muy hidrófila o si el dispositivo capilar de flujo lateral se perturba, la gota se colapsa y se derrama del dispositivo capilar de flujo lateral.

50 Una segunda limitación es que los líquidos se deben añadir simultáneamente. Si los líquidos se añaden no simultáneamente, un líquido añadido a una primera zona de recepción de líquido fluye a una segunda zona adyacente de recepción de líquido. Cuando se añade un segundo líquido a la segunda zona de recepción de líquido, el segundo líquido fluye a un volumen de la matriz desde la parte superior a través de partes secas de la segunda zona de recepción de líquido mientras que el segundo líquido fluye dentro del mismo volumen lateralmente. Los dos líquidos se mezclan, y como se discutió anteriormente, conduce a resultados impredecibles, afecta adversamente a la duración de una etapa dada, previene la realización de una verdadera reacción secuencial, y afecta tanto a la repetitividad como a la precisión de los resultados.

Una tercera limitación es que las enseñanzas del documento EP 1044372 pueden conducir a la formación de caminos capilares múltiples. Como se señaló anteriormente, un separador es una tira de material suave unida

usando adhesivo a la superficie superior de la matriz que tiene características de escala micrométrica. Como resultado, se forman caminos capilares en el espacio entre un separador y la matriz de flujo capilar a través de los cuales se pueden mezclar dos líquidos en zonas de recepción de líquido adyacentes y como se discutió anteriormente, conduce a un resultado impredecible, afecta negativamente a la duración de una etapa dada, previene la realización de una reacción verdaderamente secuencial, y afecta tanto a la repetitividad como a la precisión de los resultados.

Una desventaja adicional de las enseñanzas del documento EP 1044372 es la dependencia de los adhesivos para fijar los separadores a la matriz de flujo capilar. En la técnica se sabe que los adhesivos, especialmente adhesivos no polimerizantes, son atraídos y con el tiempo migran a materiales absorbentes tales como nitrocelulosa que son apropiados para su uso como matrices de flujo capilar (véase, por ejemplo, Kevin Jones; Anne Hopkins, effect of adhesive migration in lateral flow assays; IVD Technology, September 2000). De este modo, después de un período de almacenamiento, el adhesivo que fija un separador a una matriz de flujo capilar de un dispositivo realizado según las enseñanzas del documento EP 1044372 migraría a los poros de la matriz de flujo capilar en la región en la que se va a formar la interfase líquido-líquido. La presencia de un adhesivo hidrófobo en la matriz bloquea los poros o modifica las propiedades capilares de los poros de modo que una interfase formada entre los líquidos es indefinida y no clara, lo que conduce a la mezcla de los dos líquidos de la interfase y a los efectos negativos concomitantes. Otra desventaja de usar adhesivos es el posible desprendimiento de los separadores de la matriz durante el almacenamiento prolongado.

En la patente de EE.UU. No. 4.981.786 se enseña un dispositivo capilar de flujo lateral con dos depósitos. La provisión de un dispositivo capilar de flujo lateral con dos o más depósitos permite la adición de dos o más líquidos sucesivos sin contaminación mutua: una vez que se ha añadido un líquido a un primer depósito, los restos de líquido permanecen en las paredes del depósito. Cualquier líquido añadido a través del mismo depósito se contaminará con los restos. En un primer dispositivo capilar de flujo lateral que se enseña en la Patente de EE.UU. No. 4.981.786, dos o tres depósitos distintos están en comunicación de fluido con una matriz de flujo capilar por medio de zonas de recepción de líquido distintas y separadas físicamente. Situada en una de las zonas de recepción de líquido está una zona de reacción que incluye un reactivo de captura. Un drenaje de líquido está en comunicación capilar con la matriz de flujo capilar aguas abajo de los dos depósitos. Aunque no está del todo claro en la descripción, se entiende que el uso del primer dispositivo capilar de flujo lateral incluye añadir un pequeño volumen de muestra a través de un depósito para proporcionar un punto de muestra a la zona de reacción en la matriz de flujo capilar y subsecuentemente para añadir uno o más reactivos, cada reactivo a través de un depósito diferente.

En un segundo dispositivo capilar de flujo lateral que se enseña en la Patente de EE.UU. No. 4.981.786, dos depósitos distintos están en comunicación de fluido con una matriz de flujo capilar por medio de zonas de recepción de líquido distintas y separadas físicamente. En comunicación capilar con el borde aguas arriba de la matriz de flujo capilar está un depósito de líquido que se puede activar para liberar un líquido reactivo que subsecuentemente migra aguas abajo. Una zona de reacción está situada aguas abajo de los dos depósitos. Un drenaje de líquido está en comunicación capilar con la matriz de flujo capilar aguas abajo de la zona de reacción.

En ambos dispositivos capilares de flujo lateral se enseñan varias características estructurales para mantener una matriz de flujo capilar en su lugar pero hacer solo un mínimo contacto con ellos. Además, se observa que hay poco o ningún contacto entre los depósitos y la matriz de flujo capilar en una respectiva zona de recepción de líquido, y si hay contacto es solo un ligero contacto que es el resultado de la expansión de la matriz de flujo capilar al humedecerse. Tales características excluyen el uso de los dispositivos capilares de flujo lateral como dispositivos efectivos para reacciones multietapa de una manera análoga a la descrita en el documento EP 1044372. Cuando se añade un primer líquido a un primer depósito y, simultáneamente, se añade un segundo líquido a un segundo depósito adyacente aguas arriba, el primer y segundo líquidos ambos fluyen dentro de la matriz de flujo capilar a través de una respectiva zona de recepción de líquido. Cuando se juntan los dos líquidos, se forma una interfase y el primer líquido empieza a fluir aguas abajo. Incontrolablemente, comienza a gotear líquido de la matriz de flujo capilar en cualquier punto en el que exista un camino capilar alternativo, por ejemplo, por las estructuras de apoyo sobre las que descansa la matriz de flujo capilar o a lo largo de las paredes dispuestas lateralmente que mantienen la matriz de flujo capilar en su lugar. También asciende líquido por cualquier objeto en contacto con la superficie superior de la matriz de flujo capilar, por ejemplo, cuando un depósito entra en contacto con la matriz de flujo capilar. Como resultado, se fuga líquido de todas las zonas de recepción de líquido a través de cualquier camino capilar alternativo, llenando el dispositivo capilar de flujo lateral con líquido y convirtiendo en inservibles los resultados de un experimento.

Sería muy ventajoso tener un dispositivo capilar de flujo lateral o métodos para usar dispositivos capilares de flujo lateral para la realización de reacciones multietapa en los campos de la biología y la medicina, particularmente para el diagnóstico que no tengan por lo menos algunas de las desventajas de la técnica anterior.

Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención tratan con éxito por lo menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior proporcionando un dispositivo capilar de flujo lateral y un método que incluye el uso de un dispositivo capilar de flujo lateral que permite la realización de reacciones multietapa. Las realizaciones de la presente invención

permiten la realización de reacciones multietapa tales como ensayos de unión multietapa con precisión y repetitivamente incluso en condiciones no de laboratorio e incluso por operarios menos expertos.

Según las enseñanzas de la presente invención se proporciona un dispositivo capilar de flujo lateral que comprende:

- 5 a) una matriz de flujo capilar absorbente de un solo camino que tiene un extremo aguas arriba y un extremo aguas abajo que definen una dirección de flujo, siendo dicha matriz compresible;
- b) por lo menos dos depósitos que incluyen un primer depósito aguas arriba y un segundo depósito aguas abajo en comunicación de fluido con dicha matriz de flujo capilar cada uno a través de sus respectivas primera y segunda zona de recepción de líquido, estando situados los depósitos entre los extremos y separados entre sí en la dirección de flujo definida por la matriz capilar;
- 10 cada uno de dicho primer y segundo depósito está en contacto con sus respectivas zonas de recepción de líquido, por medio de una abertura que constituye un conducto hueco que tiene un borde. Caracterizado por el hecho de que:
- dicho borde está presionando dicha matriz,
- en el que los bordes están presionados dentro de dicha matriz cuando la matriz está seca;
- 15 en el que una porción de dicha matriz de flujo capilar entre dichos dos bordes es una zona de creación de interfase;
- y
- en el que el dispositivo es apropiado para un drenaje secuencial de dichos depósitos en la dirección aguas abajo.
- En realizaciones de la invención, dicha matriz comprende fibras de vidrio y dichos capilares están comprendidos en espacios entre las fibras.
- 20 En realizaciones de la invención el dispositivo de la reivindicación 2, dicha matriz comprende fibras de vidrio.
- En realizaciones de la invención dicha presión aplicada por dichos bordes a la matriz de flujo capilar comprime la matriz y reduce el área superficial/volumen a no más del 40% del grosor.
- En realizaciones de la invención, en frente de cada uno de dichos bordes está dispuesto un componente de soporte que soporta dicha matriz contra dicha presión.
- 25 En realizaciones de la invención dicha matriz está suspendida entre dichos bordes y dichos componentes de soporte.
- En realizaciones de la invención dicha matriz está unida a un soporte impermeable.
- En realizaciones de la invención, dicho soporte impermeable está en contacto con por lo menos un componente de soporte que soporta dicho soporte impermeable contra dicha presión.
- 30 En realizaciones de la invención, en frente de cada uno de dichos bordes está dispuesto un componente de dicho soporte que soporta dicha matriz contra dicha presión.
- En realizaciones de la invención, el dispositivo comprende, aguas abajo de por lo menos una dicha zona de recepción de líquido, una zona de reacción que comprende por lo menos una entidad de captura configurada para capturar un material que fluye a través de dicha matriz de flujo capilar.
- 35 En realizaciones de la invención, el dispositivo comprende, un drenaje de líquido en comunicación de fluido con dicha matriz de flujo capilar aguas abajo de la zona de reacción.
- En realizaciones de la invención, dicha comunicación de fluido a través de dichas zonas de recepción de líquido es una comunicación de fluido no capilar.
- 40 En realizaciones de la invención, dicha zona de creación de interfase tiene una longitud de por lo menos 50% de una dimensión de dicha zona de recepción de líquido en dicha dirección de flujo.
- En realizaciones de la invención, la expansión inducida por líquido de dicha zona de creación de interfase no está restringida.
- En realizaciones de la invención, el dispositivo comprende adicionalmente una carcasa que contiene dicha matriz de flujo capilar.
- 45 En realizaciones de la invención, los lados de dicha matriz de flujo capilar no tienen contacto con dicha carcasa.

Se proporciona adicionalmente según la invención, un kit para el montaje de un dispositivo capilar de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:

a) una matriz de flujo capilar absorbente de un solo camino que tiene un grosor; y por lo menos dos dispositivos que tienen b) y c):

5 b) un primer componente, que incluye un depósito con por lo menos una pared configurada para mantener líquidos y un área inferior, dicha área inferior definida por un conducto hueco no capilar con un borde y por lo menos una extensión que sobresale de una superficie exterior de dicha pared; y

10 c) un segundo componente, que incluye un cuerpo con una plataforma contra-soporte en un extremo superior y por lo menos una extensión que sobresale de dicho cuerpo en el que una dicha extensión de dicho primer componente y una dicha extensión de dicho segundo componente están configuradas para acoplarse mutuamente de modo que dicho borde y dicha plataforma contra-soporte están separadas por una distancia y son sustancialmente paralelas, en el que dicha distancia es suficiente de modo que un dicho borde presiona sobre dicha matriz cuando está seca cuando dichos dos componentes están acoplados alrededor de dicha matriz.

En realizaciones del kit de la invención, dicha matriz está unida a un refuerzo impermeable.

15 En una realización del kit de la invención dicha matriz de flujo capilar comprende adicionalmente una zona de reacción que comprende por lo menos una entidad de captura configurada para capturar material que fluye a través de dicha matriz de flujo capilar.

Breve descripción de los dibujos

20 La invención se describe aquí, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se insiste en que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención únicamente, y se presentan en pro de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la invención.

25 En los dibujos:

La FIG. 1 (técnica anterior) representa un dispositivo capilar de flujo lateral de un depósito;

La FIG. 2 representa esquemáticamente una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención que incluye tres depósitos de líquido y una matriz de flujo capilar sin un soporte, en corte transversal;

30 La FIG. 3 representa esquemáticamente la formación de columnas verticales de líquido en un dispositivo capilar de flujo lateral según el método de la presente invención;

La FIG. 4 representa esquemáticamente una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención, que incluye cuatro depósitos de líquido y una matriz de flujo capilar con un soporte, en corte transversal;

La FIG. 5A representa esquemáticamente una realización de un dispositivo de la presente invención útil para preparar un dispositivo capilar de flujo lateral;

35 La FIG. 5B representa esquemáticamente una vista superior de un dispositivo capilar de flujo lateral hecho de un kit montado de la presente invención que incluye dos dispositivos de la figura 5A y una matriz de flujo capilar de fibra de vidrio soportada por plástico;

40 La FIG. 5C representa esquemáticamente una vista lateral de un dispositivo capilar de flujo lateral hecho de un kit montado de la presente invención que incluye dos dispositivos de la figura 5A y matriz de flujo capilar de fibra de vidrio soportada por plástico;

La FIG. 6A representa esquemáticamente una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención, despiezado en sección transversal para mostrar los componentes;

La FIG. 6B representa esquemáticamente una matriz de flujo capilar del dispositivo capilar de flujo lateral de la figura 6A;

45 La FIG. 6C es una representación esquemática del dispositivo capilar de flujo lateral de la Figura 6A, montado en corte transversal;

Las Figs. 7 son resultados del experimento 2, descrito a continuación, la detección de un analito según las enseñanzas de la presente invención;

50 Las Figs. 8 son resultados del experimento 3 descrito a continuación, comparando la detección de un analito según las enseñanzas de la presente invención (8A y 8B) y usando un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito

(8C y 8D);

La FIG. 9 son resultados del experimento 4 descrito a continuación, una curva de calibración para el ensayo de competición de 11-deshidro-TxB2 obtenida según las enseñanzas de la presente invención; y

5 La FIG. 10 son resultados del experimento 10 descrito a continuación, que muestran la correlación entre la intensidad de fluorescencia emitida por una zona de reacción de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención y el volumen total de líquido añadido.

Realizaciones preferidas de la invención

10 La presente invención es de un dispositivo capilar de flujo lateral y métodos de usar el dispositivo capilar de flujo lateral. La presente invención permite la realización de reacciones multietapa efectivas y repetibles tales como ensayos de unión específica multietapa, por ejemplo, para pruebas serológicas.

15 En la descripción, las realizaciones se refieren a un método analítico para la detección de un analito que es un biomarcador tal como un antígeno, anticuerpo, metabolito, material tóxico u otro material detectable de un ser humano u otra fuente viva, tales como sangre, orina, tejido, o de una fuente no viva, tal como una fuente medioambiental como agua, suelo o aguas residuales. En la descripción, las realizaciones se refieren a unir el analito a un anti-analito inmovilizado en una zona de reacción en la matriz de flujo capilar que junto con el analito constituye un par de unión específica tal como un anticuerpo, antígeno, ADN u otro miembro de par de unión específica (sbp) y que el analito unido es detectado a continuación directamente o por medio de un reactivo marcado que produce una señal detectable o que produce una señal detectable después de haber sido expuesto a un tercer reactivo que reacciona con el reactivo marcado y produce una señal detectable que se puede visualizar o medir, por medio de un instrumento de lectura.

20 Los principios, usos e implementaciones de las enseñanzas de la presente invención se pueden comprender mejor con referencia a la descripción, figuras y ejemplos adjuntos, cuya lectura cuidadosa permite a un experto en la técnica implementar las enseñanzas de la presente invención sin excesivo esfuerzo o experimentación. En las figuras, los números de referencia similares se refieren a partes similares en todas ellas.

25 Antes de explicar por lo menos una realización de la invención en detalle, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles establecidos aquí. La invención se puede implementar con otras realizaciones y se puede practicar o llevar a cabo de varias maneras. También se entiende que la fraseología y terminología empleada aquí es para fines descriptivos y no se debe considerar limitante.

30 En general, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de los campos de la biología, ingeniería de diagnóstico, ciencia de materiales y física. Tales técnicas están meticulosamente explicadas en la bibliografía.

35 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona de experiencia media en la técnica a la que pertenece la invención. Además, las descripciones, materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes. Se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención.

40 Tal como se usan aquí, los términos "que comprende" y "que incluye" o sus variantes gramaticales se deben tomar como que especifican las características, números enteros, etapas o componentes citados, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos. Este término abarca los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

45 La frase "que consiste esencialmente en" o sus variantes gramaticales cuando se usa aquí se debe tomar como especificar las características, números enteros, etapas o componentes citados, pero no excluye la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos, pero sólo si las adicionales características, números enteros, etapas, componentes o sus grupos no alteran materialmente las nuevas y básicas características de la composición, dispositivo o método reivindicado.

50 El término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluyen, pero no se limitan a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas pertinentes. La implementación de los métodos de la presente invención implica realizar o completar tareas o etapas seleccionadas manualmente, automáticamente, o una de sus combinaciones.

55 Aquí, el término "analito" se refiere al compuesto o composición a detectar o analizar cuantitativamente y que tiene por lo menos un epítipo o sitio de unión. Un analito puede ser cualquier substancia para la que existe un miembro de unión específica al analito de origen natural o para el que se puede preparar un miembro de unión específica del analito, por ejemplo, carbohidrato y lectina, hormona y receptor, ácidos nucleicos complementarios, y similares. Además, los posibles analitos incluyen virtualmente cualquier compuesto, composición, agregación, u otra

substancia que se puede detectar inmunológicamente. Es decir, el analito, o una de sus porciones, será antigénico o hapténico que tiene por lo menos un sitio determinante, o será un miembro de un par de unión de origen natural.

5 Los analitos incluyen, pero no están limitados a, toxinas, compuestos orgánicos, proteínas, péptidos, microorganismos, bacterias, virus, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, hormonas, esteroides, vitaminas, fármacos (incluyendo los administrados con fines terapéuticos así como aquellos administrados con fines ilícitos), contaminantes, pesticidas y metabolitos o anticuerpos para cualquiera de las sustancias anteriores.

Generalmente un analito se encuentra en una "muestra" y las enseñanzas de la presente invención se aplican a la muestra para determinar la presencia de o una cantidad de analito presente en una muestra.

10 Aquí el término "muestra" se refiere a cualquier cosa que pueda contener un analito para la que se desea un ensayo de analito. La muestra puede ser una muestra biológica, tal como un fluido biológico o un tejido biológico. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco, líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son agregados de células, normalmente de un tipo particular junto con su sustancia intercelular que forman uno de los materiales estructurales de un ser humano, animal, vegetal, estructura bacteriana, fúngica o viral, incluyendo tejidos conjuntivo, epitelial, muscular y nervioso. Los ejemplos de tejidos biológicos también incluyen órganos, tumores, ganglios linfáticos, arterias y células individuales. Además, un material sólido sospechoso de contener el analito se puede utilizar como muestra de ensayo una vez que se modifica para formar un medio líquido o para liberar el analito. El pretratamiento puede implicar preparar plasma a partir de sangre, diluir fluidos viscosos, y similares. Los métodos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, separación, concentración, inactivación de componentes que interfieren, y la adición de reactivos. Además de fluidos fisiológicos, se pueden usar otras muestras tales como agua, productos alimenticios, extractos de suelo, y similares, para la realización de ensayos industriales, medioambientales, o de producción de alimentos, así como ensayos de diagnóstico. La selección y pretratamiento de muestras biológicas, industriales y medioambientales antes del ensayo se conoce bien en la técnica y no necesita ser descrita adicionalmente.

25 Tal como se usa aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a la especificidad de unión de un "miembro de par de unión específica", que es un miembro de un par de unión específica, es decir, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une específicamente con la segunda molécula por medios químicos o físicos. Las dos moléculas están relacionadas en el sentido de que su unión entre sí es tal que son capaces de distinguir a su pareja de unión de otros constituyentes de ensayo que tienen características similares. Los miembros del par de unión específica se denominan ligando y receptor (anti ligando), miembro del sbp y pareja del sbp, y similares. Una molécula también puede ser un miembro de un sbp para una agregación de moléculas; por ejemplo, un anticuerpo generado contra un complejo inmune de un segundo anticuerpo y su antígeno correspondiente se puede considerar que son un miembro de sbp para el complejo inmune.

35 Además de los miembros de par de unión específica antígeno y anticuerpo, otros pares de unión específica incluyen, como ejemplos sin limitación, biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótido complementarias, secuencias peptídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, una secuencia peptídica y un anticuerpo específico para la secuencia o la proteína completa, ácidos y bases poliméricos, colorantes y aglomerantes proteínicos, péptidos y aglomerantes proteínicos específicos (por ejemplo, ribonucleasa, S-péptido y ribonucleasa S-proteína), metales y sus quelantes, y similares. Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos al miembro de unión específica original, por ejemplo, un análogo de analito o un miembro de unión específica preparado por técnicas recombinantes o ingeniería molecular.

45 Un miembro de sbp es análogo a otro miembro de sbp si ambos son capaces de unirse a otro miembro de sbp complementario idéntico. Tal miembro de sbp puede ser, por ejemplo, un ligando o un receptor que ha sido modificado por la sustitución de por lo menos un átomo de hidrógeno por un grupo para proporcionar, por ejemplo, un ligando marcado o receptor marcado. Los miembros de sbp pueden ser análogos a o complementarios del analito o de un miembro de sbp que es complementario del analito. Si el miembro de unión específica es un inmunorreactivo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, antígeno, hapteno, o uno de sus complejos. Si se usa un anticuerpo, puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, una proteína o anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, o una de sus mezclas o fragmentos, así como una mezcla de un anticuerpo y otros miembros de unión específica. Los detalles de la preparación de tales anticuerpos y su idoneidad para el uso como miembros de unión específica son conocidos por los expertos en la técnica.

55 "Reactivo marcado" se refiere a una sustancia que comprende un marcador detectable unido con un miembro de unión específica. La unión puede ser enlace covalente o no covalente, pero el método de unión no es crítico para la presente invención. El marcador permite que el reactivo marcador produzca una señal detectable que se relaciona con la presencia del analito en la muestra. El componente del miembro de unión específica del reactivo marcador se selecciona para unirse directamente al analito o para unirse indirectamente al analito por medio de un miembro de unión específica auxiliar, que se describe con mayor detalle aquí a continuación.

Además, el miembro de unión específica puede ser marcado antes o durante, la realización del ensayo por medio de

un método de unión apropiado.

"Marcador" se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales. Varios marcadores apropiados para su uso en la presente invención incluyen marcadores que producen señales por medio de medios químicos o físicos. Tales marcadores pueden incluir enzimas, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y marcadores radiactivos. Otros marcadores apropiados incluyen marcadores en partículas tales como partículas metálicas coloidales tales como oro, partículas no metálicas coloidales tales como partículas de selenio, partículas teñidas o coloreadas tales como plástico coloreado o un microorganismo teñido, partículas de látex poliméricas orgánicas y liposomas, partículas coloreadas, microcápsulas poliméricas, sacos, eritrocitos, eritrocitos fantasmas, u otras vesículas que contienen sustancias directamente visibles, y similares. Típicamente, un marcador visualmente detectable se usa como componente marcador del reactivo marcador, proporcionando por ello la lectura directa visual o instrumental de la presencia o cantidad del analito en la muestra de ensayo sin la necesidad de componentes que producen señal adicional en los sitios de detección.

La selección de un marcador particular no es crítica para la presente invención, pero el marcador será capaz de generar una señal detectable por sí misma, o ser instrumentalmente detectable, o ser detectable en conjunción con uno o más componentes que producen señales adicionales.

Se pueden formar varios reactivos marcadores diferentes variando el marcador o el componente del miembro de unión específica del reactivo marcador; se apreciará por un experto en la técnica que la elección implica la consideración del analito a detectar y los medios deseados de detección. Como se discute a continuación, también se puede incorporar un marcador usado en un sistema de control para el ensayo.

Por ejemplo, uno o más componentes que producen señal se pueden hacer reaccionar con el marcador para generar una señal detectable. Si el marcador es una enzima, entonces la amplificación de la señal detectable se obtiene haciendo reaccionar la enzima con uno o más sustratos o enzimas y sustratos adicionales para producir un producto de reacción detectable.

Las enzimas marcadas usadas en el campo incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y ureasa.

En un sistema de producción de señales alternativo, el marcador puede ser un compuesto fluorescente en el que no se requiera manipulación enzimática del marcador para producir la señal detectable. Las moléculas fluorescentes incluyen, por ejemplo, fluoresceína, ficobiliproteína, rodamina y sus derivados y análogos son apropiados para uso como marcadores en tal sistema.

El uso de colorantes para la tinción de materiales biológicos, tales como proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, y organismos completos está documentado en la bibliografía. Se sabe que ciertos colorantes tiñen materiales particulares preferentemente sobre la base de las químicas compatibles de colorante y ligando. Por ejemplo, azul de Coomassie y azul de metileno para proteínas, reactivo de Schiffs-ácido periódico para carbohidratos, cristal de violeta, SafraninO y azul de Tripán para tinciones de células enteras, bromuro de etidio y naranja de acridina

"Componente que produce señal" se refiere a cualquier sustancia capaz de reaccionar directa o indirectamente con el reactivo marcado para producir la señal que es detectable por medio visual o instrumental. El componente puede ser sustrato catalizado por la enzima marcada o colorantes que pueden reaccionar químicamente con el reactivo de marca (dsDNA/naranja de acridina), sustrato de enzimas tal como: BCIP/NBT; Fosfato de Azonaftol; 3-AEC; 4-chloronaftilol; sal de tetrazolio/PMS; Urea/indicadores de pH.

En realizaciones de la presente invención, una matriz de flujo capilar incluye por lo menos una zona de reacción. Una zona de reacción es una región o volumen de la matriz que comprende por lo menos una entidad de captura configurada para capturar un material que fluye a través de la matriz de flujo capilar en regiones definidas para la realización de la reacción de ensayo que incluye una línea de ensayo y una línea de control. Una "línea de ensayo" es la región en la zona de reacción, en la que se realiza el ensayo analítico. La región comprende miembro de par de unión específica (sbp) que está inmovilizado a la matriz del camino capilar. El miembro de sbp puede ser un anticuerpo o antígeno ácido nucleico o sus modificaciones. Puede ser proteínas como avidina y sus derivados o sacáridos tales como lectinas. Que son parte del par de unión que es capaz de unirse directa o indirectamente al analito de interés. Varias líneas de ensayo pueden estar en la zona de reacción cada una de un par de unión específica distinto para diferentes analitos. Una "línea de control" es la región en la zona de reacción, en la que se realiza una reacción para confirmar la validez del ensayo; la línea de control también puede ser una línea de calibración o líneas para la corrección de las señales (resultados) de ensayo obtenidas en la línea de ensayo. La línea de control comprende un miembro de spb inmovilizado con capacidades de unión a uno o más de los reactivos que participan en la reacción o compuestos existentes en la muestra.

En la presente invención, una matriz de flujo capilar es absorbente, es decir comprende un material absorbente, poroso u otro material formado de cavidades que permite el transporte capilar de líquidos a su través, es decir, los poros definen un sistema continuo de canales de flujo capilar. En general, para los líquidos acuosos el transporte capilar requiere un camino continuo de poros de menos de alrededor de 2 mm de tamaño, generalmente en el

intervalo de 0,05 micrómetros a 100 micrómetros. Como se describe aquí, una matriz de flujo capilar apropiada es sustancialmente compresible, es decir, conserva la integridad estructural y no se rompe bajo la presión aplicada que conduce a una reducción de volumen, por ejemplo, la presión aplicada por los bordes del depósito. En realizaciones, la presión aplicada a una matriz de flujo capilar perpendicularmente por un borde del depósito comprime la matriz de flujo capilar hasta sustancialmente la misma medida por toda la altura de la matriz de flujo capilar. En realizaciones, una matriz es suficientemente gruesa y suficientemente blanda como para que la compresión causada por la presión aplicada sea local para el prensado. En realizaciones, la presión aplicada por un borde a una matriz de flujo capilar comprime sustancialmente la matriz y reduce el área de la superficie interna volumen⁻¹ hasta una profundidad de no más del 40% del grosor.

10 "Material absorbente" incluye, pero no está limitado a materiales compuestos de papel de fibra de vidrio o papel de fibra de vidrio derivatizado, celulosa y sus derivados, nylones, PVDF, polisulfonas, PTFE y polipropileno, papel y papel derivatizado, véase Eric Jallerat y Volkmar Thorn, "Filter membranes and bioseparation equipment and supplies" por IVD Technology (2004) o catálogos de fabricantes tales como como Millipor Corp. (Bedford, Massachusetts, USA), Watman Inc. (New Jersey, USA) o Ahlstrom Corp. (Helsinki, Finland).

15 Típicamente, el miembro absorbente consiste en una serie de fibras agrupadas en paralelo para formar una mecha abierta con cierta integridad mecánica debido a la unión entre las fibras, con el espacio entre las fibras actuando para formar canales, que absorben líquido. Las fibras apropiadas incluyen poliéster, poliamidas tales como nylon, y fibras de dos componentes, tales como polietileno/poliéster, nylon/poliéster y similares. Las fibras bicomponente de polietileno/poliéster comprenden típicamente un núcleo central de poliéster con una vaina externa de polietileno. También se pueden usar fibras inherentemente hidrófobas tales como polipropilenos con tal de que sean humedecibles en agua, o si es necesario, se hacen humedecibles en agua por medio de otros componentes tales como tensioactivos o polímeros hidrófilos. En principio es apropiada cualquier fibra humedecible.

20 Con las fibras se puede formar un miembro absorbente por una variedad de procesos, tales como el recocado para fundir parcialmente la región de la superficie/vaina y provocar la interpenetración de las cadenas poliméricas, que se establecen al enfriar. Alternativamente, se pueden usar adhesivos, tales como adhesivos de látex.

25 Las matrices capilares de realizaciones de la invención son de varias formas que incluyen pero no están limitadas a, láminas, columnas, membranas y fibras comprimidas. Los materiales apropiados incluyen, pero no están limitados a, materiales porosos y materiales fibrosos, incluyendo tejidos, materiales fibrosos orientados de forma racional y orientados al azar. Los materiales apropiados incluyen materiales poliméricos tales como polímeros porosos que incluyen polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), etileno acetato de vinilo (EVA), poliéter sulfona (PS), uretano termoplástico (TPU), poliamida (por ejemplo, Nylon 6) y sus copolímeros porosos tales como polímeros porosos fabricados por Porex Corporation, Fairburn GA, USA. Los materiales apropiados incluyen materiales fibrosos tales como celulosa, materiales celulósicos, derivados de celulosa, fibras de vidrio, papel, papel de filtro, papel cromatográfico, polímeros de origen natural modificados o sintéticos, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa y algodón.

30 En realizaciones, una matriz de flujo capilar absorbente de la presente invención es una estructura uniforme, tal como una tira de papel o una combinación de varios materiales que comprende una estructura de un solo camino. En realizaciones, una matriz de flujo capilar de la presente invención está unida a un material de soporte sustancialmente impermeable, por ejemplo, como se conoce en el campo de la cromatografía en capa fina donde la materia fibrosa porosa está unida a un soporte impermeable sólido. Por ejemplo, generalmente un soporte es de las mismas dimensiones que la matriz de flujo capilar: cuando es menor o mayor entonces la interfase entre la matriz y el soporte puede producir un camino capilar paralelo al camino capilar definido por la matriz de flujo capilar. Los materiales apropiados de los que formar un soporte incluyen, pero no están limitados a, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), vidrio, cerámica, metales, poliuretano, neopreno, látex y caucho de silicona.

35 Un material excepcionalmente apropiado para preparar una matriz de flujo capilar de la presente invención es fibra de vidrio especialmente fibra de vidrio soportada por plástico, incluyendo derivado de fibra de vidrio tal como matrices de fibra de vidrio/celulosa/poliéster. Las membranas de fibra de vidrio son relativamente gruesas, (típicamente hasta de 2 mm), tienen tamaños de poro de 1 a 40 micrómetros y un caudal de agua relativamente alto (cuando se compara con la matriz de nitrocelulosa típica) que permite que un gran flujo de muestra y reactivo fluya a su través. Una ventaja adicional de la fibra de vidrio, como se señaló anteriormente, es que la fibra de vidrio es relativamente gruesa, blanda y compresible de modo que cuando se aplica presión según las enseñanzas de la presente invención, la compresión es local en el punto de presión.

40 Un material excepcionalmente apropiado para preparar una matriz de flujo capilar de la presente invención es nitrocelulosa, especialmente de nitrocelulosa reforzada con plástico, especialmente que tiene un tamaño de poro de entre 0,45 y 15 micrómetros. Un material excepcionalmente apropiado para preparar una matriz de flujo capilar de la presente invención es polietileno poroso, que tiene especialmente un tamaño de poro de entre 0,2 y 20 micrómetros, preferentemente entre 1 y 12 micrómetros, disponible en Porex Corporation, Fairburn GA, EE.UU.

45 El tamaño físico real de una matriz de flujo capilar de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención

está determinado por muchos factores, especialmente el material del que está hecha la matriz y el uso o usos específicos para los que se destina el dispositivo capilar de flujo lateral. Dicho esto, en algunas realizaciones un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención es un dispositivo capilar de flujo lateral que funciona manualmente. En realizaciones de la presente invención, se prefiere generalmente que la longitud de una matriz de flujo capilar sea conveniente para uso manual y el almacenamiento de un dispositivo capilar de flujo lateral, es decir, generalmente, pero no necesariamente por lo menos de alrededor de 1 cm, y generalmente no mayor de alrededor de 30 cm, no mayor de alrededor de 15 cm e incluso no mayor de alrededor de 10 cm.

En realizaciones de la presente invención, se prefiere generalmente que la anchura de una matriz de flujo capilar sea suficientemente estrecha para permitir la concentración de un material que produce una señal en un área pequeña para aumentar el contraste de una señal producida y reducir la capacidad de líquido de la matriz de flujo capilar, pero también suficientemente ancha para permitir la simple observación de la señal por un usuario, es decir generalmente, pero no necesariamente entre alrededor de 1 mm y 20 mm.

En realizaciones de la presente invención, se prefiere generalmente que la matriz de flujo capilar sea relativamente gruesa para permitir una alta capacidad y caudal de líquido y también asegurar que la presión aplicada por los bordes comprima la matriz sólo localmente. Preferentemente, la matriz de flujo capilar es de hasta alrededor de 2 mm de espesor, hasta alrededor de 1 mm de espesor, y preferentemente entre alrededor de 0,05 y alrededor de 0,5 mm de espesor.

En realizaciones de la presente invención una matriz de flujo capilar está en comunicación capilar con un drenaje de líquido. Un drenaje de líquido es generalmente un componente hecho de un material absorbente y que tiene una capacidad de absorción de líquido que es significativamente mayor que la de una respectiva matriz de flujo capilar. En realizaciones de la presente invención, un drenaje de líquido está formado integralmente con una respectiva matriz de flujo capilar. En realizaciones de la presente invención, un drenaje de líquido constituye por lo menos un componente distinto de una respectiva matriz de flujo capilar. En realizaciones de la presente invención, un drenaje de líquido es de una forma o de un material que permite una mayor velocidad de movimiento capilar que a través de una respectiva matriz de flujo capilar. Los materiales apropiados de los que se fabrica un drenaje se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 4.632.901, tales como, por ejemplo, materiales fibrosos tales como fibras de acetato de celulosa, celulosa o derivados de celulosa, poliéster o poliolefinas.

En realizaciones de la presente invención, los depósitos son de cualquier forma o tamaño apropiados. Como una unión entre dos caras puede definir un canal capilar, en realizaciones, la superficie interior de un depósito en contacto o proximidad inmediata con una zona de recepción de líquido es continua, por ejemplo, circular, oval o si no curva. El volumen de un depósito dado está determinado por muchos factores y la implementación exacta de un respectivo dispositivo capilar de flujo lateral. Dicho esto, un depósito típico de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención generalmente tiene una capacidad de por lo menos alrededor de 5 microlitros, por lo menos alrededor de 20 microlitros o incluso por lo menos alrededor de 50 microlitros y generalmente no mayor de alrededor de 5.000 microlitros, no mayor de alrededor de 1.000 microlitros e incluso no mayor de alrededor de 300 microlitros.

Dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención

Una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención, 24 se representa en la Figura 2. El dispositivo capilar de flujo lateral 24 incluye una matriz 18 flujo capilar absorbente de un solo camino que tiene un extremo 26 aguas arriba y un extremo 28 aguas abajo que definen una dirección 30 de flujo. La matriz 18 de flujo capilar del dispositivo 24 capilar de flujo lateral es sustancialmente membrana porosa de nitrocelulosa reforzada desprovista de una capa de refuerzo.

Tres depósitos, un depósito 32a aguas abajo, un depósito 32b medio y un depósito 32c aguas arriba que constituyen recipientes abiertos por arriba, están en comunicación de fluido no capilar (para conservar el único camino del dispositivo 24 capilar de flujo lateral) con la matriz 18 de flujo capilar cada uno a través de una respectiva zona 34a, 34b y 34c de recepción de líquido. La distancia entre los bordes de las zonas de recepción de líquido 34a, 34b y 34c es por lo menos 50% de la dimensión de tal zona de recepción de líquido en la dirección 30 de flujo, aunque en realizaciones es sustancialmente mayor. La matriz capilar entre cualquiera de las dos zonas de recepción se define como una zona de creación de interfase. La zona 35a de creación de interfase se encuentra entre las zonas 34a y 34b de recepción de líquido. La zona 35b de creación de interfase se encuentra entre las zonas 34b y 34c de recepción de líquido.

Cada depósito 32a, 32b o 32c está en contacto con una respectiva zona 34a, 34b y 34c de recepción de líquido a través de una abertura en la parte inferior del depósito que constituye un conducto hueco que tiene un borde 36a, 36b y 36c. Frente a cada borde 36a, 36b y 36c están dispuestos componentes 38a, 38b y 38c de soporte, respectivamente. Los bordes 36a, 36b y 36c presionan en la matriz 18 de flujo capilar, incluso cuando la matriz de flujo capilar está seca, mientras que los componentes 38a, 38b y 38c de soporte soportan la matriz 18 de flujo capilar contra el prensado de modo que la matriz 18 de flujo capilar está sustancialmente suspendida entre los bordes 36a, 36b y 36c y lo componentes 38a, 38b y 38c de soporte. Los bordes 36a, 36b y 36c y las superficies superiores de los componentes 38a, 38b y 38c de soporte son sustancialmente paralelos a la dirección 30 de flujo, lo que garantiza que la presión aplicada por un borde 36a, 36b o 36c es sustancialmente uniforme alrededor de toda la

superficie de ese borde.

5 Como la matriz 18 de flujo capilar es sustancialmente compresible, el área de la superficie interna por unidad de volumen de la matriz 18 en la proximidad de un borde 36a, 36b o 36c es mayor que distante de un borde 36a, 36b o 36c. El supuesto significado de esta diferencia se discute aquí a continuación. El material de la matriz en las zonas 35a y 35b de creación de interfase no está restringido para la expansión inducida por el líquido.

La matriz 18 de flujo capilar está provista de una zona 20 de reacción que incluye por lo menos una entidad de captura configurada para capturar un material tal como un analito o un producto de una reacción que implica al analito que fluye a través de la matriz 18 de flujo capilar aguas abajo de las zonas 34a, 34b y 34c de recepción de líquido.

10 En la proximidad del extremo 28 aguas abajo, la matriz 18 de flujo capilar está en comunicación de fluido con el drenaje 23 de líquido.

15 La matriz 18 de flujo capilar y el drenaje 23 de líquido están contenidos sustancialmente dentro de un alojamiento 40 tal que todos los lados de la matriz 18 de flujo capilar están sustancialmente desprovistos de contacto con el alojamiento 40. A través del alojamiento 40 por encima de la zona 20 de reacción está una ventana 22 de observación que en realizaciones es simplemente una abertura a través del alojamiento 40.

20 Para su uso, según el método de la presente invención, una primera cantidad de un primer líquido, por ejemplo, muestra que contiene analito se coloca en el depósito 32a aguas abajo, fluye a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 34a de recepción de líquido y se extiende tanto aguas arriba como aguas abajo de la zona 34a de recepción de líquido. Una segunda cantidad de un segundo líquido, por ejemplo, reactivo marcado, se coloca en el depósito 32b medio, fluye a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 34b de recepción de líquido y se extiende tanto aguas arriba como aguas abajo de la zona 34b de recepción de líquido. Una tercera cantidad de un tercer líquido, por ejemplo, componente de producción de la señal, se coloca en el depósito 32c aguas arriba, fluye a la matriz 18 de flujo capilar a través de la zona 34c de recepción de líquido y se extiende tanto aguas arriba como aguas abajo de la zona 34c de recepción de líquido.

25 El tercer líquido fluye aguas arriba hasta que toda la matriz 18 capilar aguas arriba de la zona 34c de recepción de líquido se satura con el tercer líquido. En tercer líquido fluye aguas abajo de la zona 34c de recepción de líquido hasta encontrarse con el segundo líquido que fluye aguas arriba desde la zona 34b de recepción de líquido formando una interfase 42b estática (véase la Figura 3) en algún lugar de la zona 35b de creación de interfase en la que a su través no hay sustancialmente mezcla de líquidos. Una vez que se forma la interfase 42b, y suponiendo que la cantidad de segundo y tercer líquido añadida es suficiente para no ser absorbida totalmente en la matriz 18 de flujo capilar, se forma una columna vertical de tercer líquido en el depósito 32c aguas arriba ya que se impide que el tercer líquido fluya aguas abajo por la presión aplicada por segundo líquido en el depósito 32b medio.

30 El segundo líquido fluye aguas abajo de la zona 34b de recepción de líquido hasta encontrarse con el primer líquido que fluye aguas arriba desde la zona 34a de recepción de líquido formando una interfase 42a estática en algún lugar de la zona 35a de creación de interfase en la que a su través no hay sustancialmente mezcla de líquidos. Una vez que se forma la interfase 42a, y suponiendo que la cantidad del primer y segundo líquido añadida es suficiente para no ser absorbida por completo en la matriz 18 de flujo capilar, se forma una columna vertical de segundo líquido en el depósito 32b medio, se previene que el segundo líquido fluya aguas abajo por la presión aplicada por el primer líquido en el depósito 32a aguas abajo.

35 El primer líquido del depósito 32a aguas abajo se drena hacia abajo a través de la zona 34a de recepción de líquido y fluye aguas abajo en la dirección 30 de flujo pasada la zona 20 de reacción en la que se inmoviliza el miembro de sbp (receptor). El analito si está presente en la muestra es capturado por el miembro de sbp mientras que el líquido se absorbe en el drenaje 23 de líquido.

40 Cuando todo el primer líquido se drena del depósito 32a aguas abajo, la interfase primer líquido/segundo líquido comienza a moverse aguas abajo en la dirección 30 del flujo a medida que el segundo líquido desde el depósito 32b medio se drena a través de la zona 34b de recepción de líquido y fluye aguas abajo en la dirección 30 del flujo. Durante este tiempo, la interfase segundo líquido/tercer líquido permanece estática. El reactivo marcado presente en el segundo líquido se une a complejo formado en la zona 20 de reacción, si está presente.

45 Cuando todo el segundo líquido se drena del depósito 32b medio, la interfase segundo líquido/tercer líquido comienza a moverse aguas abajo en la dirección 30 del flujo a medida que el tercer líquido del depósito 32c aguas arriba se drena hacia abajo a través de la zona 34c de recepción de líquido y fluye aguas abajo en la dirección 30 del flujo. El componente de producción de la señal presente en el tercer líquido reacciona con el reactivo marcado unido al complejo, para generar una señal observable

50 Como se discutió en la introducción, previamente se han realizado esfuerzos para implementar métodos que se asemejan al método de la presente invención pero han fracasado. En los intentos de la técnica anterior, se forma una interfase entre dos líquidos pero no se producen columnas verticales de líquido en un depósito. Más bien, los líquidos invariablemente se fugan por varios sitios en la matriz de flujo capilar, generalmente por cualquier lugar por

- el que la matriz de flujo capilar hace contacto con un objeto físico formando de este modo un camino capilar alternativo. Por ejemplo, en un dispositivo capilar de flujo lateral multidepósito tal como se describe en la Patente de EE.UU. No. 4.981.786 se producen fugas a lo largo de los componentes de soporte sobre los que descansa la matriz de flujo capilar, a lo largo de componentes de soporte lateralmente dispuestos que mantienen el flujo capilar en su lugar y hasta los puntos de contacto de los depósitos con la matriz de flujo capilar, produciendo un flujo de líquido en la superficie superior de la matriz de flujo capilar.
- De este modo, en contraste con los métodos y dispositivos capilares de flujo lateral conocidos en la técnica, las enseñanzas de la presente invención permiten la realización de reacciones multietapa usando un dispositivo capilar de flujo lateral en el que cada etapa se realiza con una cantidad relativamente precisa de reactivo durante una duración relativamente precisa. Dado que se evitan las fugas y dado que la duración de una etapa de reacción se determina con precisión por el volumen de los diferentes líquidos añadidos, se pueden realizar muchos experimentos multietapa diferentes para dar resultados repetibles. Además, ya que el volumen de líquido es el determinante principal de la duración de una etapa dada, la duración de una etapa dada se modifica fácilmente si se requiere, permitiendo la realización de experimentos cinéticos.
- Aunque, no deseando estar vinculados a ninguna teoría, se cree que la razón del fracaso de los intentos previos y del éxito del inventor en la implementación con éxito del concepto de columnas de líquido en comunicación de fluido con una matriz capilar de flujo para su uso para realizar reacciones multietapa está relacionada con las fuerzas que actúan sobre un líquido dentro de una matriz de flujo capilar y la eliminación de potenciales caminos capilares alternativos.
- El potencial Ψ de agua del líquido es la energía potencial del agua en un volumen (masa) dado y determina la dirección de flujo desde un volumen de un más alto potencial de agua hasta un volumen con un más bajo potencial de agua. El potencial Ψ de agua total de un volumen de agua es la suma de cuatro componentes del potencial: gravitacional (Ψ_g), de la matriz (Ψ_m), osmótico (Ψ_s), y de presión (Ψ_p). El potencial gravitacional depende de la posición del agua en un campo gravitacional. El potencial de matriz depende de las fuerzas de absorción que unen el agua a la matriz. El potencial osmótico depende de la concentración de sustancia disuelta en el agua (por ejemplo, una disolución que tiene una alta concentración de sal tiene un valor negativo). El potencial de presión depende de la presión hidrostática o neumática sobre el agua. El potencial de la matriz está afectado por las propiedades tanto de la matriz como del líquido. El potencial de la matriz está afectado por la atracción del líquido hacia la matriz (hidrofilia) y por el área de la superficie de las cavidades en la matriz.
- En un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito, la fuerza que actúa sobre un líquido dentro de la matriz de flujo capilar incluye la fuerza aplicada por una sola columna de líquido en un depósito que contribuye a Ψ_p . La atracción de las moléculas de líquido con las superficies internas de la matriz de flujo capilar (Ψ_m) es suficiente para prevenir la fuga de líquido a lo largo de los caminos capilares alternos formados, por ejemplo, en los que algún objeto físico entra en contacto con la matriz de flujo capilar.
- En un dispositivo capilar de flujo lateral multidepósito descrito aquí, la fuerza que actúa sobre un líquido dentro de la matriz de flujo capilar incluye la fuerza aplicada por dos columnas verticales de líquido en dos depósitos que contribuyen ambas a Ψ_p . En tales casos, Ψ_m que es una medida de la atracción entre las moléculas de líquido y las superficies internas de la matriz de flujo capilar es insuficiente para prevenir la fuga de líquido a lo largo de caminos de flujo capilar alternativos.
- En realizaciones de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención, se eliminan los puntos de contacto excepto en los bordes de los depósitos y, si están presentes, en los componentes de soporte dispuestos enfrente, que se presionan sobre la matriz de flujo capilar. La presión de estos componentes localmente comprime la matriz y los poros en ella, reduciendo el volumen de la matriz próxima a estos componentes pero sin cambiar el área total de la superficie interna. Tal presión incrementa la energía de interacción de la matriz de flujo capilar/líquido por unidad de volumen en la vecindad de los componentes y por lo tanto incrementa Ψ_m . Esta energía incrementada es aparentemente suficiente para compensar la incrementada fuerza aplicada por las dos columnas de líquido. En resumen, la presión de la matriz incrementa la energía de unión en la vecindad de los puntos de contacto con los bordes o componentes de soporte, reduciendo la tendencia a la fuga a través del camino de flujo capilar alternativo formado en el punto de contacto.
- En realizaciones de la presente invención, una zona de creación de interfase dada es relativamente ancha con relación a zonas de recepción de líquido que la flanquean. Una ventaja de tales realizaciones es que el tamaño de la zona de creación de la interfase significa que el líquido añadido a una de las zonas de recepción de líquido requiere un periodo de tiempo significativo para viajar a través de la zona de creación de la interfase antes de llegar a la zona de recepción de líquido vecina. Esto permite que la adición de líquidos a diferentes depósitos sea secuencial y se realice en condiciones más difíciles (por ejemplo, no en el laboratorio), e incluso por operarios menos expertos. Una ventaja adicional de una zona de creación de la interfase relativamente ancha es compensar las diferentes velocidades de absorción de diferentes líquidos añadidos. Por ejemplo, la velocidad de entrada de un líquido viscoso o hidrófobo es relativamente lenta. Una zona de creación de interfase relativamente ancha previene que los líquidos que entran en la matriz más rápido viajen a una zona de recepción de líquido en la que se añade un líquido viscoso o hidrófobo, permitiendo que el líquido viscoso o hidrófobo entre en la matriz y cree una clara interfase líquido-líquido

bien definida.

Además, se ha encontrado que las zonas de creación de interfase relativamente largas conducen a la formación de interfaces más claramente definidas que son sustancialmente perpendiculares a la dirección de flujo.

5 Muchos materiales usados como matrices de flujo capilar se expanden al contacto con agua. En los dispositivos capilares de flujo lateral en los que la expansión inducida por líquido en la zona de creación de interfase está restringida, por ejemplo, cuando se les aplica presión desde arriba, la expansión puede ser inhomogénea y se pueden formar grietas en la matriz, modificando localmente las propiedades capilares de la matriz. Si se forma la interfase en un volumen en el que cambian las propiedades capilares, la interfase formada entre líquidos puede ser indefinida y no clara, conduciendo a la mezcla de los dos líquidos en la interfase y a sus efectos negativos concomitantes. En realizaciones de la presente invención, la expansión inducida de líquido de la zona de creación de la interfase no está restringida.

En realizaciones de la presente invención, el primer líquido y el segundo líquido se añaden sustancial y simultáneamente a un depósito respectivo.

15 En realizaciones de la presente invención, el primer líquido y segundo líquido se añaden secuencialmente. Cuando los líquidos se añaden secuencialmente, el orden en el que se añaden los líquidos es poco significativo, con tal de que un líquido subsecuente se añada a un depósito respectivo antes de un líquido previo migre a la zona de recepción de líquido del depósito del líquido subsecuentemente añadido.

20 Como se advirtió anteriormente, el método de la presente invención como se describe anteriormente no se refiere al transporte de líquidos a través de una matriz de flujo capilar, sino que permite la realización de reacciones multietapa especialmente ensayos de unión específica multietapa, en los que cada uno de los dos líquidos inicia y realiza una etapa diferente de una reacción multietapa, por ejemplo, el transporte de un reactivo. Como es evidente para un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la presente descripción, el volumen de cualquier líquido dado determina en gran medida la duración de una etapa respectiva.

25 Dependiendo del propósito para el que se diseña el dispositivo 24 capilar de flujo lateral, la zona 20 de reacción comprende por lo menos una entidad de captura (por ejemplo, un miembro de un par de unión específica) configurada para capturar un material (por ejemplo, un analito o un producto de reacción que implica al analito) que fluye a través de la matriz capilar. En realizaciones de la presente invención, la zona de reacción está en una zona de recepción de líquido de un depósito respectivo.

30 En realizaciones de la presente invención, se proporciona un dispositivo capilar de flujo lateral con uno o más reactivos pre-cargados sobre la matriz de flujo capilar. Tal precarga de reactivos es conocida en la técnica de dispositivos capilares de flujo lateral, por ejemplo, secando reactivos sobre la matriz, por ejemplo, liofilizando, secando por pulverización, dispensando y secando al aire.

35 Resumiendo, se carga un reactivo sobre la matriz de flujo capilar de tal modo que un líquido añadido por medio de un depósito específico interaccionará con el reactivo. En realizaciones, por lo menos un reactivo precargado está configurado para reaccionar con un analito añadido para producir un producto de reacción que se transporta subsecuentemente aguas abajo a lo largo de la matriz de flujo capilar. En realizaciones, por lo menos un reactivo precargado está configurado para ser disuelto por un líquido añadido y para ser transportado subsecuentemente aguas abajo a lo largo de la matriz de flujo capilar. En realizaciones, un reactivo precargado está localizado sustancialmente en una zona de recepción de líquido, específicamente en una zona de creación de interfase adyacente.

45 Las realizaciones de la presente invención permiten precargar material tanto aguas arriba como aguas abajo de una zona dada de recepción de líquido, permitiendo precargar material en una región relativamente grande de matriz usando métodos simples, por ejemplo, por secado por pulverización. Generalmente, el material precargado aguas abajo de la zona de recepción de líquido más aguas abajo está cargado a cualquier distancia de la zona de recepción de líquido, generalmente (pero no necesariamente) entre la zona de recepción de líquido y una zona de reacción. El material precargado en la vecindad de una zona de recepción de líquido más aguas abajo se carga generalmente aguas abajo de la zona de recepción de líquido de modo que todo el material se usará cuando se introduce líquido en la zona de recepción de líquido más aguas arriba. Otro material precargado se carga generalmente en la zona de recepción de líquido o un poco aguas arriba o un poco aguas abajo de la zona de recepción de líquido, por ejemplo, hasta alrededor de 30% de la longitud de la zona de creación de interfase adyacente.

En realizaciones de la presente invención, enfrente de los bordes de los conductos de líquido de los depósitos la matriz se une a un material de refuerzo sustancialmente impermeable para evitar la fuga de líquidos de la matriz de flujo capilar.

55 En la Figura 4 se representa una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención, 46.

En el dispositivo 46 capilar de flujo lateral, la matriz 18 de flujo capilar está unida un refuerzo 48 sustancialmente

impermeable. Conjuntamente, la matriz 18 de flujo capilar y el refuerzo 48 sustancialmente impermeable constituyen una tira que descansa sobre la meseta 50, en el que el refuerzo 48 está en contacto con la meseta 50. El dispositivo 46 capilar de flujo lateral está provisto de cuatro depósitos 32a, 32b, 32c y 32d con los respectivos bordes 36a, 36b, 36c y 36d que presionan la superficie superior de la matriz 18 de flujo capilar. La meseta 50 está dispuesta enfrente de cada borde 36 de cada depósito 32 y de este modo constituye un componente de soporte que soporta la matriz 18 contra la presión de los bordes 36.

El dispositivo 46 capilar de flujo lateral está configurado para la realización simple de reacciones de cuatro etapas.

Un primer reactivo 52 se precarga en la zona 34a de recepción de líquido, siendo el primer reactivo 52 un nutriente configurado para provocar que células vivas que están en contacto con el primer reactivo 52 expresen ciertas proteínas sobre las membranas exteriores.

Un segundo reactivo 54 se precarga en un área de matriz 18 capilar entre las zonas 34b y 34c de recepción de líquido, siendo el segundo reactivo 54 una toxina.

Un tercer reactivo 56 se precarga en una zona 34d de recepción de líquido, siendo el tercer reactivo 56 un indicador que se une a cierta proteína.

La zona 20 de reacción incluye una entidad de captura configurada para inmovilizar células.

El uso del dispositivo 46 capilar de flujo lateral es sustancialmente similar al uso del dispositivo 24 capilar de flujo lateral que se describe anteriormente y es evidente para un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la presente descripción.

Una primera muestra líquida, que incluye células vivas se coloca en el depósito 32a, se coloca un segundo líquido en el depósito 32b, se coloca un tercer líquido en el depósito 32c y se coloca un cuarto líquido en el depósito 34d, secuencial o simultáneamente. Se forman tres interfaces líquidas en las zonas 35a, 35b, 35c de creación de interfase, las columnas verticales de la interfase 42a, 42b, 42c de líquido se producen en los depósitos 32b, 32c y 32d. Cuando la primera muestra líquida que contiene células entra en contacto con el primer reactivo en la zona 34a de recepción de líquido, las células comienzan a producir el metabolito específico. Cuando la muestra líquida llega a la zona 20 de reacción las células están inmovilizadas.

Cuando la primera muestra líquida en el depósito 32a se agota, el segundo líquido en el depósito 32b comienza a fluir a través de la matriz 18 de flujo capilar, transportando los desechos y otro material no ligado desde la zona 20 de reacción hacia el drenaje 23 de líquido.

Cuando el segundo líquido en el depósito 32b se agota, el tercer líquido en el depósito 32d comienza a fluir a través de la matriz 18 de flujo capilar, llevando el segundo reactivo 54. El segundo reactivo se transporta a la zona 20 de reacción, matando las células inmovilizadas.

Cuando el tercer líquido en el depósito 32b se agota, el cuarto líquido en el depósito 32d comienza a fluir a través de la matriz 18 de flujo capilar, llevando el tercer reactivo 56. El tercer reactivo 56 se transporta a la zona 20 de reacción, produciendo una señal visible sobre las células que expresaron ciertas proteínas sobre las membranas externas.

Usando una pluralidad de dispositivos 46 capilares de flujo lateral, se realizan experimentos sustancialmente idénticos en los que solo se varía la cantidad de segundo líquido añadido al depósito 32b, variando de este modo el tiempo entre la exposición de las células al primer reactivo 52 y la muerte de las células con exposición al segundo reactivo 54. De tal modo, se estudia la cinética de la expresión de proteínas.

En realizaciones de la invención se usa para aplicaciones distintas de aplicaciones de diagnóstico que incluyen la extracción o síntesis de biomoléculas, por ejemplo, la concentración de ácidos nucleicos en una muestra. Se unen partículas de absorción de ácido nucleico a una zona de reacción de una matriz de flujo capilar y se añade una muestra que contiene ácidos nucleicos en condiciones de unión dando como resultado la concentración de ácido nucleico de la muestra. En realizaciones la etapa de concentración va seguida de etapas de lavado, elución y/o análisis.

Métodos de fabricación de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención

En general, la fabricación y montaje de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención está completamente dentro de la capacidad de un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la presente descripción y figuras usando cualquier método apropiado con el que un experto en la técnica está bien familiarizado. Los métodos apropiados incluyen métodos que emplean una o más técnicas que incluyen pero no están limitadas a, soldadura, colado, repujado, erosión química, fabricación de forma libre, moldeo por inyección, microerosión química, micromaquinado, microenchapado, moldeo, revestimiento por giro, litografía o fotolitografía.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo y un kit que permiten la preparación simple y barata de un dispositivo capilar de flujo lateral a medida según las enseñanzas de la presente invención.

Un dispositivo 60 de la presente invención útil para la preparación del dispositivo capilar de flujo lateral se representa en la Figura 5A. El dispositivo 60 comprende un primer componente 62 y un segundo componente 64, conectados por medio de extensiones 66 y 68 que sobresalen por medio de una bisagra 70.

5 El primer componente 62 incluye un depósito 32 que tiene una pared configurada para mantener líquidos. El área más baja del depósito 32 es una abertura 63 no capilar que define un conducto hueco con un borde 36. En realizaciones el borde 36 es relativamente amplio, por lo menos alrededor de 0,5 mm o incluso por lo menos alrededor de 1 mm. En realizaciones el borde 36 es substancialmente plano. Para ser no capilar, en realizaciones la
 10 abertura 63 no capilar es relativamente grande, teniendo en realizaciones un área de sección transversal de por lo menos alrededor de 1 mm², de por lo menos alrededor de 3 mm² o incluso de por lo menos alrededor de 7 mm².
 Enfrente de la extensión 66 y sobresaliendo también del depósito 32 está la protuberancia 72.

El segundo componente 64 incluye un cuerpo 74 con una plataforma 76 de contrasoporte en el extremo superior del cuerpo 74. Enfrente de la extensión 68 y sobresaliendo también del cuerpo 74 está la protuberancia 78.

15 Las protuberancias 72 y 78 están configuradas para acoplarse mutuamente, conectando (por ejemplo, "encajando") para mantener el borde 36 y la plataforma 76 de contrasoporte separadas sustancialmente paralelas a cierta distancia predeterminada.

En el dispositivo 60, el primer componente 62 está provisto de dos extensiones 66 y 72 para acoplarse con dos extensiones 68 y 78 del segundo componente 64. En realizaciones, se proporciona un primer componente y/o un segundo componente con solo una extensión, o con más de dos de tales extensiones cada uno.

20 En el dispositivo 60, las extensiones 66 y 68 se forman como una pieza para definir la bisagra 70. En realizaciones de la presente invención, las extensiones están configuradas para acoplarse reversiblemente o irreversiblemente, definiendo una bisagra cuando están acopladas. En realizaciones de la presente invención las extensiones están configuradas para estar acopladas reversiblemente o irreversiblemente, no definiendo una bisagra cuando están acopladas.

25 El uso de un dispositivo de la presente invención tal como el dispositivo 60 en el marco de un kit de la presente invención, se representa desde la parte superior en la Figura 5B y desde un lado en la Figura 5C. En las Figuras 5B y 5C, se representa un kit de la presente invención que comprende dos dispositivos 60 y una tira de fibra de vidrio reforzada con plástico como matriz 18 de flujo capilar absorbente en un estado montado, constituyendo conjuntamente una realización del dispositivo de la presente invención.

30 Para el montaje, una matriz 18 de flujo capilar de un grosor apropiado se corta al tamaño apropiado y dos dispositivos 60 se cierran alrededor de un área apropiada de matriz 18 de flujo capilar. El grosor de la matriz 18 de flujo capilar y el diseño de los dispositivos 60 es tal que, cuando las extensiones 72 y 78 están acopladas mutuamente, la matriz 18 de flujo capilar está sujeta entre el borde 36 y la plataforma 76 de contrasoporte. En tal estado, las aberturas no capilares 63 definen una zona de recepción de líquido. Además, el borde 36 presiona en la matriz 18 de flujo capilar, según las enseñanzas de la presente invención.

35 Como es evidente para un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la descripción, un dispositivo capilar de flujo lateral, que incluye un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención se construye y modifica fácilmente a medida con el uso de las realizaciones de dispositivos de la presente invención y realizaciones de kits de la presente invención. Por ejemplo, la aplicación de los reactivos deseados para definir una zona de reacción o para precargar un reactivo sobre una matriz capilar es fácil de conseguir.

40 En la técnica, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 4.981.786, se enseña la introducción de muestra o substrato en un depósito aguas abajo y la adición de un vehículo líquido en un depósito aguas arriba para transportar un reactivo localizado sobre una matriz de flujo capilar aguas abajo para entrar en contacto con la muestra o substrato. En un aspecto de la presente invención se enseña un método en el que se usa también una muestra como vehículo líquido.

45 En el método, se usa un dispositivo capilar de flujo lateral sustancialmente como se describe anteriormente que incluye: una primera zona de recepción de líquido sobre la matriz de flujo capilar en comunicación de fluido con un primer depósito, una segunda zona de recepción de líquido sobre la matriz de flujo capilar en comunicación de fluido con un segundo depósito aguas arriba del primer depósito, un primer reactivo precargado dentro del primer depósito y/o en una localización sobre la matriz de flujo capilar en la proximidad de la primera zona de recepción de líquido o
 50 aguas abajo de ella; un segundo reactivo precargado en una localización dentro del segundo depósito y/o sobre la matriz de flujo capilar en la proximidad de la segunda zona de recepción de líquido.

Una primera cantidad de un líquido (por ejemplo, la muestra) se añade al primer depósito de modo que el líquido fluya dentro de la matriz de flujo capilar a través de la primera zona de recepción de líquido para entrar en contacto con el primer reactivo, por ejemplo, para reaccionar con el primer reactivo o para solubilizar el primer reactivo.

55 Una segunda cantidad de un líquido (el mismo o diferente) se añade al segundo depósito de modo que el líquido fluya dentro de la matriz de flujo capilar a través de una segunda zona de recepción de líquido para entrar en

contacto con el segundo reactivo. La segunda cantidad de líquido se añade antes, después o sustancialmente simultáneamente con la adición de la primera cantidad de líquido.

5 Según las enseñanzas de la presente invención, cuando la primera cantidad y la segunda cantidad son tales que queda líquido sustancialmente en el primer y segundo depósito respectivamente, se forma una interfase estática entre el líquido que está en contacto con el primer reactivo y el líquido que está en contacto con el segundo reactivo en la zona de creación de la interfase entre las dos zonas de recepción de líquido. Según las enseñanzas de la presente invención como se describe anteriormente, la interfase se mueve solo subsecuentemente al agotamiento del líquido del primer depósito. En realizaciones, hay una zona de reacción aguas abajo de la primera zona de recepción de líquido sobre la matriz de flujo capilar. En realizaciones hay una zona de reacción en la primera zona de recepción de líquido. Como es evidente para un experto, la ventaja de este método es que un ensayo se hace muy simple.

10 Cuando el líquido añadido al primer depósito es el mismo que el añadido al segundo depósito, solo se añade un líquido (por ejemplo, por medio de un solo puerto en comunicación con varias zonas de recepción de líquido) como en un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito pero realiza una reacción multietapa con todas sus ventajas. Esto reduce el número de etapas requeridas para realizar una reacción multietapa de otro modo compleja.

Experimental

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, demuestran la invención de un modo no limitante.

Experimento 1: Preparación de una realización de un dispositivo capilar de flujo lateral de la presente invención

20 Se preparó un dispositivo capilar de flujo lateral tal como el dispositivo capilar de flujo lateral 80 representado en las Figuras 6A, 6B y 6C.

25 Una parte 82 inferior de la carcasa y una parte 84 superior de la carcasa configuradas para encajar para formar una carcasa cerrada que contiene una matriz 18 de flujo capilar y dos drenajes 86 y 88 de líquido se formaron por moldeo por inyección de plástico ABS (copolímero de acrilonitrilo-butadieno-estireno). La carcasa 82 inferior era sustancialmente una caja sin tapa que tiene una parte inferior con una porción 50 de meseta y una porción rebajada 90. La carcasa 84 superior era sustancialmente una tapa para la carcasa 82 inferior y estaba provista de tres depósitos A, B y C, que incluyen los bordes 36a, 36b, 36c circulares, una ventana 22 de observación, y cuatro protuberancias 92 de drenaje por prensado.

30 La matriz 18 de flujo capilar, sustancialmente una membrana porosa de 50 mm x 32 mm de fibra de vidrio GF de grado 161 de Ahlstrom Corporation (Helsinki, Finlandia) unida a un refuerzo grueso de plástico revestido de adhesivo de 55 mm x 32 mm x 0,5 mm (poliestireno de alto impacto revestido con un adhesivo LH-50 de Advanced Microdevices Pvt. Ltd. Ambala Cantt, India) de modo que el extremo 26 aguas arriba de la matriz 18 de flujo capilar estaba alineado con un extremo del refuerzo 48 y 5 mm del refuerzo revestido de adhesivo sobresalían del extremo 93 aguas arriba del refuerzo 48.

35 Una línea 20a de ensayo y una línea 20b de control, que constituyen una zona 20 de reacción se aplicaron en forma de dos líneas paralelas de puntos de materiales a la matriz 18 de flujo capilar usando una pipeta de laboratorio, véase la Figura 6B.

40 La línea 20a de ensayo se aplicó en forma de una línea de puntos producidos aplicando 1 microlitro de 0,7 mg/ml de Ab de conejo anticabra (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. 111-005- 046) en tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,8) y disolución de trehalosa al 2% 36 mm desde el extremo aguas arriba de la matriz 18 de flujo capilar.

La línea 20b de control se aplicó en forma una línea de puntos producidos por la aplicación de 1 microlitro de Ab de conejo 0,1 mg/ml de fosfatos alcalinos anti ternera de conejo (Biogenesis 0300-1024) y 0,4 mg/ml de IgG de conejo I 5006 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,8) y disolución de trehalosa al 2% 42 mm desde el extremo aguas arriba de la matriz 18 de flujo capilar.

45 Después de la aplicación de los puntos, la matriz 18 de flujo capilar se secó a 37°C durante 15 minutos, se trató con una disolución de 0,5% de gelatina, 2,5% de Bacto-triptona, 1% de trehalosa en PBS y a continuación se secó a 37°C durante unas 2 horas adicionales.

50 Se prepararon dos drenajes 86 y 88 de líquido de papel de celulosa pura muy absorbente con un caudal muy alto (190 mm/30 min) Chr. 17 (Whatman). El drenaje 86 de líquido superior era de 32 mm x 36 mm y estaba unido al adhesivo del extremo 93 que sobresale aguas arriba del refuerzo 48 colindante con la matriz 18 de flujo capilar para asegurar la comunicación de fluido con ella. El drenaje 88 inferior de líquido era de 7,8 mm x 83 mm.

Como se representa en la figura 6C, para el montaje del dispositivo 80 capilar de flujo lateral, el drenaje 88 inferior de líquido se colocó en la cavidad 90 de la carcasa 82 inferior, la matriz 18 de flujo capilar junto con drenaje 86 superior de líquido se colocaron en la meseta 50 del alojamiento 82 inferior con el refuerzo 48 haciendo contacto con

la meseta 50. La carcasa 84 superior se presionó en su lugar para acoplarse y encajar conjuntamente con la carcasa 82 inferior de modo que los bordes 36 de los depósitos de A, B y C presionaran dentro de la matriz 18 de flujo capilar para definir zonas 34a, 34b y 34c de recepción de líquido y de modo que las protuberancias 92 que presionan el drenaje presionaran el extremo del drenaje 86 de líquido superior para entrar en contacto con el drenaje 88 de líquido inferior.

Experimento 2: Uso de un dispositivo capilar de flujo lateral para estudiar una reacción enzimática

Se prepararon tres reactivos liofilizados:

Reactivo A

Reactivo 11-deshidro-TxB2-antisuero – 150 µl de anti 11-deshidro-TXB de conejo, 2999-044 (Assay Designs, Inc.) diluidos 1:1500 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4 se colocaron en un vial, se enfriaron a -80°C y se liofilizaron durante 24 horas.

Reactivo B

Enzima marcada conjugado de 11-deshidro-TxB2 - 150 µl de conjugado de 11-deshidro-TxB2-fosfatasa alcalina, 1:80 DCC (Assay Designs, Inc.) diluidos 1:30.000 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4 se colocaron en un vial, se enfriaron a -80°C y se liofilizaron durante 24 horas.

Reactivo C

Substrato AP – BCIP/NBT preparado según las instrucciones del fabricante: preparación patrón - 1 comprimido de BCIP, B0274 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) disuelto en DMF 1 mM, 1 comprimido de NBT, N55141 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelto en 1 ml de agua. 300 µl de la disolución combinada, 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT, en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7, se colocaron en un vial, se enfriaron a -80°C y se liofilizaron durante 24 horas.

Se prepararon tres dispositivos capilares de flujo lateral:

Un primer dispositivo capilar de flujo lateral se preparó sustancialmente como se describe anteriormente con tampón de PBS seco colocado en un depósito A, reactivo B colocado en el depósito B y reactivo C colocado en el depósito C.

Un segundo dispositivo capilar de flujo lateral se preparó sustancialmente como se describe anteriormente con reactivo A colocado en el depósito A, disolución de PBS seco colocada en el depósito B y reactivo C colocado en el depósito C.

Un tercer dispositivo capilar de flujo lateral se preparó sustancialmente como se describe anteriormente con reactivo A colocado en el depósito A, reactivo B colocado en el depósito B y reactivo C colocado en el depósito C.

A cada uno de los tres dispositivos capilares de flujo lateral se añadió agua doblemente destilada: 150 microlitros en el depósito A, 150 microlitros en el depósito B y 300 microlitros en el depósito C, un depósito después del otro. Se vio una columna vertical de líquido en cada depósito y, como se describe anteriormente según las enseñanzas de la presente invención, el líquido se drenó primero del depósito A, a continuación del depósito B y finalmente del depósito C. Cuando todo el líquido se drenó del depósito C, la reacción enzimática se detuvo por la adición al depósito C de una disolución de parada de 120 µl de ácido sulfúrico 0,25 M.

Los colores de las líneas de ensayo y líneas de control se midieron usando un lector PART Pro (LRE Technology Partner GmbH) y se representaron en la Figura 7.

Como se ve en la Figura 7, en el primer dispositivo capilar de flujo lateral, no se observó color en la línea de ensayo y se observó color en la línea de control; en el segundo dispositivo capilar de flujo lateral no se observó color ni en la línea de ensayo ni en la línea de control; y en el tercer dispositivo capilar de flujo lateral, se observó color tanto en la línea de ensayo como en la línea de control.

Los resultados indican que los dispositivos capilares de flujo lateral funcionaban como se esperaba.

Experimento 3: detección de TxB2 para comparar un dispositivo capilar de flujo lateral multidepósito con un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito para realizar una reacción multietapa

Se prepararon dos dispositivos A y B capilares de flujo lateral sustancialmente como se describe en el Experimento 1 con una matriz de flujo capilar de 50 mm x 32 mm y se prepararon dos reactores C y D de flujo capilar con una matriz de flujo capilar más corta de 40 mm x 32 mm y se montaron de modo que solo el borde 34a del depósito estuviera en contacto con la matriz 18 de flujo capilar.

ES 2 562 406 T3

Se prepararon cinco líquidos de reacción:

1. Una disolución diluyente de BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4;
- 5 2. Reactivo A de anti 11-deshidro-TXB2 de conejo (Assay Designs, Inc. 999-044) diluido 1:15.000 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4
3. Reactivo B de conjugado de 11-deshidro-TxB2-fosfatasa alcalina (Assay Designs, Inc. 1:80 DCC) diluido 1:30.000 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4.
- 10 4. Reactivo C de BCIP/NBT preparado según las instrucciones del fabricante: preparación patrón – 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua, disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7; y
5. Reactivo D, una disolución de parada de ácido sulfúrico 0,25 M.

Uso de dispositivos capilares de flujo lateral multidepósito

- 15 150 µl de reactivo A, 150 µl de reactivo B y 300 µl de reactivo C se añadieron simultáneamente a los depósitos A, B y C respectivamente del dispositivo A capilar de flujo lateral.

150 µl de disolución diluyente, 150 µl de reactivo B y 300 µl de reactivo C se añadieron simultáneamente a los depósitos A, B y C respectivamente del dispositivo B capilar de flujo lateral.

Después del drenaje secuencial completo de las tres disoluciones en el orden A, B y C, se añadieron 150 µl de reactivo D al depósito C.

- 20 Los colores de las líneas de ensayo y líneas de control se midieron usando un lector PART Pro (LRE Technology Partner GmbH) y se representaron en la Figura 8A y 8B.

Uso de dispositivos capilares de flujo lateral de un solo depósito

- 25 Al depósito A del dispositivo C capilar de flujo lateral se añadieron uno tras otro 150 µl de reactivo A, 150 µl de reactivo B, 300 µl de reactivo C y 120 µl de reactivo D, cada líquido sucesivo solo después de que el líquido previo se había drenado completamente del depósito.

Al depósito A del dispositivo D capilar de flujo lateral se añadieron uno tras otro 150 µl de reactivo A, 150 µl de disolución diluyente, 300 µl de reactivo B y 300 µl de reactivo C y 120 µl de reactivo D, cada líquido sucesivo solo después de que el líquido previo se había drenado completamente del depósito.

- 30 Los colores de las líneas de ensayo y líneas de control se midieron usando un lector PART Pro (LRE Technology Partner GmbH) y se representaron en la Figura 8C y 8D.

Al comparar las Figuras 8A y 8C y las Figuras 8B y 8D se ve que los resultados obtenidos usando un dispositivo capilar de flujo lateral multidepósito cuando se añaden todos los reactivos al comienzo del experimento son sustancialmente los mismos que los resultados obtenidos usando un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito cuando se añaden los reactivos durante el experimento.

- 35 Se midió el tiempo de duración del drenaje de cada depósito y se calculó el caudal (minutos para que 100 µl viajaran 1 cm a través de la matriz de flujo capilar), los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Caudal [minutos para que 100 µl viajaran 1 cm]

Líquido	Depósito	Dispositivo A	Dispositivo B	Dispositivo C	Dispositivo D
A	A	0:00:57	0:00:57		
B	B	0:01:10	0:01:16		
C	C	0:01:08	0:01:10		
D	C	0:01:16	0:01:19		
A	A			0:00:55	0:00:54
B	A			0:01:14	0:01:10
C	A			0:01:12	0:01:08
D	A			0:01:16	0:01:10

Experimento 4: curva de calibración para el ensayo de competición de 11-deshidro-TxB2

Cinco dispositivos capilares de flujo lateral sustancialmente como se describe anteriormente en el experimento 1

5 Se prepararon cinco líquidos reactivos:

1. Una disolución diluyente de BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4;

2. Reactivo A de anti 11-deshidro-TXB2 de conejo (Assay Designs, Inc. 999-044) diluido 1:1.500 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4

10 3. Reactivo B de conjugado de 11-deshidro-TxB2-fosfatasa alcalina (Assay Designs, Inc. 1:80 DCC) diluido 1:3.000 en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4.

15 4. Reactivo C de BCIP/NBT preparado según las instrucciones del fabricante: preparación patrón – 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua, disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7; y

5. Reactivo D, una disolución de parada de ácido sulfúrico 0,25 M.

Se prepararon cinco disoluciones de muestra que contienen 5, 1, 0,2, 0,04, 0 ng/ml de analito 11-deshidro-TxB2 (80-0735) de Assay Designs, Inc. disuelto en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,25%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS pH 7,4.

20 Para el primer dispositivo capilar de flujo lateral se añadieron a los depósitos A, B, y C respectivamente 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo A y 135 µl de muestra que contiene 5 ng/ml de analito, 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo B y 135 µl de muestra que contiene 5 ng/ml de analito y 300 µl de reactivo C.

25 Para el segundo dispositivo capilar de flujo lateral, se añadieron a los depósitos A, B y C 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo A y 135 µl de muestra que contiene 1 ng/ml de analito, 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo B y 135 µl de muestra que contiene 1 ng/ml de analito y 300 µl de reactivo C.

Para el tercer dispositivo capilar de flujo lateral se añadieron a los depósitos A, B y C 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo A y 135 µl de muestra que contiene 0,2 ng/ml de analito, 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo B y 135 µl de muestra que contiene 0,2 ng/ml de analito y 300 µl de reactivo C.

30 Para el cuarto dispositivo capilar de flujo lateral se añadieron a los depósitos A, B y C 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo A y 135 µl de muestra que contiene 0,04 ng/ml de analito, 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo B y 135 µl de muestra que contiene 0,04 ng/ml de analito y 300 µl de reactivo C.

Par el quinto dispositivo capilar de flujo lateral se añadieron a los depósitos A, B y C 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo A y 135 µl de muestra que contiene 0 ng/ml de analito, 150 µl de una mezcla de 15 µl de reactivo B y 135 µl de muestra que contiene 0 ng/ml de analito y 300 µl de reactivo C.

35 Después de drenaje completo de los tres depósitos en el orden A, B y C según las enseñanzas de la presente invención, se añadieron 120 µl de reactivo D al depósito C de cada uno de los dispositivos capilares de flujo lateral.

Los colores de las líneas de ensayo y líneas de control se midieron usando un lector PART Pro (LRE Technology Partner GmbH) y se calculó el nivel de analito unido del analito marcado en cada concentración de analito como la relación b/b_0 entre la reflexión a cada concentración 5, 1, 0,2, 0,04 ng/ml (b) y la reflexión a 0 ng/ml (b_0). Se obtuvo una curva de calibración representando los resultados, Figura 9.

5 Experimento 5: Determinación cuantitativa de 11-deshidro-TxB2 en orina

Se prepararon tres dispositivos capilares de flujo lateral sustancialmente similares al tercer dispositivo capilar de flujo lateral descrito en el Experimento 2 con reactivo A liofilizado en el depósito A, reactivo B liofilizado en el depósito B y reactivo C liofilizado en el depósito C.

10 A cada uno de los tres dispositivos capilares de flujo lateral se añadieron: 150 μ l de muestra de orina al depósito A, 150 μ l de la misma muestra de orina al depósito B y 300 μ l de agua doblemente destilada al depósito C. Después del drenaje completo secuencial de los depósitos A, B y C según las enseñanzas de la presente invención, se añadieron 120 μ l de disolución de parada D al depósito C.

15 Los colores de las líneas de ensayo y líneas de control se midieron usando un lector PART Pro (LRE Technology Partner GmbH) y se determinó la concentración de analito 11-deshidro-TxB2 en cada muestra de orina con referencia a la curva de calibración de la Figura 9. Se determinó que la primera muestra de orina contenía 5251 pg/ml, la segunda muestra de orina 907 pg/ml y la tercera muestra de orina 540 pg/ml de 11-deshidro-TxB2.

Experimento 6: Flujo de líquido secuencial en un dispositivo capilar de flujo lateral

20 Se preparó un dispositivo E capilar de flujo lateral sustancialmente como se describe anteriormente en el Experimento 1 con una matriz de flujo capilar de 50 mm x 32 mm. Se preparó un dispositivo F capilar de flujo lateral con una matriz de flujo capilar más corta de 40 mm x 32 mm y se montó de modo que solo el borde 36a del depósito A estuviera en contacto con la matriz 18 de flujo capilar. Las matrices de flujo capilar de ambos dispositivos E y F capilares de flujo lateral carecían de zonas de reacción y solo se trataron con una disolución de gelatina al 0,5%, Bacto-Triptona al 2,5% y trehalosa al 1% en PBS.

25 Se prepararon varios líquidos de reacción, disolución diluyente, reactivo A (amarillo), reactivo B (azul) y reactivo C (rojo) como se describe en el Experimento 3.

Uso de un dispositivo capilar de flujo lateral multidepósito

30 Se añadieron 150 μ l de reactivo A, 150 μ l de reactivo B y 300 μ l de reactivo C, uno tras otro, a los depósitos A, B y C respectivamente del dispositivo E capilar de flujo lateral. Se observó un drenaje secuencial de los depósitos A, B y C según las enseñanzas de la presente invención con una interfase bien definida que se observó que se movía según las enseñanzas de la presente invención.

Uso de un dispositivo capilar de flujo lateral de un solo depósito

Al depósito A del dispositivo F capilar de flujo lateral se añadieron uno tras otro 150 μ l de reactivo A, 150 μ l de reactivo B y 300 μ l de reactivo C, cada líquido sucesivo solo después de que el líquido previo se había drenado completamente.

35 El tiempo de drenaje para cada depósito se midió y listó en la Tabla 2.

Tabla 2: Tiempo de drenaje

Líquido	Depósito	Dispositivo E	Dispositivo F
A	A	0:3:07	
B	B	0:10:01	
C	C	0:25:20	
A	A		0:03:03
B	A		0:08:14
C	A		0:18:13

Experimento 7: Detección de anticuerpos de HIV 1 en una muestra de suero sanguíneo

40 Se preparó un dispositivo capilar de flujo lateral sustancialmente como se describe anteriormente en el Experimento 1 con una línea 20b de control como se describe en el Experimento 1 pero con una línea de ensayo 20a aplicada en

forma de línea de puntos producidos aplicando 1 microlitro de 0,7 mg/ml de antígeno de proteína recombinante de HIV 1, HIV-101 (ProSpec-Tany TechnoGene LTD) en tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,8) y disolución de trehalosa al 2% 36 mm desde el extremo aguas arriba de la matriz 18 de flujo capilar.

5 En el depósito A se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de 1 mg/ml de péptidos gp41 y gp120 sintéticos biotinilados diluida en BSA al 1%, suero de bovino fetal al 1%, TWEEN-20 al 0,5% en tampón de PBS, pH 7,4.

En el depósito B se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de conjugado de Streptavidina-fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 003-050-083) diluido en BSA al 1%, TWEEN-20 al 0,5%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4.

10 En el depósito C se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de BCIP/NBT preparado según las instrucciones del fabricante. Preparación patrón – 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua. Una disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7.

15 Se añadieron 150 µl de una muestra de suero, 150 µl de una muestra de suero y 300 µl de agua doblemente destilada, uno tras otro, a los depósitos A, B y C respectivamente del dispositivo capilar de flujo lateral. Se observó el drenaje secuencial de los depósitos A, B y C según las enseñanzas de la presente invención. Después de que el líquido en el depósito C se drenó completamente se añadieron 120 µl de reactivo D (disolución de parada de ácido sulfúrico 0,25 M) al depósito C.

20 La aparición de dos líneas discontinuas coloreadas, una en la línea de ensayo y otra en la línea de control, indicaba la presencia de anticuerpos para HIV 1 en la muestra de suero.

Experimento 8: Detección de antígeno superficial de hepatitis B en una muestra de suero sanguíneo usando un dispositivo capilar de flujo lateral de dos depósitos.

25 Un dispositivo capilar de flujo lateral se preparó sustancialmente como se describe anteriormente en el Experimento 1 excepto que la matriz de flujo capilar era de 45 mm x 32 mm y el drenaje de líquido inferior era de 7,8 mm x 73 mm y con una línea 20b de control como se describe en el Experimento 1, pero con una línea 20a de ensayo aplicada en forma de una línea de puntos producidos aplicando 1 microlitro de 0,7 mg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-HBsAg (Fitzgerald Industries International, Inc. 10-H05) en tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,8) y disolución de trehalosa al 2%. Cuando está montado en la carcasa, los bordes 34a y 34b de los depósitos A y B estaban en contacto con la matriz 18 de flujo capilar pero el borde 36c de depósito C no estaba en contacto con la matriz 18 de flujo capilar.

30 En el depósito A se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de conjugado de anti-HBsAg de conejo y fosfatasa alcalina diluido en BSA al 1%, suero fetal bovino al 1%, Tween-20 al 0,5%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4.

35 En depósito B se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de BCIP/NBT preparada según las instrucciones del fabricante. Preparación patrón - 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua. Una disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT, en 10 ml de tampón de Tris 0,1 M, pH 9,7.

40 Se añadieron 300 µl de una muestra de suero y 300 µl de agua destilada dos veces, uno tras otro, a los depósitos A y B, respectivamente, del dispositivo capilar de flujo lateral. Se observó drenaje secuencial de los depósitos A y B según las enseñanzas de la presente invención. Después de que el líquido en el depósito B se drenó completamente, se añadieron 120 µl de disolución de parada de ácido sulfúrico 0.25 M al depósito B.

45 La aparición de dos líneas discontinuas coloreadas, una en la línea de ensayo y otra en la línea de control, indicaba la presencia de antígeno superficial de hepatitis B en la muestra de suero.

Experimento 9: Detección de señal fluorescente - muestras de gran volumen

Se prepararon cuatro dispositivos capilares de flujo lateral sustancialmente como se describe en el Experimento 1, en los que la zona 20 de reacción incluía sólo una línea 20a de ensayo pero ninguna línea de control.

50 Se preparó un reactivo H de anticuerpo anti-ratón-cy5 de conejo (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. 515-175-045) diluido en BSA al 1%, suero fetal bovino al 1%, Tween-20 al 0,5%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4.

Se añadieron 200 µl de reactivo H al depósito C del primer dispositivo capilar de flujo lateral.

Se añadieron 200 µl de reactivo H a los depósitos B y C del segundo dispositivo capilar de flujo lateral.

Se añadieron 200 µl de reactivo H a los depósitos A, B y C del tercer dispositivo capilar de flujo lateral.

Se añadieron 200 µl de reactivo H a los depósitos A, B y C del cuarto dispositivo capilar de flujo lateral. Después del drenaje completo del líquido del depósito C, se añadieron 200 µl adicionales de reactivo H al depósito C.

- 5 Había una correlación lineal entre la intensidad de fluorescencia emitida por una línea 20b de ensayo dada tal como se mide por el Inmunolector PART (LRE Technology Partner GmbH) y el volumen total de líquido añadido al respectivo dispositivo capilar de flujo lateral, véase el gráfico en la Figura 10.

Experimento 10: Detección de la secuencia de ADN HPV 16

Se preparó un dispositivo capilar de flujo lateral sustancialmente como se describe en el Experimento 1, en el que la matriz 18 de flujo capilar era nitrocelulosa Prima 40 (Schleicher & Schuell).

- 10 Se preparó una zona 20 de reacción aplicando una línea de puntos 36 mm desde el extremo aguas arriba de la matriz de flujo capilar, cada punto producido aplicando 1 microlitro de 5 µg/ml de sonda de oligonucleótido (5'GTTTC AGGACCCACAGGAGCGACCC (nt 106-130)) en NaCl 1,5 M y Na-citrato 0,15 M, disolución de pH 7,0. Después de secar a 37°C durante 15 minutos, la matriz 18 de flujo capilar se irradió con luz ultravioleta durante 5 minutos para fijar el ADN a la matriz 18 de flujo capilar.

- 15 Se sometió ADN celular de células CaSki a 30 ciclos de amplificación por PCR usando un primer cebador (5'AAGGGCGTAACCGAAATCGGT (nt 26-46)) y un segundo cebador biotinilado (5'GTTGTTTGCAGCTCTGTGC (nt 150-168)) específicos para secuencias HPV 16. La PCR se terminó con una etapa de desnaturalización y enfriamiento rápido a 4°C.

- 20 En el depósito A del dispositivo capilar de flujo lateral se colocaron 50 µl de producto de PCR desnaturalizado biotinilado, se diluyó 1:10 en disolución enfriada con hielo de NaCl 0,6 M, Ficoll 400 al 0,02%, gelatina al 0,02%, PVP al 1%, tampón de fosfato 20 mM, pH 7,5.

En depósito B del dispositivo capilar de flujo lateral se colocaron 50 µl de conjugado de Estreptavidina y fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 003-050-083) se diluyó en BSA al 1%, Tween-20 al 0,5%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4.

- 25 En el depósito C del dispositivo capilar de flujo lateral se colocaron 150 µl de reactivo C, se preparó BCIP/NBT según las instrucciones del fabricante: preparación patrón - 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua. Disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT, en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7.

- 30 Se observó el drenaje secuencial de los depósitos A, B, y C según las enseñanzas de la presente invención. Después de que el líquido en el depósito C se drenara completamente, una línea de color púrpura en la zona de reacción indicaba la presencia de las secuencias de ADN VPH 16.

Experimento 11: Detección de anticuerpos de HIV-1 usando conjugado liofilizado en una zona de reacción.

- 35 Se preparó un dispositivo capilar de flujo lateral sustancialmente como se describe anteriormente en el Experimento 7 excepto que se colocaron reactivos liofilizados como sigue:

En la zona de reacción se colocó disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de 1 mg/ml de péptidos gp41 y gp120 sintéticos biotinilados diluidos en BSA al 1%, suero bovino fetal al 1%, Tween-20 al 0,5% en tampón de PBS, pH 7,4.

El depósito A se mantuvo vacío.

- 40 En el depósito B se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de conjugado de Estreptavidina y fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 003-050-083) diluido en BSA al 1%, Tween-20 al 0,5%, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1 mM en tampón de PBS, pH 7,4.

- 45 En el depósito C se colocó una disolución liofilizada (como se describe anteriormente) de BCIP/NBT preparada según las instrucciones de preparación del fabricante. Preparación patrón - 1 comprimido de BCIP (Sigma-Aldrich B0274) que se disuelve en 1 ml de DMF, 1 comprimido de NBT (Sigma-Aldrich N55141) que se disuelve en 1 ml de agua. Una disolución final: 33 µl de disolución patrón de BCIP, 333 µl de disolución patrón de NBT, en 10 ml de tampón Tris 0,1 M, pH 9,7.

- 50 150 µl de una muestra de suero se aplicaron a la matriz 18 de flujo capilar a través de ventana 22 de observación, se añadieron 150 µl de muestra de suero al depósito B y 300 µl de agua doblemente destilada se añadieron al depósito C. Se observó el drenaje secuencial de los depósitos B y C según las enseñanzas de la presente invención. Después de que el líquido en el depósito C se drenara completamente se añadieron 120 µl de disolución de parada de ácido sulfúrico 0,25 M al depósito C.

La aparición de dos líneas discontinuas coloreadas, una en la línea de ensayo y la otra en la línea de control, indicaba la presencia de anticuerpos para VIH 1 en la muestra de suero.

5 En la sección experimental anterior las enseñanzas de la presente invención se ejemplificaron para el estudio de reacciones enzimáticas y para la detección de analitos específicos en una muestra. Como es evidente para un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la presente descripción, las enseñanzas de la presente invención son aplicables a muchos campos diferentes en los que se requiere la realización de reacciones multietapa, que incluyen pero no están limitados a, química medioambiental, biología celular y bioquímica.

10 Los métodos y procedimientos se han descrito aquí en forma de una serie de etapas en un orden seleccionado por ser lo más fácil de entender. Se debe hacer hincapié en que tal orden no es limitante, y se puede implementar cualquier método o procedimiento descrito aquí en el que las etapas se realizan en cualquier orden razonable para lograr el resultado deseado.

15 Aunque la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Por consiguiente, la presente invención se pretende que abarque todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, se han descrito enseñanzas de la presente invención en las que tiene lugar una reacción a temperatura ambiente. En realizaciones de la presente invención, un dispositivo capilar de flujo lateral se mantiene en un medio más caliente o más frío, por ejemplo, un congelador, un refrigerador, o una incubadora de modo que una reacción se realiza a una temperatura que es más caliente o más fría que la temperatura ambiente o para asegurar que se mantiene una temperatura específica deseada. Las realizaciones en las que se mantiene un dispositivo capilar de flujo lateral a una temperatura controlada incluyen durante toda una reacción o durante sólo parte de una reacción.

20 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, varias características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación apropiada.

25

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (24, 46) capilar de flujo lateral que comprende:
- a) una matriz (18) de flujo capilar absorbente de un solo camino que tiene un extremo (26) aguas arriba y un extremo (28) aguas abajo que definen una dirección (30) de flujo, siendo dicha matriz (18) compresible;
- 5 b) por lo menos dos depósitos (32) que incluyen un primer depósito aguas arriba y un segundo depósito aguas abajo en comunicación de fluido con dicha matriz (18) de flujo capilar cada uno a través de sus respectivas primera y segunda zonas (34) de recepción de líquido, estando situados los depósitos (32) entre los extremos y separados entre sí en la dirección (30) de flujo definida por la matriz (18) capilar;
- 10 cada uno de dicho primer y segundo depósitos (32) está en contacto con sus respectivas dichas zonas (34) de recepción de líquido, por medio de una abertura que constituye un conducto hueco que tiene un borde (36), caracterizado por el hecho de que:
- cada uno de dichos bordes (36) está presionando sobre dicha matriz (18),
- en el que los bordes (36) están presionados sobre dicha matriz (18) cuando la matriz (18) está seca;
- en el que una porción de dicha matriz de flujo capilar entre dichos dos bordes (36) es una zona (35) de creación de interfase; y
- 15 en el que el dispositivo (24, 46) es apropiado para un drenaje secuencial de dichos depósitos (32) en la dirección aguas abajo.
2. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 1, comprendiendo dicha matriz (18) fibras de vidrio y dichos capilares están comprendidos en espacios entre las fibras.
- 20 3. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 2, comprendiendo dicha matriz (18) fibras de vidrio.
4. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicha presión aplicada por dichos bordes (36) a la matriz de flujo capilar comprime la matriz (18) y reduce el área superficial/volumen a no más del 40% del grosor.
5. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que enfrente de cada uno de dichos bordes (36) está dispuesto un componente (38) de soporte que soporta dicha matriz (18) contra dicha presión.
- 25 6. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 5, en el que dicha matriz (18) está suspendida entre dichos bordes (36) y dichos componentes (38) de soporte.
7. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha matriz (18) está unida a un refuerzo (48) impermeable.
- 30 8. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 7, en el que dicho refuerzo (48) impermeable está en contacto con por lo menos un componente (38) de soporte que soporta dicho refuerzo (48) impermeable contra dicha presión.
9. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 8, en el que enfrente de cada uno de dichos bordes (36) está dispuesto uno de dichos componentes (38) de soporte que soporta dicha matriz (18) contra dicha presión.
- 35 10. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente, aguas abajo de por lo menos una dicha zona (34) de recepción de líquido, una zona (20) de reacción que comprende por lo menos una entidad de captura configurada para capturar un material que fluye a través de dicha matriz (18) de flujo capilar.
11. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente un drenaje de líquido en comunicación de fluido con dicha matriz (18) de flujo capilar aguas abajo de la zona (20) de reacción.
- 40 12. El dispositivo (24, 46) de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha comunicación de fluido a través de dichas zonas (34) de recepción de líquido es comunicación de fluido no capilar.
13. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha zona (35) de creación de interfase tiene una longitud de por lo menos 50% de una dimensión de una dicha zona (34) de recepción de líquido en dicha dirección (30) de flujo.
- 45 14. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la expansión inducida por líquido de dicha zona (35) de creación de interfase no está restringida.

15. El dispositivo (24, 46) de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente una carcasa (40) que contiene dicha matriz (18) de flujo capilar.
16. El dispositivo (24, 46) de la reivindicación 15, en el que los lados de dicha matriz (18) de flujo capilar están desprovistos de contacto con dicha carcasa (40).
- 5 17. Un kit para montaje de un dispositivo (24, 46) capilar de flujo lateral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- a) una matriz (18) de flujo capilar absorbente de un solo camino que tiene un grosor; y por lo menos dos dispositivos que tienen b) y c):
- 10 b) un primer componente (62), que incluye un depósito (32) con por lo menos una pared configurado para contener líquidos y un área inferior, dicha área inferior definida por un conducto (63) hueco no capilar con un borde (36) y por lo menos una extensión (66) que sobresale de una superficie exterior de dicha pared; y
- 15 c) un segundo componente (64), que incluye un cuerpo (74) con una plataforma (76) contra-soporte en un extremo superior y por lo menos una extensión (68) que sobresale de dicho cuerpo (74) en el que una dicha extensión (66) de dicho primer componente (62) y una dicha extensión (68) de dicho segundo componente (74) están configuradas para acoplarse mutuamente de modo que dicho borde (36) y dicha plataforma (76) contra-soporte estén separados por una distancia y sean sustancialmente paralelos, en el que dicha distancia es suficiente de modo que un dicho borde (36) presione sobre dicha matriz (18) cuando está seca cuando dichos dos componentes (62, 64) se acoplan alrededor de dicha matriz (18).
18. El kit de la reivindicación 17, en el que dicha matriz (18) está unida a un refuerzo (48) impermeable.
- 20 19. El kit de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, comprendiendo adicionalmente dicha matriz (18) de flujo capilar una zona (20) de reacción que comprende por lo menos una entidad de captura configurada para capturar un material que fluye a través de dicha matriz (18) de flujo capilar.

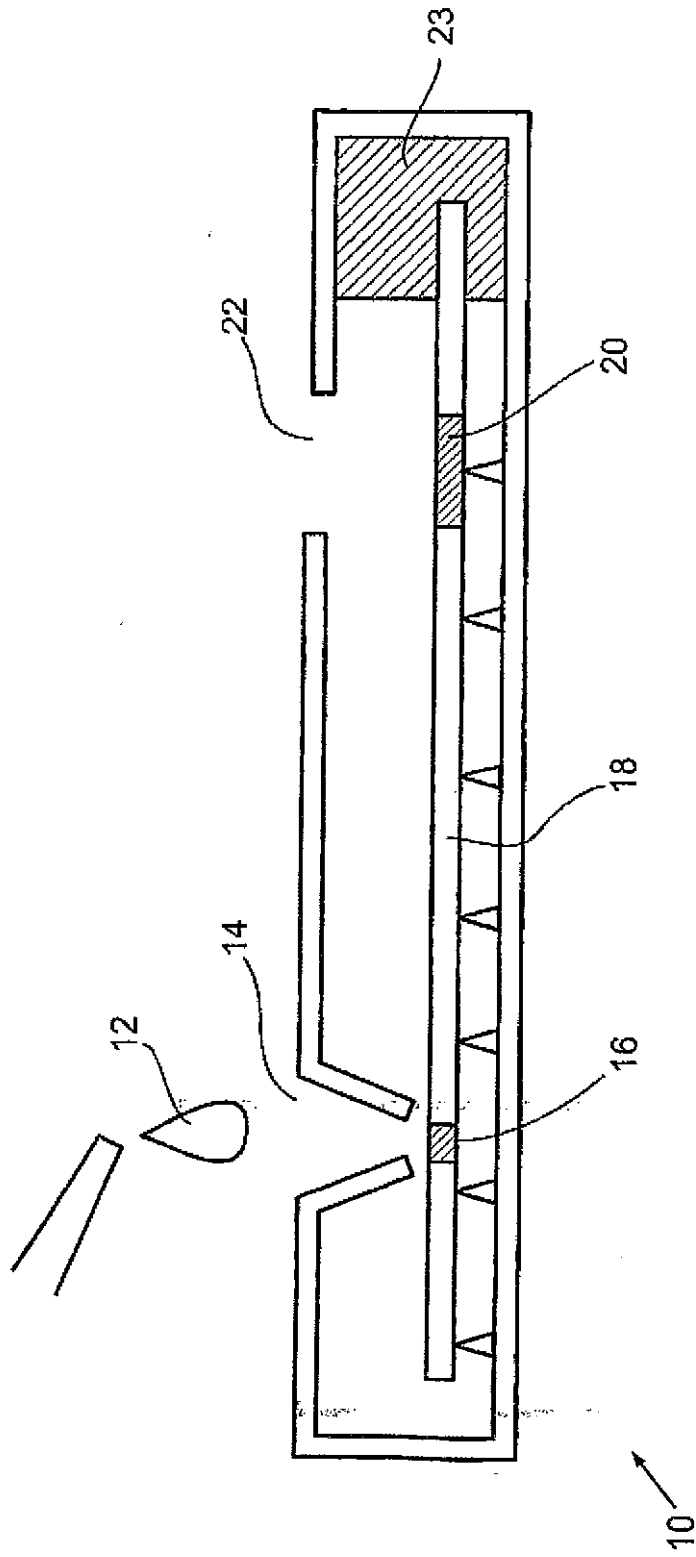


Fig. 1 (TÉCNICA ANTERIOR)

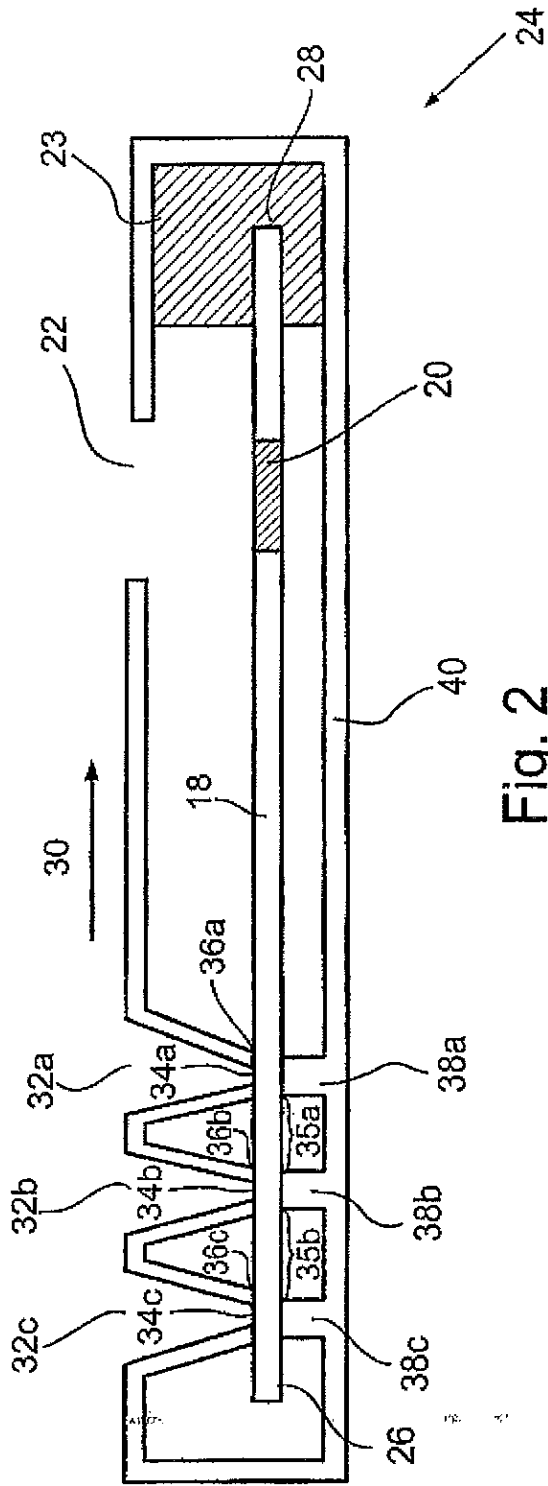


Fig. 2

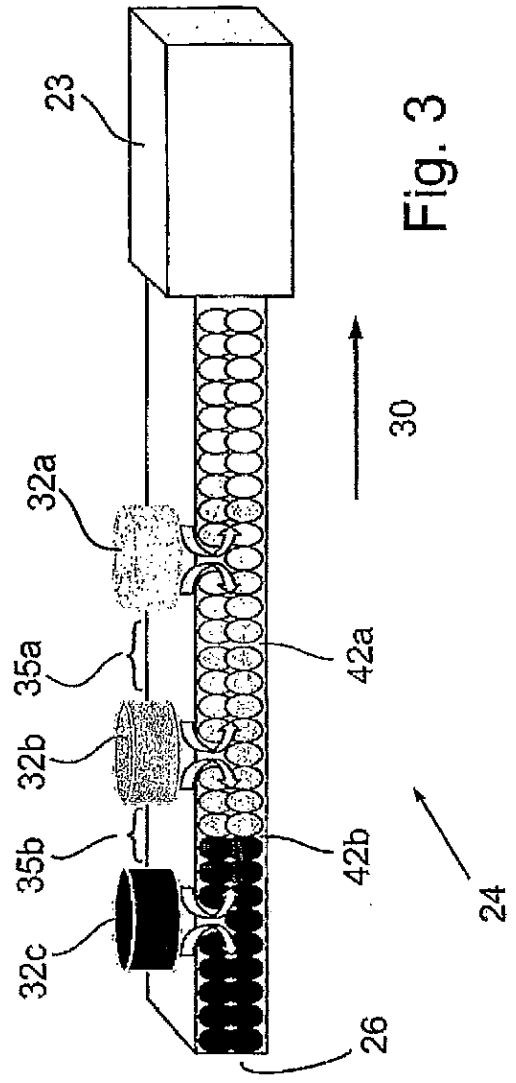


Fig. 3

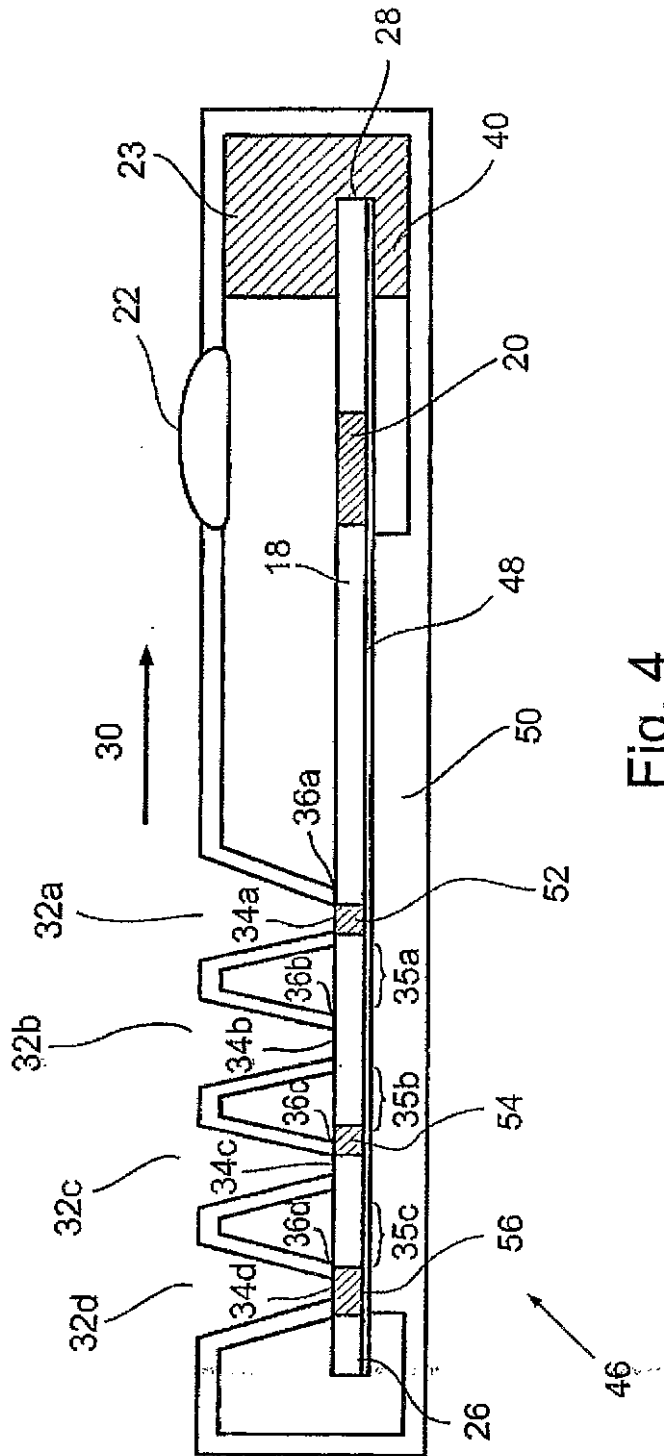
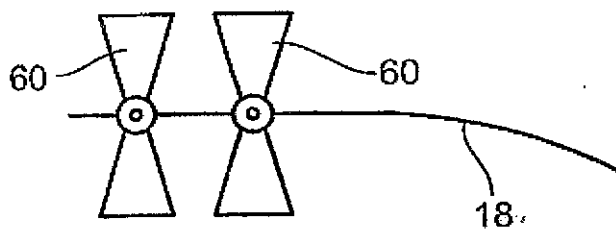
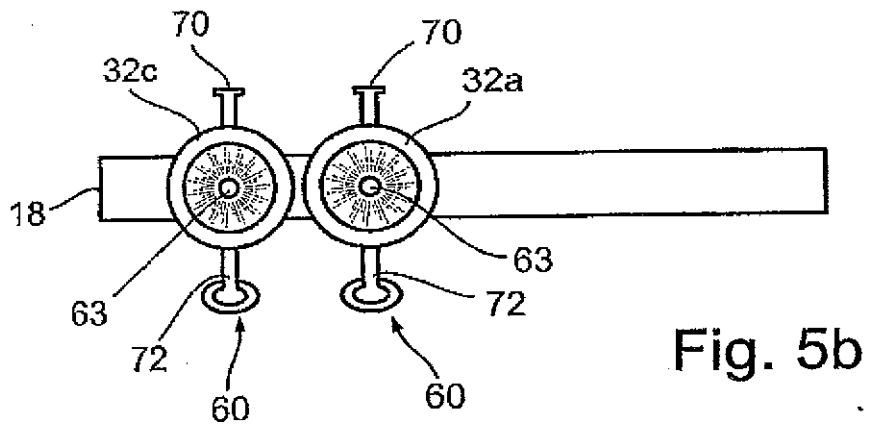
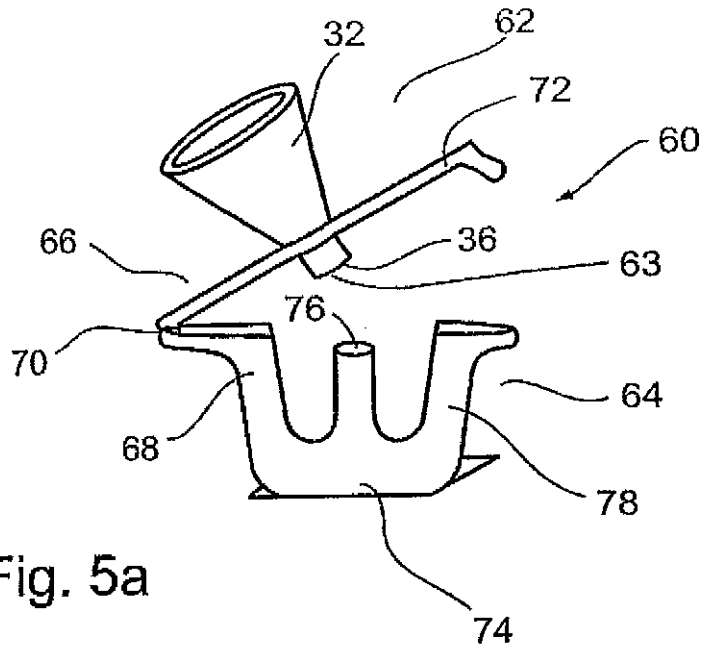


Fig. 4



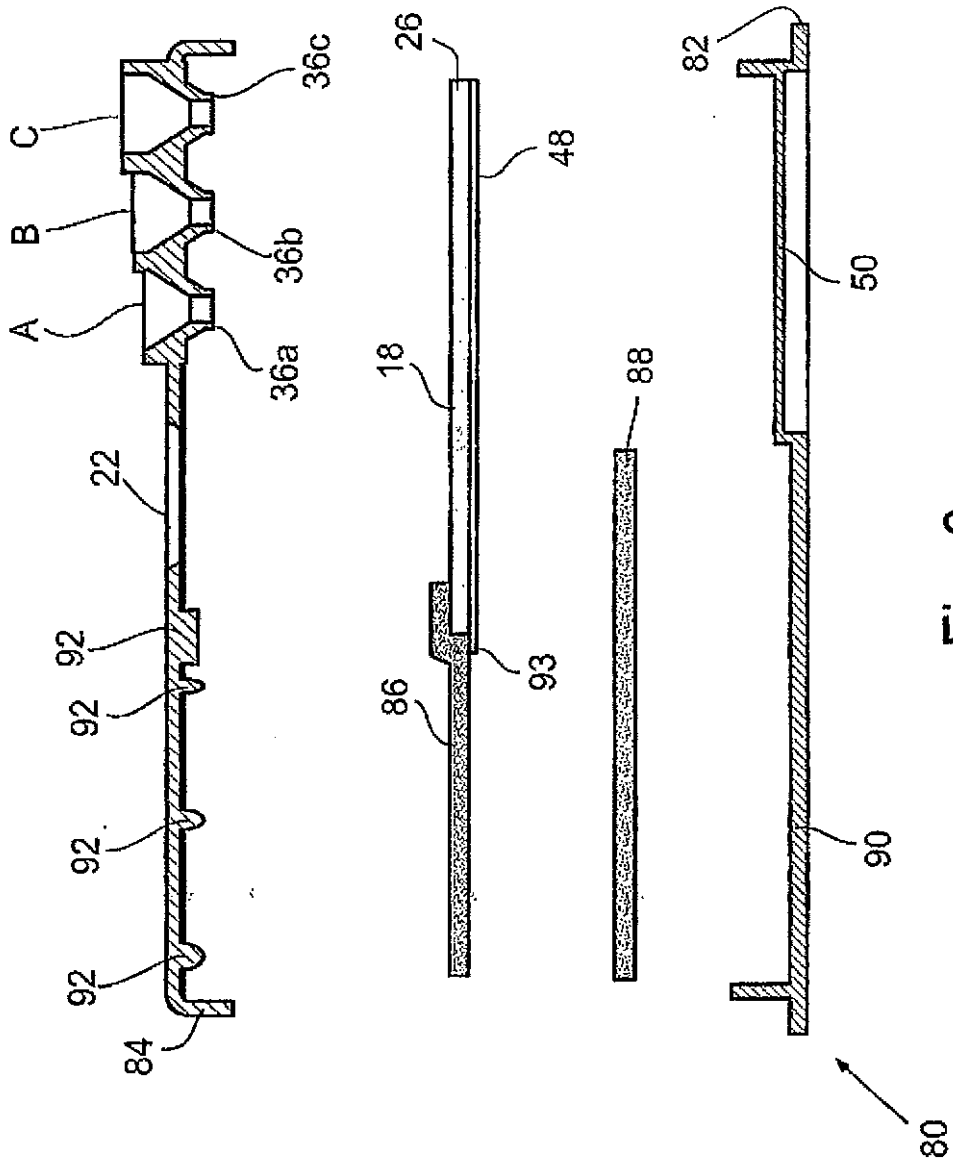


Fig. 6a

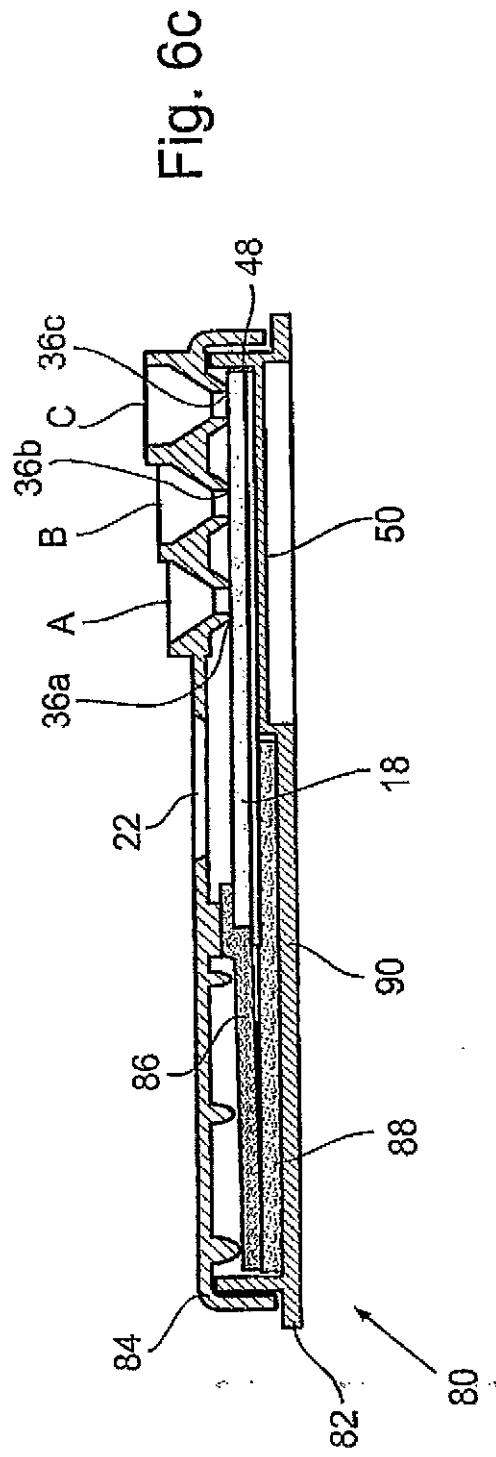
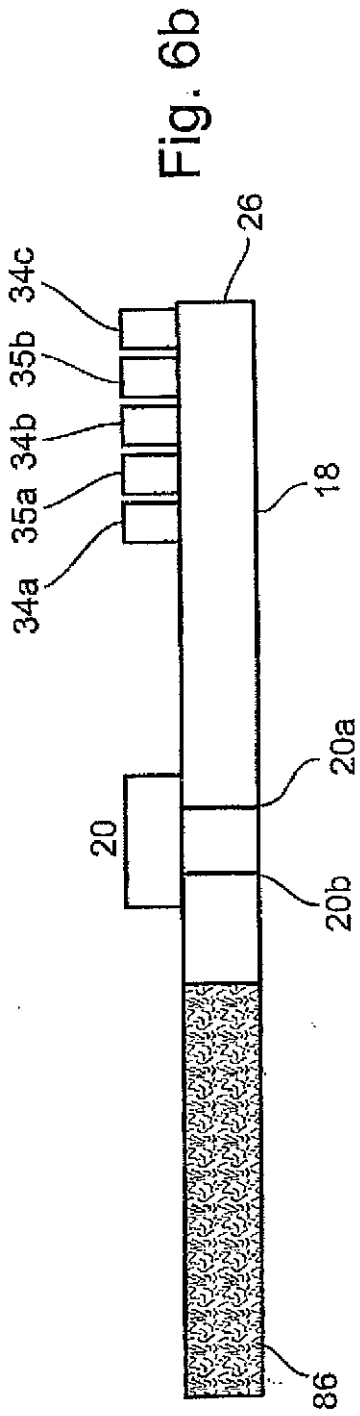


Fig. 7a

Fig. 7b

Fig. 7c

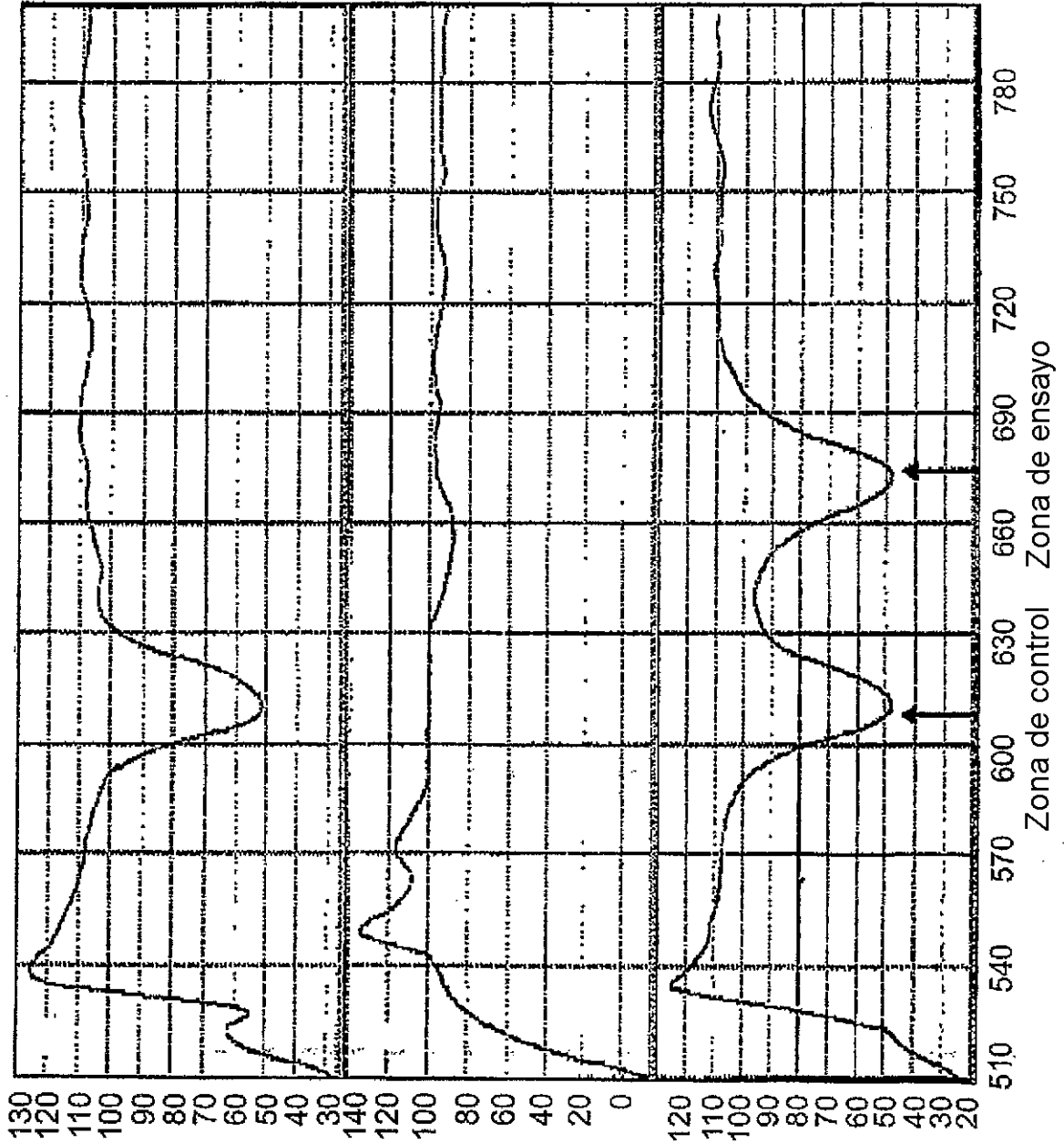


Fig. 8c

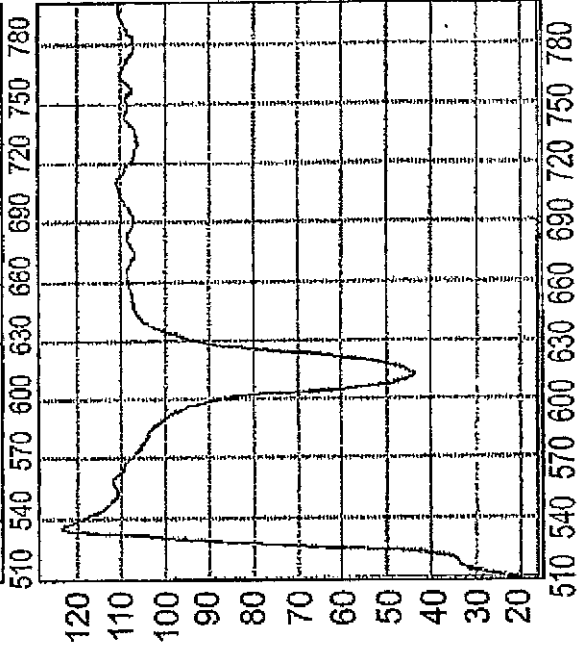
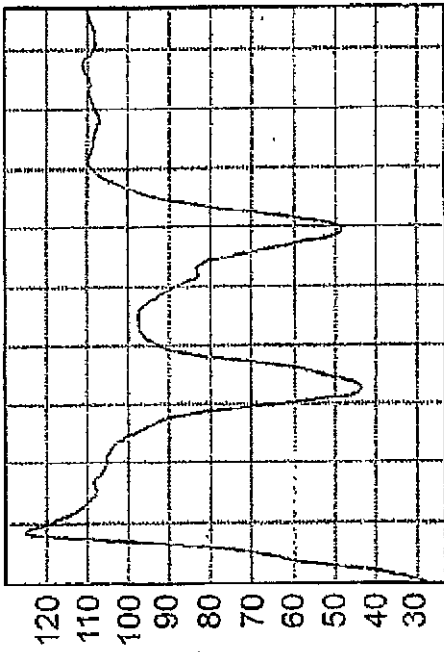


Fig. 8d

Fig. 8a

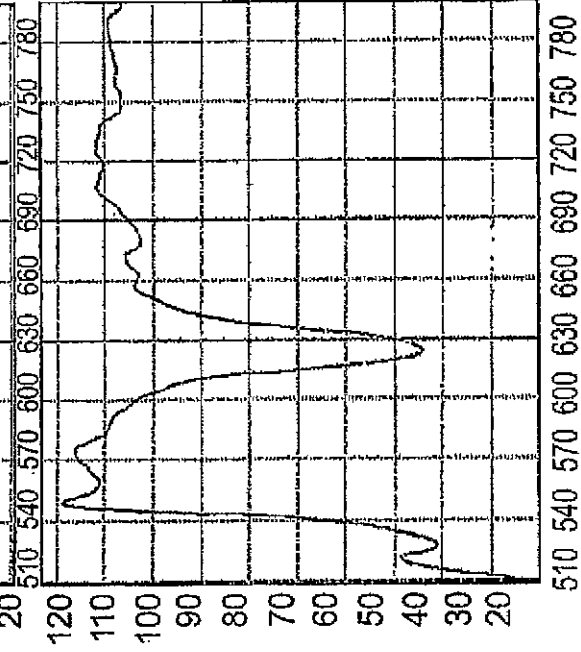
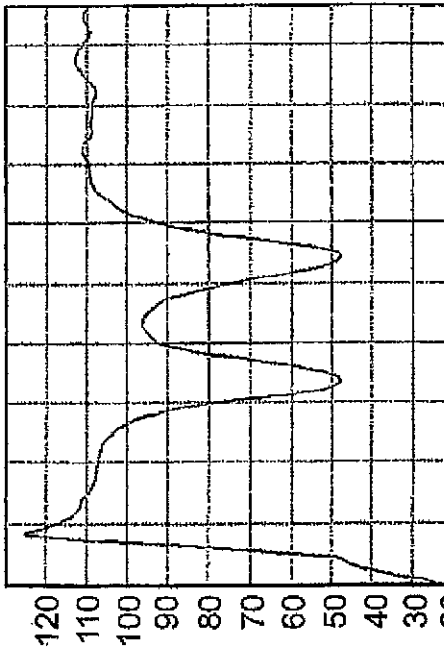


Fig. 8b

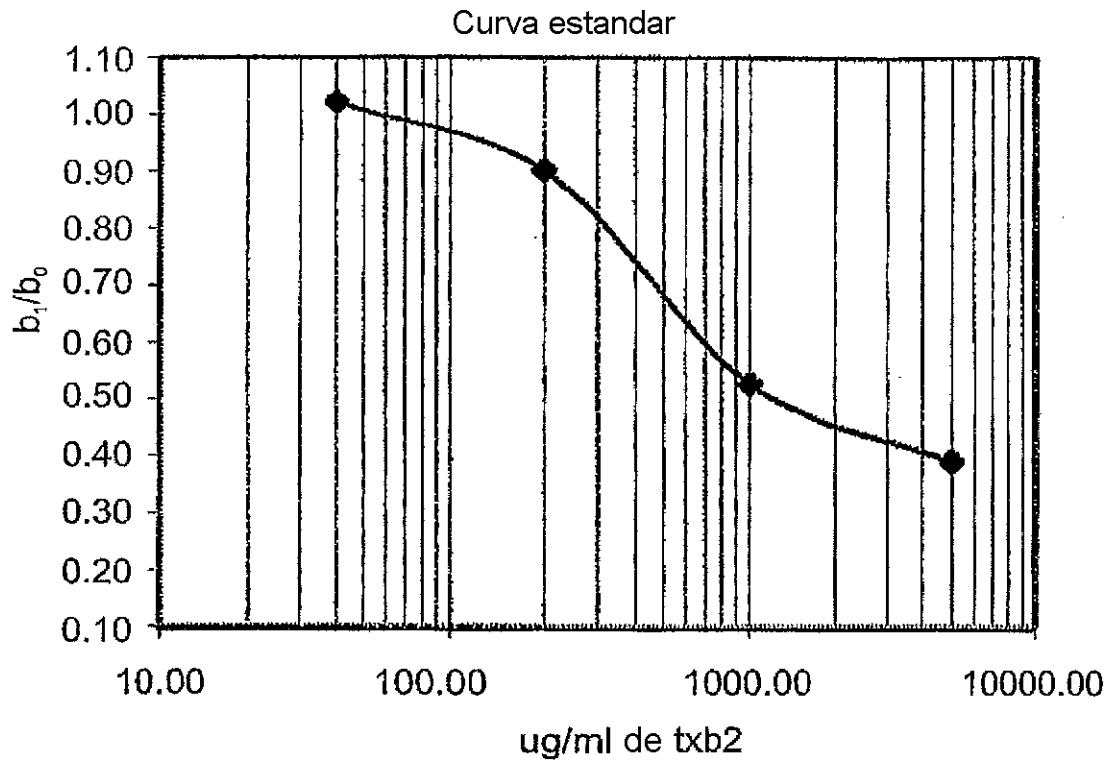


Fig. 9

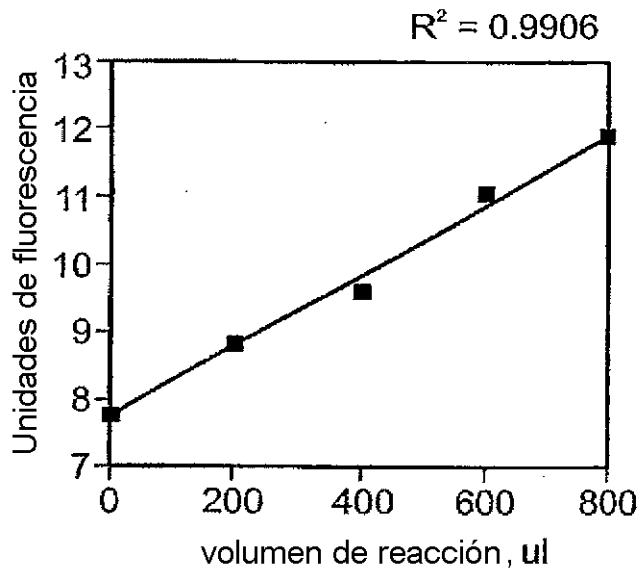


Fig. 10