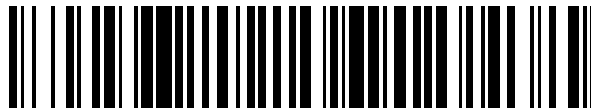


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 561**

51 Int. Cl.:

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2007 PCT/US2007/080917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08063770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007 E 07868405 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2066777**

54 Título: **Reducción de la interferencia óptica en un dispositivo hidráulico**

30 Prioridad:

13.10.2006 US 549558
13.03.2007 US 685615

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

THERANOS, INC. (100.0%)
1701 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:

GIBBONS, IAN y
O'CONNEL, MICHAEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 561 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

Reducción de la interferencia óptica en un dispositivo hidráulico

Antecedentes de la invención

5 El descubrimiento de un gran número de biomarcadores de enfermedad y el establecimiento de sistemas hidráulicos miniaturizados han abierto nuevas vías para idear métodos y sistemas para la predicción, el diagnóstico y el control del tratamiento de enfermedades en un entorno de diagnóstico inmediato. Una prueba de diagnóstico inmediato es particularmente deseable debido a que aporta rápidamente resultados a los pacientes y los profesionales médicos y permite una consulta más rápida entre pacientes y profesionales sanitarios. El diagnóstico temprano permite que un profesional empiece el tratamiento antes y evitando así el deterioro sin atención de una afección de un paciente. El control frecuente de parámetros apropiados tales como niveles de biomarcadores y concentraciones de agentes terapéuticos permite el reconocimiento de la eficacia de una terapia farmacológica o una percepción temprana de que el paciente está siendo dañado por la terapia. Ejemplos de análisis de diagnóstico inmediato incluyen pruebas de glucosa, tiempo de protrombina, drogas, colesterol sérico, embarazo y ovulación.

10 Los dispositivos hidráulicos pueden utilizar un número de ensayos diferentes para detectar un analito de interés en una muestra de fluido corporal procedente de un sujeto. En ensayos de ELISA (una técnica preferida para ensayos clínicos, especialmente en un contexto de diagnóstico inmediato), si reactivos de ensayo tales como conjugados de enzima-anticuerpo y sustratos para enzima permanecen en el dispositivo hidráulico después de que se realice el ensayo, reactivos no unidos a la superficie de captura de ensayo o reactivos en exceso, si se recogen en el mismo dispositivo hidráulico, pueden reaccionar entre sí y crear una señal que puede interferir con la señal de interés producida por el ensayo. Este es especialmente el caso en ensayos luminogénicos en los que los reactivos de ensayo generan luz, en contraste con ensayos que miden, por ejemplo, la absorbancia o la fluorescencia. Muchos ensayos luminogénicos usan una enzima para generar luminiscencia mejorando así la sensibilidad del ensayo mediante la amplificación de la especie medida. Por otra parte, en sistemas de ensayo que contienen todos los componentes de ensayo, incluyendo lavados residuales en un pequeño alojamiento, el potencial para hacer brillar materiales residuales luminogénicos se mejora adicionalmente. En tales formatos de ensayo, el reactivo marcado con enzima en exceso o no unido puede reaccionar con un sustrato para enzima, creando así señales interferentes no deseadas.

15 Algunas características de los dispositivos hidráulicos pueden mitigar el problema de una señal interferente en un cierto grado. Por ejemplo, el cuerpo del dispositivo hidráulico puede ser opaco, aislando ópticamente el brillo no deseado, o el sistema de detección puede estar configurado para rechazar luz que no se origina desde zonas de reacción dentro del dispositivo hidráulico. Sin embargo, estas características mitigadoras pueden no eliminar suficientemente la interferencia ya que la luz puede atravesar todavía elementos transparentes del dispositivo hidráulico e interferir con la señal de interés. Este es especialmente el caso en ensayos que requieren una alta sensibilidad en los que la relación entre la señal generada del ensayo puede representar solo una pequeña fracción, p. ej. menos de 1 parte en 10.000, del reactivo generador de señales total.

20 Los documentos US 2003/0152927 y US 6.352.862 describen dispositivos hidráulicos que comprenden una unidad de recogida de muestra, un conjunto de ensayo en comunicación hidráulica con la misma y un conjunto de extinción que comprende un absorbente. El documento US 6.121.055 se refiere a un agente de extinción de la fluorescencia.

25 Así, sigue existiendo una necesidad considerable de dispositivos hidráulicos mejorados, especialmente dispositivos de diagnóstico inmediato, diseñados para minimizar señales ópticas interferentes.

Compendio de la invención

30 Un aspecto de la invención es un dispositivo hidráulico para detectar un analito en una muestra de fluido corporal. El dispositivo hidráulico comprende una unidad de recogida de muestra adaptada para proporcionar una muestra de fluido corporal al dispositivo hidráulico, un conjunto de ensayo en comunicación hidráulica con la unidad de recogida de muestra, en donde el conjunto de ensayo está adaptado para proporcionar una señal óptica indicativa de la presencia o cantidad del analito en la muestra de fluido corporal, y un conjunto de extinción en comunicación hidráulica con dicho conjunto de ensayo, en donde el conjunto de extinción está adaptado para reducir la interferencia de la señal óptica.

35 Según esto, la invención proporciona un dispositivo hidráulico para detectar un analito en una muestra, que comprende: una unidad de recogida de muestra; un conjunto de ensayo que comprende al menos una zona de reacción, comprendiendo dicha zona de reacción una superficie e inmovilizado sobre la misma un reaccionante que forma un complejo que comprende el analito; una primera cámara para reactivo que comprende un conjugado enzimático; una segunda cámara para reactivo que comprende un sustrato para enzima, en donde el sustrato para enzima reacciona con el conjugado enzimático para producir una señal luminiscente; y canales hidráulicos que conectan las cámaras para reactivo con al menos una zona de reacción; caracterizado por que el dispositivo hidráulico también comprende un conjunto de extinción que comprende un material absorbente y el agente de extinción ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3,4'-disulfónico que inhibe la reacción luminiscente entre el conjugado

enzimático y el sustrato para enzima; y una pluralidad de canales hidráulicos que conectan la unidad de recogida de muestra y el conjunto de extinción con el conjunto de ensayo.

5 El conjunto de ensayo incluye cámaras para reactivo que comprenden reactivos usados en el ensayo y al menos una zona de reacción que comprende un reaccionante que se une al analito. Los reactivos comprenden un conjugado enzimático y un sustrato para enzima.

El conjunto de extinción incluye una zona de extinción en comunicación hidráulica con la zona de reacción y un agente de extinción en la zona de extinción. El conjunto de extinción también incluye un material absorbente, que puede ser, por ejemplo, fibra de vidrio, sílice, papel, gel de poliacrilamida, agarosa o agar.

10 El material absorbente puede estar impregnado con el agente de extinción. El agente de extinción desactiva al menos un reactivo del ensayo y de ese modo reduce la señal óptica interferente. El agente de extinción es ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3,4'-disulfónico.

En algunas realizaciones, el conjunto de ensayo está adaptado para realizar un inmunoensayo, que será un ensayo quimioluminiscente. El conjunto de extinción puede estar adaptado para eliminar sustancialmente la interferencia.

15 En algunas realizaciones, el dispositivo hidráulico tiene una cámara para residuo, en donde la cámara para residuo incluye la zona de extinción.

20 Otro aspecto de la invención es un sistema para detectar un analito en una muestra. El sistema comprende un dispositivo hidráulico según la invención que tiene un conjunto de ensayo configurado para proporcionar una señal óptica que es indicativa de la presencia del analito, y un conjunto de extinción en comunicación hidráulica con dicho conjunto de ensayo, en donde dicho conjunto de extinción está adaptado para reducir la interferencia de dicha señal óptica, y un conjunto de detección para detectar dicha señal óptica.

En algunas realizaciones, el sistema también incluye un conjunto de comunicación para transmitir dicha señal óptica a un dispositivo externo.

25 El conjunto de ensayo comprende cámaras para reactivo que tienen al menos un reactivo usado en el ensayo y al menos una zona de reacción que comprende un reaccionante que se une al analito. El al menos un reactivo puede incluir un conjugado enzimático y un sustrato para enzima.

30 El conjunto de extinción comprende una zona de extinción en comunicación hidráulica con la zona de reacción y un agente de extinción en la zona de extinción. El conjunto de extinción puede incluir un material absorbente tal como fibra de vidrio, sílice, papel, gel de poliacrilamida, agarosa o agar. El material absorbente puede estar impregnado con el agente de extinción, que puede estar adaptado para desactivar al menos un reactivo de dicho ensayo, reduciendo de ese modo dicha interferencia de dicha señal óptica. El agente de extinción es ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3,4'-disulfónico.

En algunas realizaciones del sistema, el conjunto de ensayo está adaptado para realizar un inmunoensayo, y además puede ser un ensayo quimioluminiscente.

El conjunto de extinción puede estar adaptado para eliminar sustancialmente la interferencia.

35 En algunas realizaciones del sistema hay una cámara para residuo, en donde la cámara para residuo comprende la zona de extinción.

40 Se describe en la presente memoria un método para detectar un analito en una muestra. El método comprende dejar que una muestra que se presume que contiene un analito reaccione con reactivos contenidos en un dispositivo hidráulico que tiene un conjunto de ensayo configurado para proporcionar una señal óptica que es indicativa de la presencia del analito, y un conjunto de extinción en comunicación hidráulica con dicho conjunto de ensayo, en donde dicho conjunto de extinción está adaptado para reducir la interferencia de dicha señal óptica, y detectar dicha señal óptica detectando de ese modo el analito en la muestra.

45 Se describe en la presente memoria un método para fabricar un dispositivo hidráulico que tiene un conjunto de extinción. El método incluye proporcionar una pluralidad de capas del dispositivo hidráulico, fijando dichas capas entre sí para proporcionar una red hidráulica entre una unidad de recogida de muestra, al menos una cámara para reactivo, al menos una zona de reacción y al menos un conjunto de extinción.

En algunos casos, la fijación comprende la soldadura ultrasónica de las capas entre sí.

Breve descripción de los dibujos

50 Las nuevas características de la invención se indican con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y las ventajas de la presente invención se obtendrá mediante referencia a la siguiente descripción detallada que indica realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos, de los que:

Las figuras 1 y 2 muestran vistas desde arriba y desde abajo de un dispositivo hidráulico ejemplar, que ilustra la conectividad hidráulica.

Las figuras 3 y 4 muestran una vista desde arriba y desde abajo, respectivamente, de un dispositivo hidráulico ejemplar de la presente invención.

5 La figura 5 ilustra los diferentes componentes y capas de un dispositivo hidráulico ejemplar.

La figura 6 muestra un sistema ejemplar de la presente invención.

La figura 7 muestra un ensayo en dos etapas.

La figura 8 representa un ensayo quimioluminiscente ejemplar.

Descripción detallada de la invención

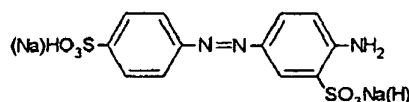
10 Dispositivo hidráulico

En general, el material absorbente es secante y la fracción en volumen de aire es generalmente aproximadamente 10 - 70% del material absorbente. El material absorbente ayuda a absorber líquidos residuales usados en el ensayo y por lo tanto evita la fuga de fluido desde el dispositivo hidráulico, ya que puede ser deseable evitar la contaminación sobre o dentro de un dispositivo de detección usado junto con el dispositivo hidráulico para detectar la señal óptica.

15 En algunos casos, el material absorbente comprende al menos un agente de extinción que reacciona con al menos un reactivo de dicho conjunto de ensayo para reducir la interferencia de la señal óptica indicativa de la presencia del analito en la muestra. El agente de extinción puede inhibir la unión entre reactivos, o en realizaciones preferidas el agente de extinción desactiva al menos uno y más preferiblemente todos los reactivos que pueden contribuir a una señal óptica interferente.

20 El reactivo o los reactivos con los que reacciona el agente de extinción en el conjunto de extinción para reducir la interferencia puede ser, por ejemplo, sin limitación, una enzima no unida y/o un sustrato no unido. El reactivo con el que el agente de extinción reacciona para reducir la interferencia generalmente no es tan importante como la reducción de la propia interferencia. Preferiblemente, un agente de extinción en cuestión reduce una señal óptica interferente en al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o más. En un caso preferido, el agente de extinción reduce una señal óptica interferente en aproximadamente 99%. En otros casos preferidos, el conjunto de extinción reduce la interferencia óptica en al menos aproximadamente 99,5%. En más casos preferidos, el agente de extinción reduce la interferencia óptica en al menos aproximadamente 99,9%.

30 El agente de extinción es ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3,4'-disulfónico que tiene la estructura:



La sustancia usada para impregnar o saturar el material absorbente preferiblemente está muy concentrada, típicamente en un gran exceso molar de los reactivos de ensayo.

35 Generalmente, el conjunto de extinción posee ciertas propiedades deseables algunas de las cuales, a modo de ejemplo, se describen ahora. Cuando el conjunto de extinción comprende un material absorbente, la absorción de líquidos residuales es preferiblemente rápida con relación a la duración del ensayo. En casos preferidos, la absorción de líquidos residuales se produce en unos pocos minutos y más preferiblemente en unos pocos segundos.

40 El material absorbente absorbe preferiblemente sustancialmente todo el líquido residual en el dispositivo hidráulico. En realizaciones preferidas, se absorbe más de 99% del líquido en la cámara para residuo. Además de reducir la interferencia óptica, esto ayuda a evitar que el líquido se fugue del dispositivo hidráulico después de que se complete el ensayo, lo que ayuda a evitar la contaminación de un dispositivo de detección que se puede usar con el dispositivo hidráulico que se describe en la presente memoria.

La inhibición de la actividad enzimática del conjunto de extinción preferiblemente debe ser rápida, típicamente en unos pocos minutos y más preferiblemente en unos pocos segundos.

45 La reacción enzimática inhibidora debe ser tan completa como sea posible para asegurar que la interferencia se reduzca tanto como sea posible. En realizaciones preferidas, la desactivación de la reacción enzimática debe completarse en más de 99% antes de que la señal óptica indicativa de la presencia del analito en la muestra se detecte mediante cualquier mecanismo de detección que se pueda usar con el dispositivo hidráulico que se describe en la presente memoria.

En casos preferidos, el conjunto de extinción comprende un material absorbente y, como tal, la sustancia de extinción embebida en el mismo es preferiblemente estable dentro del material absorbente. Por otra parte, el agente de extinción se disuelve preferiblemente en segundos a minutos de exposición a los líquidos residuales.

5 En algunos casos, el conjunto de extinción comprende la cámara para residuo. Una cámara para residuo es generalmente una cámara o pozo en comunicación hidráulica con el conjunto de ensayo en el que los reactivos de ensayo y la muestra que no se unen a la zona de reacción en el conjunto de ensayo se recogen después del ensayo. Como los fluidos residuales permanecen en el dispositivo hidráulico después del ensayo, la cámara para residuo es generalmente el área del dispositivo hidráulico en la que cualesquiera reactivos y muestras no unidos o en exceso se recogen después del ensayo. En casos en los que el conjunto de extinción comprende un material absorbente, el material absorbente se puede adaptar para estar alojado dentro de la cámara para residuo. El material absorbente puede o no llenar toda la cámara para residuo, y se puede expandir cuando un fluido entra en la cámara para residuo.

15 El conjunto de extinción también puede comprender una forma estabilizadora adaptada para estabilizar o asegurar el material absorbente dentro del dispositivo hidráulico. Por ejemplo, una cámara para residuo adaptada para alojar el material absorbente también puede comprender un perno o barra que se proyecta desde la parte superior de la cámara para residuo para entrar en contacto con y estabilizar o asegurar la almohadilla absorbente.

20 Las figuras 1 y 2 muestran una vista desde arriba y desde abajo, respectivamente, de un dispositivo hidráulico ejemplar después de que el dispositivo se haya montado. Las diferentes capas se diseñan y se fijan para formar una red de canales hidráulicos tridimensionales. Una unidad 4 de recogida de muestra proporciona una muestra de fluido corporal procedente de un paciente. Como se explicará con más detalles posteriormente, un conjunto de lectura comprende elementos de accionamiento (no mostrados) que pueden accionar el dispositivo hidráulico para la puesta en marcha y dirigir el flujo de una muestra de fluido corporal y reactivos de ensayo en el dispositivo hidráulico. En algunas realizaciones, en primer lugar los elementos de accionamiento provocan el flujo de la muestra en el dispositivo hidráulico 2 desde la unidad 4 de recogida de muestra hasta las zonas 6 de reacción, mueven la muestra ascendentemente en el dispositivo hidráulico desde el G' hasta el punto G, y a continuación hasta la cámara 8 para residuo en la que está alojado el material 9 absorbente. A continuación, los elementos de accionamiento inician el flujo de reactivos desde las cámaras 10 para reactivo hasta el punto B', el punto C' y el punto D', a continuación ascendentemente hasta los puntos B, C y D, respectivamente, a continuación hasta el punto A, descendentemente hasta el punto A', y a continuación hasta la cámara 8 para residuo del mismo modo que la muestra. Cuando la muestra y los reactivos entran en la cámara 8 para residuo, se encuentran con el conjunto 9 de extinción.

30 Para asegurar que un recuento de fotones dado producido en una zona de reacción se correlaciona con una concentración exacta de un analito de interés en una muestra, preferiblemente es ventajoso calibrar el dispositivo hidráulico antes de detectar los fotones. Calibrar un dispositivo hidráulico en el punto de fabricación, por ejemplo, puede ser insuficiente para asegurar que se determine una concentración de analito exacta debido a que un dispositivo hidráulico se puede transportar antes del uso y puede sufrir cambios en la temperatura, por ejemplo, de modo que una calibración realizada en la fabricación no tenga en cuenta ningún cambio posterior en la estructura del dispositivo hidráulico o los reactivos contenidos en el mismo. En una realización preferida de la presente invención, un dispositivo hidráulico tiene un conjunto de calibración que simula el conjunto de ensayo en componentes y diseño excepto que no se introduce una muestra en el conjunto de calibración. En referencia a las figuras 1 y 2, un conjunto de calibración ocupa aproximadamente la mitad del dispositivo 2 hidráulico e incluye cámaras 32 para reactivo, zonas 34 de reacción, una cámara 36 para residuo, canales 38 hidráulicos y material 9 absorbente. De forma similar al conjunto de ensayo, el número de cámaras para reactivo y las zonas de reacción pueden variar dependiendo del ensayo que se efectúe en el dispositivo hidráulico y del número de analitos que se detecten.

45 La figura 3 es una vista desde arriba de otra realización ejemplar de un dispositivo hidráulico. Se muestra una pluralidad de materiales 9 absorbentes. La figura 4 muestra una vista desde abajo de la realización de la figura 3.

La figura 5 ilustra la pluralidad de capas del dispositivo hidráulico ejemplar mostrado en las figuras 3 y 4. La posición del material 9 absorbente se muestra con relación a los otros componentes y capas del dispositivo hidráulico.

50 Un conjunto de detección como el mostrado en la figura 6 detecta a continuación la señal óptica indicativa de la presencia del analito en la muestra, y la señal detectada se puede usar a continuación para determinar la concentración del analito en la muestra. La figura 6 ilustra la posición de un conjunto de detección ejemplar que se puede usar para detectar una señal óptica procedente del dispositivo hidráulico que es indicativa de la presencia de un analito de interés en la muestra. El conjunto de detección puede estar por encima o por debajo del dispositivo hidráulico o en una orientación diferente en relación con el dispositivo hidráulico basándose, por ejemplo, en el tipo de ensayo que se realice y el mecanismo de detección que se emplee.

55 En realizaciones preferidas, se usa un detector óptico como el dispositivo de detección. Ejemplos no limitativos incluyen un tubo fotomultiplicador (PMT, por sus siglas en inglés), un fotodiodo, un detector de recuento de fotones o un dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés). Algunos ensayos pueden generar luminiscencia según se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, se detecta quimioluminiscencia. En algunas realizaciones, un conjunto de detección podría incluir una pluralidad de cables de fibra óptica conectados como un

haz a un detector CCD o a una serie de PMT. El haz de fibras ópticas podría estar construido por fibras discretas o por muchas fibras pequeñas fusionadas entre sí para formar un haz sólido. Tales haces sólidos están disponibles comercialmente y se conectan fácilmente a detectores CCD.

5 Conjuntos de detección ejemplares que se pueden usar con el dispositivo hidráulico se describen en la Solicitud de Patente Número de Serie 11/389.409, presentada el 24 de marzo de 2006.

10 La interferencia, o interferencia óptica, según se describe en la presente memoria significa generalmente una señal óptica producida en el dispositivo hidráulico que interfiere con la señal óptica producida por reaccionantes unidos, que es indicativa de la presencia de un analito de interés. Típicamente, esta señal interferente se produce en la cámara para residuo en la que los reactivos que no se unen a las zonas de reacción se acumulan y se encuentran entre sí. La acumulación de líquidos residuales puede producir esta interferencia cuando, por ejemplo, una enzima usada en un ensayo para incrementar la sensibilidad del ensayo reacciona con un sustrato no unido, creando una señal óptica que interfiere con la señal óptica generada por los reactivos unidos.

Método de uso

15 También se describe un método para detectar un analito en una muestra. El método comprende dejar que una muestra de fluido corporal que se presume que contiene el analito reaccione con reaccionantes contenidos en un dispositivo hidráulico que tiene un conjunto de ensayo configurado para proporcionar una señal óptica que es indicativa de la presencia del analito y un conjunto de extinción adaptado para reducir la interferencia de dicha señal óptica, y detectar la señal óptica detectando de ese modo el analito en la muestra.

20 Cualquier muestra de fluidos corporales que se presume que contiene un analito de interés se puede usar junto con el sistema o los dispositivos en cuestión. Fluidos corporales comúnmente empleados incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, saliva, orina, fluido gástrico y digestivo, lágrimas, heces, semen, fluido vaginal, fluidos intersticiales derivados de tejido tumoral, y fluido cerebroespinal. En algunos casos, los fluidos corporales se proporcionan directamente al dispositivo hidráulico sin procesamiento adicional. Sin embargo, en algunos casos, los fluidos corporales se pueden pretratar antes de realizar el análisis con dispositivos hidráulicos en cuestión. La elección de los pretratamientos dependerá del tipo de fluido corporal usado y/o la naturaleza del analito bajo investigación. Por poner un ejemplo, cuando el analito está presente a bajo nivel en una muestra de fluido corporal, la muestra se puede concentrar a través de cualesquiera medios convencionales para enriquecer el analito. Cuando el analito es un ácido nucleico, se puede extraer usando diversas enzimas líticas o soluciones químicas según los procedimientos indicados en Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual"), o usando resinas que se unen a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones adjuntas proporcionadas por los fabricantes. Cuando el analito es una molécula presente sobre o dentro de una célula, se puede realizar una extracción usando agentes líticos incluyendo, pero no limitados a, un detergente desnaturizante tal como SDS o un detergente no desnaturizante tal como Thesit®, desoxilato sódico, Triton X-100 y Tween-20.

35 Un fluido corporal puede extraerse de un paciente e introducirse en el dispositivo hidráulico de una variedad de modos, incluyendo, pero no limitados a, punción, inyección o pipeteado. En algunos casos, una lanceta perfora la piel y extrae la muestra hacia el dispositivo hidráulico usando, por ejemplo, gravedad, acción capilar, aspiración o una fuerza de vacío. En otro caso, cuando no se requiere un mecanismo activo, un paciente simplemente puede proporcionar un fluido corporal al dispositivo hidráulico, como por ejemplo podría ocurrir con una muestra de sangre o saliva. El fluido recogido se puede poner en la unidad de recogida de muestra dentro del dispositivo hidráulico donde el dispositivo hidráulico puede detectar automáticamente el volumen de muestra requerido que se va a usar en el ensayo. En otro caso, el dispositivo hidráulico comprende al menos una microaguja que perfora la piel. La microaguja se puede usar con un dispositivo hidráulico solo, o puede perforar la piel después de que el dispositivo hidráulico se inserte en un conjunto de lectura. Técnicas de recogida de muestra que se pueden usar en la presente memoria se describen en la Solicitud de Patente Número de Serie 11/389.409, presentada el 24 de marzo de 2006.

45 En algunos casos, una muestra de fluido corporal se puede proporcionar en primer lugar al dispositivo hidráulico mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria. A continuación, el dispositivo hidráulico se puede insertar en un conjunto de lectura según se muestra en la figura 6. Un detector de identificación alojado dentro del conjunto de lectura puede detectar un identificador del dispositivo hidráulico y comunicar el identificador con un conjunto de comunicación, que preferiblemente está alojado dentro del conjunto de lectura. A continuación, el conjunto de comunicación transmite el identificador a un dispositivo externo que transmite un protocolo para poner en marcha en el dispositivo hidráulico basado en el identificador para el conjunto de comunicación. Un controlador preferiblemente alojado dentro del conjunto de lectura controla los elementos de accionamiento incluyendo al menos una bomba y una válvula que interactúan con el dispositivo hidráulico para controlar y dirigir el movimiento del fluido dentro del dispositivo. El conjunto de lectura y sus componentes ilustrados en la figura 6 se describen más a fondo en la Solicitud de Patente Número de Serie 11/389.409, presentada el 24 de marzo de 2006.

55 Preferiblemente, el dispositivo hidráulico se calibra inicialmente usando un conjunto de calibración al hacer pasar los mismos reactivos que se usarán en el ensayo a través de las zonas de reacción de calibración, y a continuación una señal óptica procedente de las zonas de reacción es detectada por los medios de detección, y la señal se usa para calibrar el dispositivo hidráulico. Técnicas de calibración que se pueden usar en el dispositivo hidráulico en la

presente memoria se pueden encontrar en la Solicitud de Patente Número de Serie 11/389.409, presentada el 24 de marzo de 2006. La muestra que contiene un analito se introduce en el canal hidráulico. La muestra se puede diluir, mezclar y/o separar adicionalmente en plasma u otro componente deseado usando un filtro. A continuación, la muestra fluye a través de las zonas de reacción y los analitos presentes en la misma se unirán a los reaccionantes unidos en las mismas. A continuación, el fluido de muestra se barre de los pozos de reacción hacia una cámara para residuo. Dependiendo del ensayo que se realice, reactivos apropiados se dirigen a través de las zonas de reacción mediante los canales para llevar a cabo el ensayo. Cualquiera tampones de lavado y otros reactivos usados en las diversas etapas, incluyendo la etapa de calibración, se recogen en al menos una cámara para residuo. La señal producida en las zonas de reacción se detecta a continuación mediante cualquiera de los métodos de detección descritos en la presente memoria.

Una variedad de ensayos se puede realizar en un dispositivo hidráulico según la presente invención para detectar un analito de interés en una muestra.

El ensayo de detección se basa en la luminiscencia y, en particular, la quimioluminiscencia. En un caso, el ensayo emplea un conjugado enzimático que comprende, p. ej., una proteína conjugada con una enzima. La enzima puede reaccionar con un sustrato para generar una señal luminiscente. Se contempla que el ensayo pueda ser un ensayo directo o un ensayo competitivo, en el que un reaccionante no unido a un analito se expone a un reactivo que comprende una molécula de analito conjugada a la enzima. Además, un compuesto fluorescente se puede usar en tándem o acoplado con la reacción quimioluminiscente, a fin de multiplicar linealmente la señal de salida de la reacción.

En un ensayo en dos etapas ejemplar mostrado en la figura 7, la muestra que contiene analito ("Ag") fluye en primer lugar sobre una zona de reacción que contiene anticuerpos ("Ab"). Los anticuerpos se unen al analito presente en la muestra. Después de que la muestra pase sobre la superficie, una solución con analito conjugado a un marcador ("Ag marcado") a una alta concentración se hace pasar sobre la superficie. El conjugado satura cualquiera de los anticuerpos que no se hayan unido todavía al analito. Antes de que se alcance el equilibrio y se produzca cualquier desplazamiento de analito no marcado preunido, la solución de conjugado de alta concentración se elimina por lavado. La cantidad de conjugado unido a la superficie se mide a continuación mediante la técnica apropiada, y el conjugado detectado es inversamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

Una técnica de medida ejemplar para un ensayo en dos etapas es un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente como el mostrado en la figura 8. Como se conoce en la especialidad, el marcador puede ser un marcador disponible comercialmente tal como un fosfato de dioxetano, que no es luminiscente pero se vuelve luminiscente después de la hidrólisis mediante, por ejemplo, fosfatasa alcalina. Una enzima tal como fosfatasa alcalina se expone al conjugado para hacer que el sustrato emita luminiscencia. En algunas realizaciones, la solución de sustrato se complementa con agentes potenciadores tales como, sin limitación, fluoresceína en micelas mezcladas, polímeros solubles o PVC que crean una señal mucho más brillante que el luminóforo solo. El mecanismo por el que funciona el conjunto de extinción para reducir la interferencia no es crítico para la funcionalidad de la presente invención, con la condición de que la interferencia se reduzca en una cantidad suficiente.

Un ELISA es otro ensayo ejemplar para el que se puede usar un extintor óptico para retirar una señal interferente generada por reaccionantes hacia una zona de reacción. En un ELISA típico, una muestra que contiene un antígeno de interés se hace pasar sobre la zona de reacción, a la que los analitos de interés de la muestra se unirán en virtud de las moléculas de anticuerpo (dirigidas al antígeno) adsorbidas en la zona de reacción. A continuación, un conjugado enzima-anticuerpo marcado (dirigido a un antígeno y seleccionado de modo que el anticuerpo unido a la zona de reacción no bloquee la unión del conjugado) se hace pasar sobre la zona de reacción, se deja que se una, y a continuación es desplazado por el sustrato. La enzima hace que el sustrato produzca una señal óptica. Los reactivos no unidos que acaban en la cámara para residuo pueden producir de forma similar señales interferentes.

En algunos casos, el marcador se acopla directamente o indirectamente a una molécula que se va a detectar tal como un producto, un sustrato o una enzima, según métodos muy conocidos en la especialidad. Según se indica anteriormente, se usa una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación del compuesto, los requisitos de estabilidad, la instrumentación disponible y las disposiciones de eliminación. Los marcadores no radiactivos se ligan a menudo mediante medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando se une covalentemente a un polímero. A continuación, el ligando se une a una molécula antiligando que bien es inherentemente detectable o bien está unida covalentemente a un sistema de señales, tal como una enzima detectable, o un compuesto quimioluminiscente. Se puede usar un número de ligandos y antiligandos. Cuando un ligando tiene un antiligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, se puede usar junto con antiligandos marcados. Alternativamente, cualquier compuesto hapténico o antigénico se puede usar en combinación con un anticuerpo.

En algunos casos, el marcador también se puede conjugar directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, mediante la conjugación con una enzima. Enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas, y oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalacínodionas, tales como luminol, dioxetanos y ésteres de acridinio.

Métodos para detectar marcadores son muy conocidos por los expertos en la especialidad. La detección se puede efectuar usando detectores electrónicos tales como cámaras digitales, dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y fototubos, u otros dispositivos de detección. De forma similar, los marcadores enzimáticos se detectan al proporcionar sustratos apropiados para la enzima y detectar el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos simples se detectan a menudo simplemente al observar el color asociado con el marcador. Por ejemplo, el oro conjugado a menudo aparece rosa, mientras que diversas cuentas conjugadas aparecen del color de la cuenta.

Fuentes quimioluminiscentes adecuadas incluyen un compuesto que es electrónicamente excitado por una reacción química y a continuación puede emitir luz que sirve como la señal detectable. Se ha encontrado que un número diverso de familias de compuestos proporcionan quimioluminiscencia bajo una variedad de condiciones. Una familia de compuestos es la 2,3-dihidro-1,4-ftalacina. Un compuesto usado frecuentemente es el luminol, que es un compuesto aminado en 5. Otros miembros de la familia incluyen el análogo 5-amino-6,7,8-trimetoxi- y el dimetilamino[ca]benz. Se puede hacer que estos compuestos emitan luminiscencia con peróxido de hidrógeno alcalino o hipoclorito sódico y base. Otra familia de compuestos son los 2,4,5-trifenilimidazoles, con lofina como el nombre común para el compuesto originario. Análogos quimioluminiscentes incluyen sustituyentes para-dimetilamino y -metoxi. La quimioluminiscencia también se puede obtener con oxalatos, habitualmente ésteres activos de oxalilo, por ejemplo, p-nitrofenilo y un peróxido tal como peróxido de hidrógeno, bajo condiciones básicas. Otros compuestos quimioluminiscentes útiles que también son conocidos incluyen ésteres de N-alkilacridinio y dioxetanos. Alternativamente, se pueden usar luciferinas junto con luciferasa o lucigeninas para proporcionar bioluminiscencia.

En algunos casos, se efectúan inmunoensayos en el dispositivo hidráulico. Aunque se pueden realizar en algunas realizaciones ensayos de unión competitiva, que son muy conocidos en la especialidad, en algunas realizaciones se usa un método en dos etapas que elimina la necesidad de mezclar un conjugado y una muestra antes de exponer la mezcla a un anticuerpo, lo que puede ser deseable cuando se usan volúmenes de muestra muy pequeños, como en el dispositivo hidráulico de la presente invención. Un ensayo en dos etapas tiene las ventajas adicionales sobre los ensayos de unión competitiva cuando se usa con un dispositivo hidráulico como el descrito en la presente memoria. Combina la facilidad de uso y la alta sensibilidad de un inmunoensayo tipo sándwich (unión competitiva) con la capacidad para ensayar moléculas pequeñas.

Un ensayo en dos etapas ejemplar mostrado en la figura 8 se ha descrito en la presente memoria, como también una técnica de medida ejemplar para el ensayo en dos etapas - un inmunoensayo enzimático quimioluminiscente como el mostrado en la figura 8.

El término "analitos" según la presente invención incluye sin limitación fármacos, profármacos, agentes farmacéuticos, metabolitos de fármacos, biomarcadores tales como proteínas expresadas y marcadores celulares, anticuerpos, proteínas séricas, colesterol, polisacáridos, ácidos nucleicos, analitos biológicos, biomarcadores, genes, proteína o hormonas, o cualquiera de sus combinaciones. A nivel molecular, los analitos pueden ser un polipéptido, proteínas, una glicoproteína, un polisacárido, un lípido, un ácido nucleico, y sus combinaciones.

Una lista más completa de analitos que pueden ser detectados usando un dispositivo hidráulico y métodos descritos en la presente memoria se incluyen en la Solicitud de Patente Número de Serie 11/389.409, presentada el 24 de marzo de 2006.

También se describe un método para fabricar un dispositivo hidráulico que tiene un conjunto de extinción. El método comprende proporcionar una pluralidad de capas del dispositivo hidráulico, y fijar las capas para proporcionar una red hidráulica entre una unidad de recogida de muestra, al menos una cámara para reactivo, al menos una zona de reacción y al menos una cámara para residuo que comprende un conjunto de extinción.

En algunos casos, al menos una de las capas diferentes del dispositivo hidráulico puede estar construida por sustratos poliméricos. Ejemplos no limitativos de materiales poliméricos incluyen poliestireno, policarbonato, polipropileno, polidimetilsiloxanos (PDMS), poliuretano, poli(cloruro de vinilo) (PVC), poli(metacrilato de metilo) y polisulfona.

La fabricación de los canales hidráulicos se puede llevar a cabo generalmente mediante cualquier número de técnicas de microfabricación que son conocidas en la especialidad. Por ejemplo, se emplean opcionalmente técnicas litográficas para fabricar, por ejemplo, sustratos de vidrio, cuarzo o silicio, usando métodos muy conocidos en las industrias de fabricación de semiconductores tales como mordentado fotolitográfico, mordentado plasmático o mordentado químico en húmedo. Alternativamente, se emplean opcionalmente métodos de micromaquinado tales como perforación láser, microfresado y similares. De forma similar, para sustratos poliméricos, también se pueden usar técnicas de fabricación muy conocidas. Estas técnicas incluyen métodos de moldeo por inyección, moldeo por estampación y abollonado en los que grandes números de sustratos se producen opcionalmente usando, por ejemplo, prensas laminadoras para producir hojas grandes de sustratos a microescala o técnicas de microcolada de polímeros en las que el sustrato se polimeriza dentro de un molde micromaquinado. También se puede usar colada en troquel.

En casos preferidos, las diferentes capas del dispositivo hidráulico están soldadas ultrasónicamente entre sí según métodos conocidos en la especialidad. Las capas también se pueden acoplar entre sí usando otros métodos, incluyendo sin limitación, estampación, unión térmica, adhesivos o, en el caso de ciertos sustratos, p. ej., vidrio, o sustratos poliméricos semirrígidos y no rígidos, una adhesión natural entre los dos componentes.

5 La figura 5 muestra una realización de la invención en la que un dispositivo 2 hidráulico está comprendido por una pluralidad de diferentes capas de material. Formas como las mostradas, por ejemplo, se cortan en el sustrato polimérico de modo que cuando las capas se coloquen apropiadamente cuando se montan formen una red hidráulica. En algunas realizaciones, se pueden usar más o menos capas para construir un dispositivo hidráulico para llevar a cabo el propósito de la invención.

10 El conjunto de extinción se ha descrito en la presente memoria y en algunas realizaciones puede comprender un material absorbente. En tales realizaciones, el conjunto de extinción se puede producir al aplicar el agente de extinción en el material absorbente. Esto se puede efectuar mediante cualquier número de técnicas bien conocidas en la especialidad, tales como pipetear el líquido sobre el material absorbente hasta que el material absorbente esté sustancialmente embebido en el material absorbente, o simplemente dejar que el material absorbente absorba el agente de extinción. La cantidad de saturación del material absorbente puede variar, con la condición de que una cantidad suficiente del agente de extinción se incorpore en el material absorbente para producir un efecto inhibitor en al menos un reactivo de ensayo.

Después de que el agente de extinción se añada al material absorbente, el material absorbente se seca a continuación. La etapa de secado se puede efectuar mediante cualquier técnica adecuada tal como liofilización, secado bajo gas fluente con elevación de la temperatura, o simplemente secado pasivo al dejar que se evapore el agua del material absorbente.

Una vez seco, el material absorbente que incorpora el agente de extinción se puede colocar a continuación en un dispositivo hidráulico como el descrito durante el procedimiento de fabricación en el que se puede usar para reducir la interferencia óptica en un ensayo realizado dentro del dispositivo hidráulico. La colocación dentro del dispositivo hidráulico puede ser mediante cualquier técnica conocida y simplemente se puede colocar manualmente dentro del dispositivo hidráulico. Según se describe anteriormente, el material absorbente se coloca preferiblemente en una cámara para residuo adaptada para recoger líquidos no unidos dentro del dispositivo hidráulico.

Ejemplo

30 Un trozo de 2,5 x 1,2 cm (1 x 0,5 pulgadas) de malla de fibra de vidrio Whatman #32 (artículo 10 372 968) se impregnó con 50 µl de ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3,4'-disulfónico (0,4 M) al 15% p/v en agua y a continuación se secó en una "caja seca".

En ensayos que usan reactivos marcados con fosfatasa alcalina (procedente de intestino bovino) (APasa acoplada a haptenos o a anticuerpos en concentraciones de hasta aproximadamente 10 µg/ml en un tampón de tris diluido) y los sustratos bien Lumiphos™ 530 de Lumigen o bien KPL Phosphoglow™ AP (ambos son dioxetanos y tienen un residuo de fosfato esterificado sobre el que actúa la enzima) usados según se suministran por los vendedores (100 µM en dioxetano), el resultado era aproximadamente 200 µl de enzima y 200 µl de sustrato en la cámara para residuo, expuesta así al material adsorbente.

Después de un grado de brillo inicial de 38.550 recuentos/segundo (observado poniendo el dispositivo hidráulico en un luminómetro de Molecular Devices M5 de modo que la cámara para residuo estuviera siendo interrogada), la intensidad caía hasta aproximadamente 100 recuentos/segundos dentro de unos pocos segundos después de añadir el material adsorbente (el nivel de ruido del luminómetro era aproximadamente 100 recuentos/segundo). En otras palabras, se eliminaba más de 99% de la interferencia óptica.

El azobenceno actuaba de un modo inhibitor tanto sobre la enzima como sobre el sustrato. La enzima fue desactivada por la acidez del reactivo, y probablemente también por otros mecanismos. El sustrato era modificado químicamente por el azobenceno de modo que ya no hubiera un sustrato para la fosfatasa alcalina.

Aunque se han mostrado y descrito en la presente memoria realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que estas realizaciones se proporcionan a modo de ejemplo solamente. Numerosas variaciones, cambios y sustituciones se presentarán a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Se entenderá que se pueden emplear diversas alternativas de las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria al poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y las estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes sean cubiertos por las mismas.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo hidráulico para detectar un analito en una muestra, que comprende:
 - una unidad de recogida de muestra;
 - un conjunto de ensayo que comprende
 - 5 al menos una zona de reacción, comprendiendo dicha zona de reacción una superficie e inmovilizado sobre la misma un reaccionante que forma un complejo que comprende el analito;
 - una primera cámara para reactivo que comprende un conjugado enzimático;
 - una segunda cámara para reactivo que comprende un sustrato para enzima, en donde el sustrato para enzima reacciona con el conjugado enzimático para producir una señal luminiscente; y
 - 10 canales hidráulicos que conectan las cámaras para reactivo con la al menos una zona de reacción;
 - caracterizado por que el dispositivo hidráulico también comprende un conjunto de extinción que comprende un material absorbente y el agente de extinción ácido 4-amino-1,1'-azobenceno-3, 4'-disulfónico que inhibe la reacción luminiscente entre el conjugado enzimático y el sustrato para enzima; y
 - 15 una pluralidad de canales hidráulicos que conectan la unidad de recogida de muestra y el conjunto de extinción con el conjunto de ensayo.
2. Un sistema para detectar un analito en una muestra, que comprende:
 - el dispositivo hidráulico según la reivindicación 1; y
 - un conjunto de detección para detectar dicha señal óptica.
 3. El sistema según la reivindicación 2, que comprende además un conjunto de comunicación adaptado para
 - 20 transmitir dicha señal óptica a un dispositivo externo.
 4. El dispositivo hidráulico según la reivindicación 1, adaptado para realizar un inmunoensayo.
 5. El dispositivo hidráulico según la reivindicación 1, adaptado para detectar un analito en sangre.
 6. El dispositivo hidráulico según la reivindicación 1, que comprende una cámara para residuo que comprende dicha zona de extinción.
 - 25 7. El dispositivo hidráulico según la reivindicación 1, en el que dicho material absorbente se selecciona del grupo que consiste en fibra de vidrio, sílice, papel, gel de poliacrilamida, agarosa o agar.
 8. El dispositivo hidráulico según la reivindicación 1, en el que dicho conjugado enzimático es un reactivo marcado con fosfatasa alcalina.

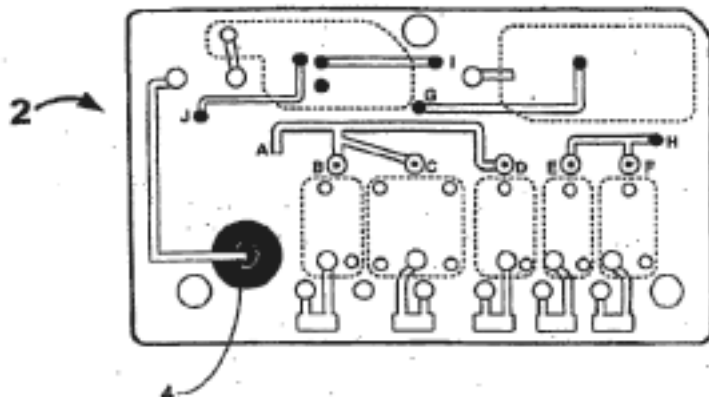


Figura 1

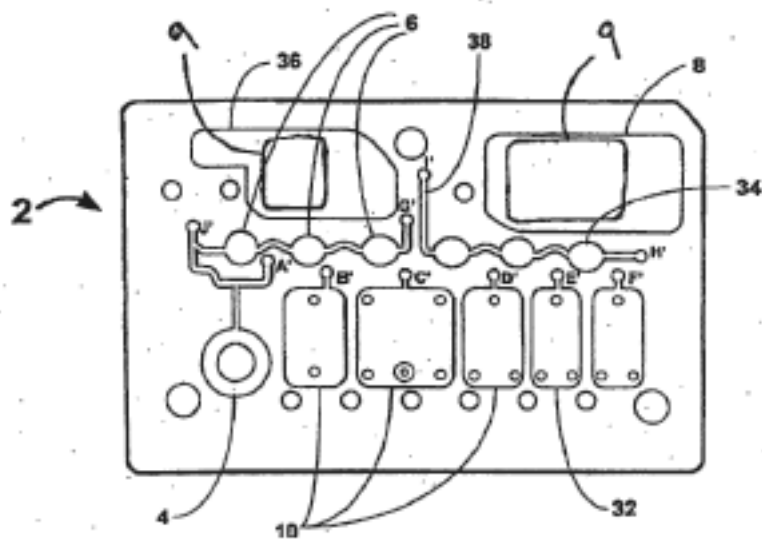


Figura 2

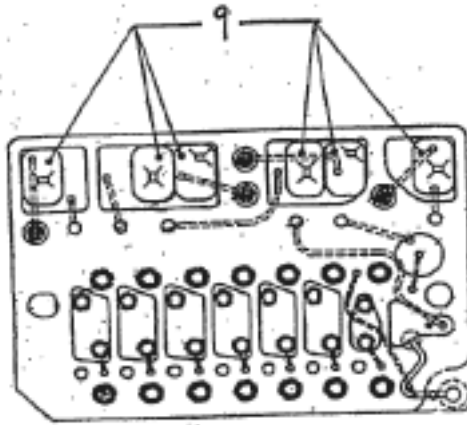


Figura 3

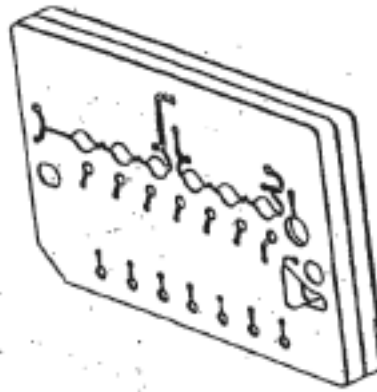


Figura 4

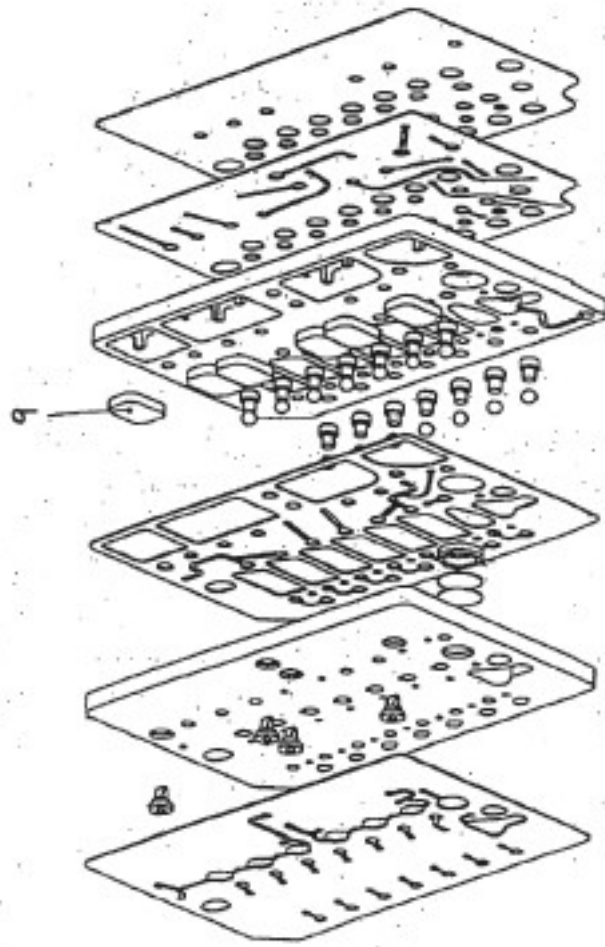


Figura 5

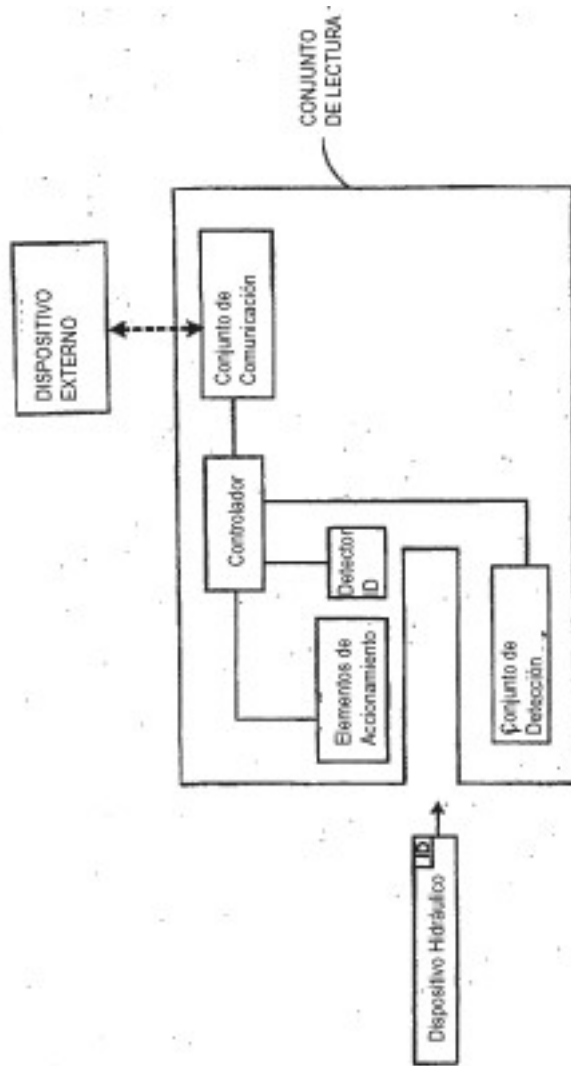


Figura 6

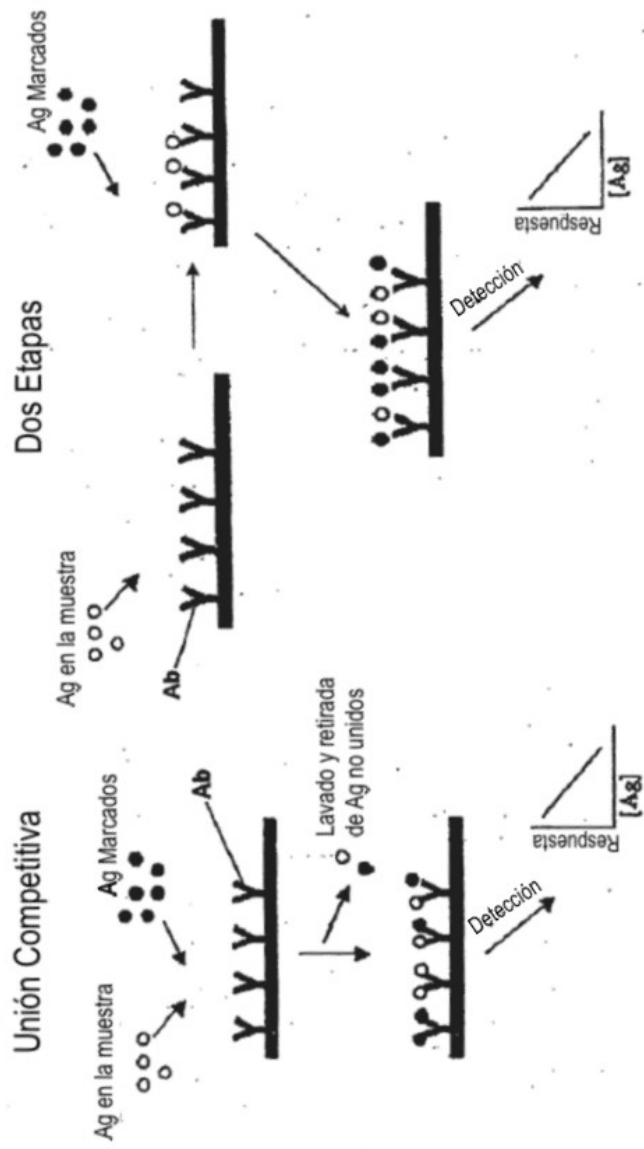


Figura 7

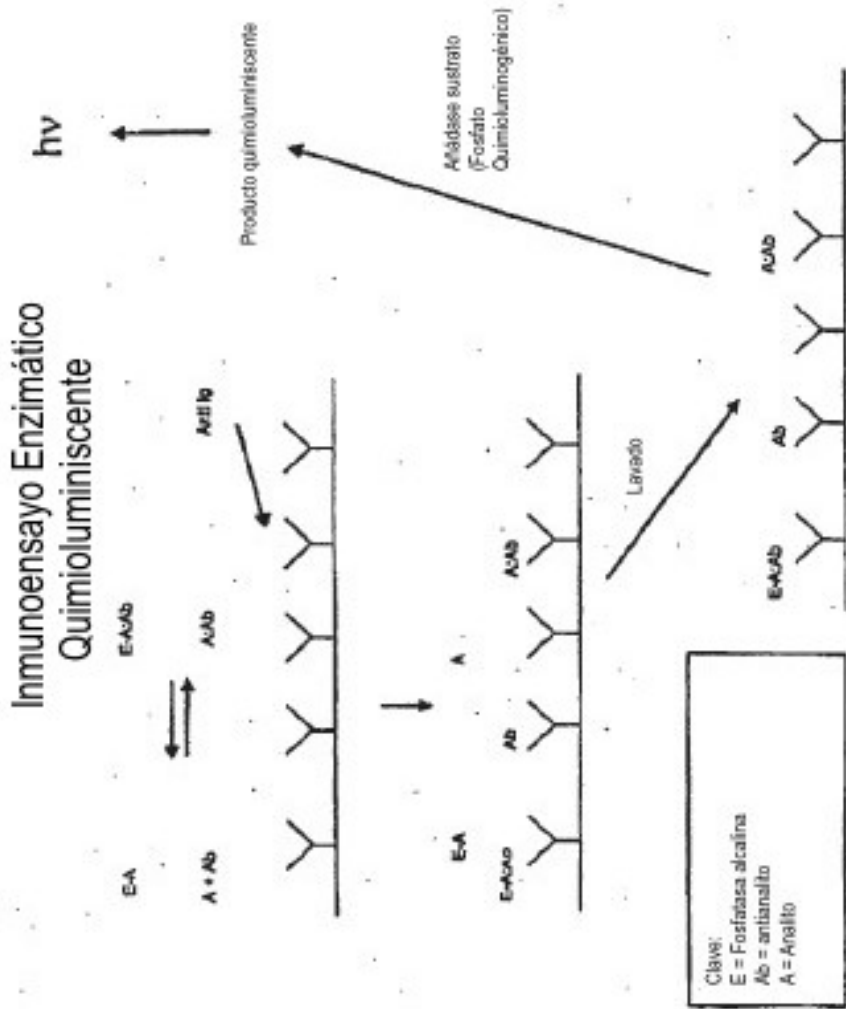


Figura 8