

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 233**

51 Int. Cl.:

B29C 47/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2011 PCT/GB2011/000414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO2011117579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2011 E 11711614 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2550147**

54 Título: **Inmunoensayos, métodos para llevar a cabo inmunoensayos, kits de inmunoensayo y método para fabricar kits de inmunoensayo**

30 Prioridad:

25.03.2010 GB 201005191

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

28.06.2017

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
The Old Schools Trinity Lane
Cambridge CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**EDWARDS, ALEXANDER, DANIEL;
REIS, NUNO, MIGUEL, FERNANDES;
MACKLEY, MALCOLM, ROBERT y
SLATER, NIGEL, KENNETH, HARRY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 620 233 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

Inmunoensayos, métodos para llevar a cabo inmunoensayos, kits de inmunoensayo y método para fabricar kits de inmunoensayo

5

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a inmunoensayos, métodos para llevar a cabo inmunoensayos, kits de inmunoensayo y métodos para fabricar kits de inmunoensayo. En particular, la invención tiene relevancia para la tecnología de inmunoensayo capilar (especialmente microcapilar).

Técnica relacionada

15

Los inmunoensayos (IE) son herramientas bioquímicas poderosas que permiten la medida de la concentración de una sustancia en una muestra médica, biotecnológica o ambiental. Los IE normalmente utilizan la interacción específica entre los anticuerpos y sus antígenos, y, se usan para medir las biomoléculas y las pequeñas moléculas en diversas aplicaciones que incluyen la detección de patógenos, infección, fármacos, biomarcadores de enfermedades, contaminantes ambientales, agentes biológicos y toxinas en productos alimenticios. Los IE heterogéneos actúan inmovilizando un antígeno o capturando un anticuerpo en, por ejemplo, una superficie plástica. La presencia de un antígeno o anticuerpo en una muestra se puede determinar después mediante varios métodos, siendo el más común el marcado tanto del antígeno como del anticuerpo. Los marcadores comunes incluyen enzimas, tal y como se usan en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Otros marcadores incluyen oro coloidal (tal como se usa en los ensayos de flujo lateral), radioisótopos tales como I-125, tal como se usan en el radioinmunoensayo (RIA), marcadores magnéticos tal como se usan en inmunoensayos magnéticos (MIA) y marcadores fluorescentes.

20

25

La plataforma más común para los IE en los laboratorios de ciencias de la vida son las placas de microtitulación. El procedimiento experimental para un IE de placa de microtitulación normalmente comienza por recubrir las superficies de los micropocillos (durante un período de tiempo prolongado, por ejemplo, durante una noche) con el antígeno o el anticuerpo de captura, seguido de un lavado vigoroso. Las muestras después se añaden a los pocillos y se incuban durante un tiempo definido, normalmente 2-8 horas para una sensibilidad máxima. Los anticuerpos de detección se añaden después a los pocillos tras otro lavado exhaustivo y se incuban durante más de 1 hora. Esto da como resultado un proceso largo y tedioso y un alto consumo de reactivos caros (los volúmenes operacionales mínimos para una placa de microtitulación de 96 pocillos son de 50-100 µl). También se requiere un equipamiento especial para la detección de la señal (por ejemplo, un lector de microplaca), lo que supone un coste de la inversión de hasta 23.073 €.

30

35

Para abordar los problemas de tiempos prolongados de incubación y alto consumo de reactivos caros típicos de ensayos basados en placas de microtitulación, se han desarrollado técnicas de IE alternativas que utilizan superficies de plástico que tienen una gran área superficial específica respecto al volumen, tales como el tipo mostrado mediante dispositivos de microperlas o microfluídicos en lugar de placas de microtitulación.

40

Las microperlas fluorescentes o magnéticas ofrecen un área superficial de especificidad muy alta para la inmovilización del antígeno o el anticuerpo de captura y puede multiplexarse o automatizarse por medio de un sistema robótico y un citómetro de flujo para la detección de la señal. Sin embargo, para instalar un IE basado en microperlas normalmente se requiere una inversión de 57.682-115.364 €.

45

Los IE de microperlas ofrecen un área superficial de especificidad muy alta para la inmovilización del antígeno o del anticuerpo de captura. El IE de microperlas ofrece ventajas sobre el IE de placa de microtitulación, siendo más adecuado para la automatización por medio de un sistema robótico. Una ventaja adicional es la posibilidad de medición de analito multiplex en donde una muestra se analiza por múltiples analitos de manera simultánea. Se requiere un equipo especializado para detectar la señal generada mediante IE de microperlas, tal como un citómetro de flujo o un analizador de microperlas para la detección de la señal. Por lo tanto, el equipo requerido para instalar un IE basado en microperlas requiere una inversión de 30.000-100.000 £.

50

55

Además, algunas tecnologías microfluídicas recientes ofrecen la posibilidad de procesar múltiples muestras a través de la automatización, requiriendo volúmenes mínimos de la muestra. Varios tipos de tecnologías de IE microfluídico se revisan en Bange *et al.* 2005.

60

Yacoub-George *et al.* 2007 desvelan un aparato microfluídico para llevar a cabo inmunoensayos. Su aparato incluye 10 capilares de sílice condensada contenidos en un cartucho especialmente diseñado. El cartucho está acoplado a bombas microfluídicas para el control individual del fluido tipo y el flujo de fluido proporcionado para cada capilar. Diferentes elementos capilares tienen diferentes anticuerpos inmovilizados en la superficie interna del agujero. El aparato también incluye un módulo detector de luz especialmente diseñado para medir los resultados del inmunoensayo de los capilares.

65

Sin embargo, para muchas aplicaciones, el coste de producción de dispositivos microfluídicos, por ejemplo, mediante

litografía con detectores de señal integrados sigue siendo muy alto para ser rentable para la realización de IE en muchos laboratorios de ciencias de la vida, laboratorios de diagnóstico clínico u otros laboratorios.

5 Otros tipos de IE conocidos emplean elementos capilares, véase, por ejemplo, el documento US-A-5.624.850. En estos ensayos, el orificio del capilar proporciona un conducto de fluido para una muestra y las proteínas antigénicas o los anticuerpos se inmovilizan en la superficie interna del orificio. Los IE basados en capilares proporcionan una ventaja en términos del área superficial disponible del orificio capilar en comparación con el volumen de muestra requerido para los IE basados en placas de microtitulación. Además, las elevadas relaciones de superficie con respecto al volumen de los capilares en comparación con las placas de microtitulación significan que la longitud de los
10 tiempos de incubación requeridos, por ejemplo, para la unión antígeno-anticuerpo, se acortan.

Se han descrito varios aparatos para la realización de IE basados en capilares. Por ejemplo, el documento US-A-4.116.638 desvela un dispositivo para llevar a cabo IE que usan múltiples capilares de manera simultánea. El dispositivo comprende un vial con un disco circular insertado en el vial y aberturas en el disco en el que se pueden
15 insertar los capilares. Además, el disco tiene una abertura mayor en su centro en la que se puede insertar un tubo. Este tubo se puede usar para añadir, por ejemplo, mezclas al vial que luego se recogen en los capilares.

Otro aparato para inmunoensayos basados en capilares se describe en el documento US-A-4.883.760. En un ejemplo, se mantienen uno o más capilares en una estructura de soporte flexible y se suspenden inicialmente con sus extremos inferiores libres. Las muestras, etc. se introducen en los capilares a través de una apertura en el soporte. Los capilares se pueden drenar después desviando la parte superior del soporte hacia abajo hasta que los extremos inferiores de los capilares tocan un material absorbente situado debajo de ellos.
20

Los documentos US-A-5.976.896 y US-A-6.517.778 también describen un aparato para inmunoensayos basados en capilares. En un ejemplo, un cartucho que comprende cuatro tubos capilares se usa para examinar diferentes analitos en una muestra de leche. Tres de los cuatro capilares en el cartucho estaban cubiertos con un reactivo diferente permitiendo por lo tanto la detección de diferentes analitos en un inmunoensayo competitivo. El cuarto capilar se dejaba en blanco y actuaba como un control.
25

El documento US-A-4.590.157 desvela, en una realización, un dispositivo formado mediante la conexión de varios elementos capilares en serie. Cada elemento capilar está formado por un material transparente. Los ejemplos adecuados dados son cristal, cloruro de polivinilo o poliestireno. Cada elemento capilar tiene una longitud de aproximadamente 2 cm, un diámetro de orificio interno de aproximadamente 1 mm y un diámetro externo de aproximadamente 2 mm. Cada elemento capilar tiene diferentes anticuerpos, antígenos o sustancias hapténicas adsorbidas o unidas de manera covalente a la superficie del orificio. En uso, se extrae una muestra de fluido a través de la serie de elementos capilares. El tipo de inmunoensayo realizado es normalmente un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). En una realización alternativa, se disponen en paralelo tres elementos capilares, siendo cada tubo capilar capaz de indicar la presencia de un analito (digoxina) en diferentes intervalos de concentración predeterminados. De este modo, se proporciona un ensayo cuantitativo. La muestra desconocida se extrae de los elementos capilares paralelos por aspiración mediante tres émbolos correspondientes. En cada realización, los resultados del ensayo se determinan mediante una evaluación del cambio de color asociada con cada elemento capilar. Una divulgación similar se proporciona en Healey *et al.*, 1983.
30
35
40

También se han descrito los diferentes métodos para detectar señales producidas en IE basados en capilares. Por ejemplo, el documento US-A-4.716.121 describe un inmunoensayo fluorescente basado en capilares en el que se inserta una fibra óptica en el capilar. La iluminación de la fibra da lugar a una onda evanescente que se produce en la muestra dentro del capilar que a su vez excita complejos marcados con fluorescencia. La fluorescencia resultante entonces entra en la fibra y se recolecta por un fluorímetro.
45

Los capilares también se han usado como dispositivos de medida en inmunoensayos. Por ejemplo, el documento US-A-4.454.235 describe un aparato para desarrollar inmunoensayos en los que se usa un capilar para transferir una cantidad precisa de un primer recipiente que contiene una mezcla de la muestra y agente fluorogénico a un segundo recipiente que contiene un segundo reactivo. En este caso, el tubo capilar se mantiene en un soporte de manera que al menos un extremo del capilar es accesible al fluido. Una vez que se ha transferido la mezcla al segundo recipiente, la fluorescencia se mide colocando el segundo recipiente en un fluorómetro.
50
55

Otro sistema para llevar a cabo IE se describe en el documento US-A-6.340.598. En este sistema, un biosensor que comprende una guía de onda planar se usa para detectar la presencia de un analito en una muestra. La guía de onda en este caso forma al menos una pared del reservorio de la muestra y se posiciona una fuente de luz para enfocar la luz en la guía de onda, en la que la reflexión interna en la guía de onda lleva a la producción de una luz evanescente. El aparato además tiene un detector para detectar la fluorescencia emitida mediante moléculas traza en una solución de ensayo en respuesta a la estimulación con luz evanescente.
60

El documento JP 2002-040028 describe un dispositivo de inmunoensayo capilar que incluye un material base que lleva un material funcional y una fase móvil compuesta de partículas de fase sólida que incluyen el material diana. El documento WO 2008/063406 describe una plataforma para ensayos de unión con capacidad de multiplexación dual.
65

Sumario de la invención

5 Los presentes inventores observan que hay desventajas asociadas a las tecnologías de inmunoensayo disponibles en la práctica.

10 En particular, las tecnologías de IE conocidas requieren el uso de volúmenes relativamente grandes de reactivo y/o requieren lectores complejos dedicados a llevar a cabo las medidas del IE y/o no son susceptibles de la producción en masa.

Por consiguiente, los presentes inventores han ideado la presente invención con el fin de abordar una o más de estas desventajas.

15 Tal como se ha discutido anteriormente, muchos tipos de inmunoensayo dependen de la interrogación óptica para determinar el progreso y/o el resultado del inmunoensayo. Los presentes inventores han comprendido que una barrera para tratar una o más de las desventajas esbozadas anteriormente utilizando dispositivos de inmunoensayo a base de capilares es que puede ser difícilmente confiable interrogar los orificios capilares, en particular cuando se requiere un resultado cuantitativo del inmunoensayo. Este es particularmente el caso en el que se busca llevar a cabo inmunoensayos en múltiples orificios capilares de manera sustancial simultáneamente, por ejemplo, para proporcionar redundancia en los resultados o para proporcionar diferentes inmunoensayos en diferentes orificios capilares.

Por consiguiente, en un primer aspecto preferido de la invención, se ha proporcionado un dispositivo para llevar a cabo un inmunoensayo, el dispositivo tiene:

25 un cuerpo unitario con una superficie exterior y al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo unitario, en el que para cada orificio capilar una población de primeros miembros de un respectivo par de unión específica se inmoviliza al menos en una porción de la superficie del orificio capilar, siendo cada primer miembro capaz de unirse específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión específica,

30 en el que el cuerpo unitario es sustancialmente transparente a luz visible para permitir la interrogación óptica de los orificios capilares y en el que el dispositivo está formado por un material que tiene un índice de refracción que está en el intervalo de 1,26 a 1,40 y está dentro de más o menos 0,07 del índice de refracción de la muestra de fluido, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm.

35 Los presentes inventores han comprendido que puede ser difícilmente fiable interrogar orificios capilares conocidos para su uso en técnicas de inmunoensayo, en particular cuando se requiere un resultado cuantitativo del inmunoensayo. Los inventores han comprendido que esto se debe principalmente a los efectos ópticos adversos. Por ejemplo, cuando se ve un orificio capilar desde una dirección, la luz de cerca de los lados laterales del orificio tiende a estar sujeta a un mayor grado de refracción que la luz desde el centro del orificio.

40 La señal óptica que se va a interrogar ópticamente se genera durante el IE para determinar el nivel de analito en la muestra y esto casi siempre tiene lugar en una solución/suspensión acuosa. Los inventores, por tanto, han comprendido que formar un dispositivo de inmunoensayo capilar a partir de un material que tiene un índice de refracción cercano al del agua permite evitar los efectos ópticos adversos mencionados anteriormente hasta el punto de permitir una mejora significativa en la interrogación óptica del orificio capilar. El índice de refracción del agua es 1,33 (cuando se mide a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm, correspondiente a la línea D del doblete de sodio amarillo). Como referencia, es de interés proporcionar en el presente documento el índice de refracción de otros materiales en las mismas condiciones: sílice condensada 1,46; poli (éter uretano) 1,49; poli (metil metacrilato) 1,49; poli (alcohol vinílico) 1,50; polietileno 1,51; polietileno de baja densidad 1,51; tereftalato de polietileno 1,57-1,58; poliestireno 1,59; poli (cloruro de vinilo) 1,54.

45 Por consiguiente, el dispositivo de inmunoensayo está formado de un material que tiene un índice de refracción que está dentro de más o menos 0,07 del índice de refracción de la muestra de fluido. El índice de refracción se mide a 50 20 °C con luz de longitud de onda de 589 nm.

El cuerpo unitario está formado por un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm. Esto es adecuado, por ejemplo, cuando la muestra de fluido es diluida y acuosa.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para realizar un inmunoensayo para detectar la presencia o ausencia del segundo miembro de unión en una muestra de fluido usando un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto, el método incluye las etapas:

65 proporcionar una muestra de fluido en los orificios capilares del dispositivo; e interrogar ópticamente los orificios capilares.

Preferentemente, el método comprende incubar la muestra de fluido con la población de los primeros miembros del par de unión específica durante 20 minutos o menos, más preferentemente durante 15 minutos o menos, lo más preferentemente durante 10 minutos o menos. Por ejemplo, la muestra de fluido puede incubarse con la población de los primeros miembros durante 10 a 20 minutos, más preferentemente durante 10 a 15 minutos, lo más preferentemente durante aproximadamente 10 minutos.

Los presentes inventores también han comprendido que la fabricación de un dispositivo de inmunoensayo basado en capilares puede ser difícil de llevar a cabo en una escala relativamente grande. Por consiguiente, los inventores han contemplado un método de fabricación que permite la producción de dispositivos de inmunoensayo capilar pre-cargados con poblaciones de los primeros miembros del respectivo par de unión específica para la unión específica con segundos miembros de los respectivos pares de unión específica. Los inventores han comprendido que es posible cargar los primeros miembros de un par de unión específica en una larga longitud de un cuerpo capilar (por ejemplo, 20 cm o más larga), cortando posteriormente el cuerpo capilar en la longitud deseada para un dispositivo de inmunoensayo. En términos generales, el cuerpo puede incluir un orificio capilar, pero esto no es preferido.

Generalmente lo que se describe en el presente documento es un método para fabricar un dispositivo de acuerdo con el primer aspecto, el método incluye:

proporcionar un cuerpo extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo; e insertar una respectiva carga de fluido en cada orificio capilar del cuerpo extruido, cada carga de fluido comprende dichos primeros miembros del respectivo par de unión específica, para inmovilizar los primeros miembros al menos a una porción de la superficie del orificio capilar y formar un cuerpo extruido cargado.

Preferentemente, el método además incluye la etapa de cortar el cuerpo extruido cargado para formar el dispositivo para un inmunoensayo de una longitud requerida, en el que el cuerpo extruido cargado, antes de cortarlo, opcionalmente tiene una longitud de al menos 20 cm.

Como alternativa, el método puede ser un método para fabricar un conjunto de n dispositivos, el método además incluye cortar el cuerpo extruido cargado para formar el conjunto de n dispositivos, teniendo cada dispositivo una longitud de al menos X, en el que el cuerpo extruido cargado, antes de cortarlo, tiene una longitud de al menos nX, o una longitud de al menos 20 cm.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sistema de inmunoensayo para llevar a cabo inmunoensayos, teniendo el sistema una pluralidad de dispositivos de ensayo de acuerdo con el primer aspecto y un soporte para mantener la pluralidad de dispositivos de inmunoensayo.

Generalmente, en el presente documento se describe un kit de inmunoensayo que incluye un cuerpo extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo, el cuerpo extruido tiene una longitud de al menos 20 cm, una población de primeros miembros de un respectivo par de unión específica que se inmoviliza en la superficie de cada orificio capilar, siendo cada primer miembro capaz de unirse específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión específica, siendo el cuerpo extruido capaz de cortarse en una longitud requerida para un inmunoensayo.

El kit se puede proporcionar en forma de bobina del cuerpo extruido cargado.

Las características preferentes (o al menos opcionales) se establecen a continuación. A menos que el contexto indique lo contrario, éstas se pueden combinar tanto individualmente como en cualquier combinación con cualquier aspecto de la invención. De manera similar, cualquier aspecto de la invención se puede combinar con cualquier otro aspecto de la invención.

El orificio capilar puede tener un diámetro interno de al menos 10 μm . Preferentemente, el diámetro interno es al menos de 50 μm . El diámetro interno puede ser de hasta 1 mm. Más preferentemente, el diámetro interno es de aproximadamente 200 μm . La forma de la sección transversal del orificio capilar puede ser circular. Sin embargo, más preferentemente es ovalada, en vista de la técnica de fabricación preferida para el dispositivo. En este caso, el "diámetro interno" debe tomarse como el ancho máximo del orificio capilar en sección transversal.

El dispositivo puede tener más de dos orificios capilares formados en el cuerpo unitario. Por ejemplo, el dispositivo puede tener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más orificios capilares. Es posible fabricar un dispositivo adecuado con 20 orificios capilares, o más.

Preferentemente, los orificios capilares están formados de manera sustancial paralelos entre sí.

Preferentemente, un orificio capilar en el dispositivo tiene una superficie tratada de forma diferente de al menos otro orificio capilar en el dispositivo. Esto puede proporcionar una diferencia medible en la realización del inmunoensayo

entre los orificios. Por ejemplo, un orificio puede tener una concentración diferente de los primeros miembros adsorbidos en su superficie que otro orificio. Adicionalmente o como alternativa, un orificio puede tratarse con primeros miembros de un par de unión específico en comparación con otro orificio. En algunas realizaciones, se puede proporcionar al menos un orificio capilar de referencia sin dichos primeros miembros adsorbidos en la superficie del orificio capilar. Además, es posible que dos o más orificios capilares reciban un tratamiento idéntico, con el fin de proporcionar una redundancia de mediciones en el dispositivo. Además, es posible que dos o más orificios capilares reciban un tratamiento idéntico y que uno o varios otros orificios en el mismo dispositivo reciban diferente tratamiento, para proporcionar combinaciones de estas ventajas.

Cuando el dispositivo comprende dos o más orificios capilares, uno o más de los orificios capilares pueden separarse de uno o ambos de sus orificios capilares vecinos en un extremo del dispositivo. Por ejemplo, cada orificio capilar del dispositivo puede separarse uno sí y otro no en un extremo del dispositivo. Como alternativa, los orificios capilares pueden dividirse en conjuntos de orificios capilares y cada conjunto de orificios capilares puede separarse uno sí y otro no en un extremo del dispositivo. Cada conjunto puede comprender dos o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 orificios capilares. "Separarse" en este contexto significa que en un extremo del dispositivo, el orificio capilar o conjunto de orificios capilares no está unido a uno o ambos de sus orificios capilares vecinos o conjuntos de orificios capilares.

Un método para fabricar un dispositivo de acuerdo con la presente invención puede, por lo tanto, comprender una etapa de separar o desprender los orificios capilares o conjuntos de orificios capilares entre sí en un extremo del dispositivo, por ejemplo, cortando el dispositivo entre los orificios capilares. La separación de los orificios capilares o conjuntos de orificios capilares en un extremo del dispositivo facilita el contacto de cada orificio capilar o conjunto de orificios capilares con diferentes muestras de fluido cuando se usa el dispositivo para realizar un inmunoensayo.

Los orificios capilares o conjuntos de orificios capilares puede tener superficies tratadas de manera idéntica. Como alternativa, un orificio capilar en cada conjunto de orificios capilares en el dispositivo puede tener una superficie tratada de manera diferente de al menos otro orificio capilar en el mismo conjunto de orificios capilares. Esto puede proporcionar una diferencia medible en la realización del inmunoensayo entre los orificios del conjunto. Por ejemplo, un orificio puede tener una concentración diferente de primeros miembros adsorbida en su superficie que otro orificio en el mismo conjunto de orificios. Adicionalmente o como alternativa, un orificio puede tratarse con primeros miembros de un par de unión específica en comparación con otro orificio en el mismo conjunto de orificios. En algunas realizaciones, se debe proporcionar al menos un orificio capilar de referencia sin dichos primeros miembros adsorbidos a la superficie del orificio capilar en cada conjunto de orificios capilares. Además, es posible que dos o más orificios capilares en cada conjunto de orificios capilares reciban el mismo tratamiento, con el fin de proporcionar una redundancia de mediciones en el dispositivo. Además, es posible que dos o más orificios capilares en cada conjunto de orificios capilares reciban el mismo tratamiento y que uno o varios otros orificios en el mismo conjunto reciban un tratamiento diferente, para proporcionar combinaciones de estas ventajas. Preferentemente, los conjuntos de orificios capilares en el dispositivo son duplicados de cada uno, es decir, los orificios en un conjunto de orificios capilares se tratan con el mismo primer miembro o miembros que los orificios de otros conjuntos en el mismo dispositivo. Esto permite realizar el mismo inmunoensayo en varias muestras de fluido de manera simultánea.

Preferentemente, la superficie exterior del cuerpo incluye una primera superficie de medición y una segunda superficie de medición. En uso, se pretende que la luz se transmita a través del dispositivo desde la primera superficie de medición a la segunda superficie de medición. Estas superficies pueden, por ejemplo, ser superficies superiores e inferiores del cuerpo. Preferentemente una o tanto la primera superficie de medición como la segunda superficie de medición se extienden de manera sustancial paralelamente con los ejes principales de los capilares. Una o tanto la primera superficie de medición como la segunda superficie de medición se pueden extender de manera sustancial paralelamente con la dirección de disposición de los capilares.

Una o tanto la primera superficie de medición como la segunda superficie de medición puede ser sustancialmente planar. La ventaja de esto es que se pueden reducir o evitar las distorsiones ópticas debidas a la refracción en las superficies de medición. A su vez, esto puede mejorar la relación de señal con respecto al ruido de una medición tomada mediante interrogación óptica del orificio capilar. Téngase en cuenta que normalmente el cuerpo también incluye superficies laterales. La forma de las superficies laterales no se considera crítica, ya que preferiblemente la interrogación óptica de los taladros capilares no tiene en cuenta la luz desde o cerca de las superficies laterales.

Preferentemente, el cuerpo del dispositivo está formado por un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de más o menos 0,05 del índice de refracción de la muestra de fluido. Por ejemplo, en el caso en el que la muestra de fluido es acuosa, un límite inferior preferido para el índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es 1,28. Un límite superior del índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es 1,38. El índice de refracción se mide a 20 °C con luz de longitud de onda de 589 nm. Más preferentemente, el índice de refracción del material del cuerpo del dispositivo es sustancialmente idéntico al índice de refracción de la muestra de fluido.

Además de ser sustancialmente transparente a la luz visible, el material del cuerpo del dispositivo también puede ser sustancialmente transparente a la radiación electromagnética en el espectro invisible, por ejemplo, luz ultravioleta (UV).

Preferentemente, la longitud del cuerpo extruido, antes de cortarlo, es al menos 50 cm. La longitud puede ser mayor,

por ejemplo al menos 1 m, preferentemente al menos 2 m, 3 m, 4 m, o 5 m. Más preferentemente la longitud del cuerpo extruido, antes de cortarlo, es de al menos 5 m.

5 El inmunoensayo se puede realizar incluyendo una etapa de interrogación óptica. Preferentemente, esto se realiza para proporcionar una imagen pixelada de uno o más, o todos los capilares. Por ejemplo, se puede usar una cámara digital. Sin embargo, más preferiblemente, se usa un escáner de cama plana. Posteriormente, la imagen se puede procesar para determinar un valor numéricamente promediado de la intensidad del píxel correspondiente al (o a cada) capilar. Este valor se puede usar para atribuir los valores de medida al inmunoensayo en el (o cada respectivo) capilar.

10 Preferentemente, en el sistema de inmunoensayo, el soporte mantiene los dispositivos de ensayos en una matriz sustancialmente planar. Además, preferentemente el soporte proporciona medios de observación (tales como una ventana de observación) para permitir que se observe al menos una parte de cada dispositivo de inmunoensayo. Los medios de observación también pueden permitir que se interroge ópticamente cada dispositivo de inmunoensayo por medición.

15 El soporte preferentemente también permite que el inmunoensayo continúe mientras los dispositivos de inmunoensayo se mantienen en el soporte.

20 El sistema además puede incluir una bandeja que tiene una dirección de los pocillos adaptada para recibir reactivos, muestras de fluido u otros líquidos requeridos para el inmunoensayo. La bandeja además está preferentemente adaptada para recibir al menos un extremo de cada dispositivo de inmunoensayo cuando los dispositivos de inmunoensayo se mantienen en el soporte. Esto permite que un extremo de cada orificio capilar esté en comunicación fluida con un líquido retenido en el respectivo pocillo.

25 Preferentemente, el soporte proporciona medios para aspirar el fluido a través de los orificios capilares del dispositivo de inmunoensayo. Normalmente, el soporte permite que esta aspiración tenga lugar al mismo tiempo, por ejemplo, usando un único dispositivo de aspiración tal como un pipeteador.

30 Se puede aspirar una secuencia de fluidos a través de cada capilar moviendo el soporte a lo largo de la bandeja para estar en registro con una secuencia correspondiente de pocillos que contienen los respectivos fluidos.

35 Un IE, tal como se refiere en el presente documento, es un ensayo para determinar la presencia (o medir la concentración) de un miembro de un par de unión específica en una muestra, que hace uso de la unión específica entre dicho miembro y un segundo miembro del par de unión específica. La expresión par de unión se refiere a un primer miembro y a un segundo miembro que son capaces de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando y enzima-sustrato. La presente invención se refiere a pares de unión de tipo antígeno-anticuerpo.

40 Cuando se realiza un IE en un dispositivo de acuerdo con el primer o segundo aspecto, el tiempo de incubación requerido para varios reactivos es reducido en comparación con los IE realizados, por ejemplo, en placas de 96 micropocillos que usan las mismas concentraciones de reactivos.

45 Por ejemplo, cuando se mide la presencia (o concentración) de un segundo miembro de un par de unión específica, se puede incubar la muestra con la población de los primeros miembros durante 20 minutos o menos, durante 15 minutos o menos, o durante 10 minutos o menos. Por ejemplo, la muestra de fluido puede incubarse con la población de los primeros miembros durante 10 a 20 minutos, durante 10 a 15 minutos, durante aproximadamente 10 minutos.

50 Se conocen muchos tipos diferentes de IE en la materia, incluyendo IE no competitivos y competitivos. Algunos ejemplos se describen brevemente a continuación.

55 Los IE no competitivos pueden implicar, por ejemplo, inmovilizar un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un antígeno en un soporte sólido. El anticuerpo inmovilizado puede poner después en contacto con una muestra de interés. Si la muestra contiene el antígeno en cuestión, se unirá al anticuerpo. Un segundo anticuerpo, que también es capaz de unirse al antígeno pero que se une a un epítipo diferente en el antígeno al del primer anticuerpo, se añade después y se permite su unión. Para permitir la detección, se puede marcar el segundo anticuerpo con un marcador detectable. Como alternativa, se puede añadir un tercer anticuerpo conocido por ser capaz de unirse específicamente al segundo anticuerpo y marcado con un marcador detectable y se permite su unión con el segundo anticuerpo. La cantidad de anticuerpo marcado unido al soporte sólido se mide después, en donde la cantidad de anticuerpo marcado detectado es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Las Figuras 8, 9 y 10 muestran ejemplos esquemáticos de IE no competitivos.

65 Como se ha descrito anteriormente en relación con la muestra de fluido, los tiempos de incubación para el segundo (y tercer anticuerpo, si está presente) están reducidos de manera similar en los IE realizados en dispositivos de acuerdo con el primer o segundo aspecto en comparación con los IE realizados en, por ejemplo, placas de 96 micropocillos que usan las mismas concentraciones de anticuerpos. Específicamente, el segundo y/o tercer anticuerpo se puede incubar en los orificios capilares durante 20 minutos o menos, durante 15 minutos o menos, o durante 10 minutos o menos. Por

ejemplo, el segundo y/o tercer anticuerpo se puede incubar en los orificios capilares durante 10 a 20 minutos, durante 10 a 15 minutos, o durante aproximadamente 10 minutos.

5 Los IE competitivos pueden implicar la inmovilización, por ejemplo, de un anticuerpo o un antígeno en un soporte sólido dependiendo de si se pretende que el ensayo determine la presencia de un antígeno o un anticuerpo en una muestra de interés. Por ejemplo, cuando se pretende ensayar la presencia de un antígeno en una muestra, se puede inmovilizar un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a dicho antígeno en un soporte sólido. El antígeno marcado se añade después y se permite su unión al anticuerpo inmovilizado, seguido de la adición de la muestra. Si la muestra contiene el antígeno en cuestión, competirá con el antígeno marcado por la unión al anticuerpo inmovilizado.
10 Después se mide la cantidad de antígeno marcado unido al soporte sólido. En este caso, la cantidad de antígeno marcado detectado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

15 Un primer miembro de un par de unión específica es capaz de unirse específicamente a un segundo miembro de un par de unión específica. Un primer miembro de un par de unión específica puede, por ejemplo, ser una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), un polisacárido, un péptido, un ácido nucleico, o una molécula pequeña (por ejemplo, un hapteno). Un segundo miembro de un par de unión específica puede ser de manera similar una proteína (por ejemplo, un anticuerpo), un péptido, un ácido nucleico, o una molécula pequeña (por ejemplo, un hapteno). Un segundo miembro de unión puede estar comprendido en un analito.

20 Cuando el par de unión específica es un par de unión antígeno-anticuerpo, el primer miembro de unión puede, por ejemplo, ser un anticuerpo y el segundo miembro de unión puede ser un antígeno, en el que el anticuerpo es capaz de unirse específicamente con el antígeno. Como alternativa, el primer miembro de unión puede ser un antígeno y el segundo miembro de unión puede ser un anticuerpo, en el que el antígeno es capaz de unirse específicamente con el anticuerpo.

25 El primer miembro del par de unión específica se puede inmovilizar en el soporte sólido de varias maneras conocidas en la materia. Por ejemplo, el primer miembro de un par de unión específica puede adsorberse directamente al soporte sólido, por ejemplo, a través de interacciones electrostáticas y/o hidrófobas, tales como en el caso de soportes sólidos plásticos. Como alternativa, el primer miembro del par de unión específica puede unirse de manera covalente al soporte sólido. En este caso, el soporte sólido puede modificarse químicamente para introducir o activar grupos químicos funcionales en la superficie del soporte, tales como grupos hidroxilo o amino y el soporte reticulado usando agentes reticulantes tales como glutaraldehído, para facilitar la unión covalente del primer miembro al soporte sólido. En una alternativa adicional, el primer miembro del par de unión específica se puede unir indirectamente al soporte sólido mediante una interacción de unión específica, por ejemplo, mediante una interacción entre biotina y avidina, o inmovilizando la proteína A o la proteína G en el soporte sólido seguido de una unión específica a las moléculas de anticuerpo.
30
35

40 El término "anticuerpo" describe una inmunoglobulina tanto natural o producida parcial o totalmente de manera sintética. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Así pues, este término abarca fragmentos de anticuerpo, derivados y moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno del anticuerpo, o equivalente, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otra especie o perteneciente a cualquier clase o subclase de anticuerpo).

45 Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fd, Fv, dAb, regiones CDR, F(ab')₂, Fab', Fab'-SH, scFv, dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos; y diacuerpos. Tales fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la materia.

50 Un sitio de unión a antígeno, tal como se refiere en el presente documento, es la parte de una molécula que se une a, y es complementaria con todas o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se refiere como el sitio de unión a antígeno del anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria con todo o parte del antígeno diana. En los casos donde el antígeno es grande, un anticuerpo se puede unir solamente a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Un sitio de unión a antígenos de anticuerpos puede proporcionarse mediante uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada del anticuerpo (VH).
55

60 Un antígeno tal como se refiere en el presente documento es cualquier sustancia que se puede unir de manera específica a un anticuerpo. Tales sustancias incluyen: proteínas, péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y pequeñas moléculas (por ejemplo, haptenos).

65 Las expresiones "específica" y "de forma específica" tal como se usan en el presente documento se pueden referir a la situación en la cual un miembro de un par de unión específica no mostrará cualquier unión significativa a otra molécula que no sea su(s) compañero(s) de unión, por ejemplo, el otro miembro del par de unión específica. Estas expresiones también se aplican cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que lo llevan varios antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que lleva el dominio de unión a antígeno será capaz de unirse a varios antígenos que lleven el epítipo.

La unión de un primer miembro de unión a un segundo miembro de unión se puede detectar de forma directa o indirecta.

5 Cuando se detecta de forma directa la unión de un primer miembro de unión a un segundo miembro de unión, el segundo miembro de unión se puede marcar con un marcador detectable. Si se añade después una muestra que comprende segundos miembros de unión, estos segundos miembros de unión no marcados competirán con los segundos miembros de unión marcados por la unión con el primer miembro de unión. En este caso, la cantidad de marcador detectado es inversamente proporcional a la cantidad de segundo miembro de unión presente en la muestra.

10 Cuando se detecta de forma indirecta la unión del primer miembro de unión al segundo miembro de unión, la unión se puede detectar usando un tercer miembro de unión, por ejemplo, un anticuerpo, capaz de unirse específicamente al segundo miembro de unión y marcado con un marcador detectable. Como alternativa, la unión de un primer miembro de unión a un segundo miembro de unión se puede detectar usando un tercer miembro de unión, por ejemplo, un anticuerpo, capaz de unirse específicamente al segundo miembro de unión un cuarto miembro de unión capaz de unirse específicamente al tercer miembro de unión y marcado con un marcador detectable.

20 Un marcador detectable tal como se refiere en el presente documento puede ser cualquier marcador que produce o puede inducirse para producir una señal, incluyendo, pero sin limitarse a fluorescentes, quimioluminiscentes (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante), marcadores de color (por ejemplo, látex [azul] u oro coloidal [rojo]), radiomarcadores, enzimas y marcadores magnéticos. La cantidad de marcador unido a una superficie, por ejemplo, a una superficie de un orificio capilar, puede, por lo tanto, detectarse y/o medirse mediante detección por fluorescencia o luminiscencia, color, radioactividad, actividad enzimática, o cambios en el campo magnético. Los marcadores detectables pueden unirse a miembros de unión usando la química convencional. Preferentemente, un marcador detectable es un marcador detectable mediante interrogación óptica, por ejemplo, con una cámara digital o con un escáner de cama plana. Los marcadores que se pueden detectar mediante interrogación óptica incluyen marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y de color. El mecanismo mediante el cual se puede generar una señal para la detección óptica incluye (pero no se limita necesariamente a): absorción de luz, dispersión de luz, difracción de luz, reflexión de luz, fluorescencia o luminiscencia.

30 El término "comprende" se usa de forma general en el sentido de incluir, es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes adicionales.

35 "Y/o", en los casos donde se use en el presente documento, debe entenderse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe entenderse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justo como si se expusiese cada uno individualmente en el presente documento.

40 A menos que el contexto dicte lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no están limitadas a cualquier aspecto o realización particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

45 A continuación se ilustrarán ciertos aspectos y realizaciones de la invención a modo de ejemplo y con referencia a las figuras descritas a continuación.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 es un diagrama esquemático de un aparato de extrusión para su uso en la fabricación de dispositivos de inmunoensayo de acuerdo con una realización preferente de la invención.

La Figura 2 es una sección transversal esquemática a través del troquel mostrado en la Figura 1.

La Figura 3 es una vista esquemática desde abajo del troquel mostrado en la Figura 1.

55 Las Figuras 4-7 ilustran el efecto del volumen y área superficial para un inmunoensayo en un pocillo de microtitulación (Figura 4) y un orificio capilar (Figura 5).

60 Las Figuras 6 y 7 muestran el impacto directo en la distancia de difusión proporcionada mediante longitudes prácticas de capilares (en el intervalo 5-50 mm), en comparación con los pocillos de una placa de microtitulación estándar.

La Figura 8 muestra el proceso de un ELISA de forma esquemática.

La Figura 9 ilustra las diferentes etapas de un ELISA en más detalle.

65 La Figura 10 ilustra las etapas de un inmunoensayo llevado a cabo en un orificio capilar.

- Las Figuras 11A-D ilustran el efecto del índice de refracción del cuerpo del dispositivo de inmunoensayo capilar en las distorsiones ópticas durante la interrogación óptica.
- 5 Las Figuras 12-14 ilustran un método para fabricar un dispositivo de inmunoensayo de acuerdo con una realización de la presente invención. Otro método de fabricación que comprende una etapa adicional de separar los capilares del dispositivo de inmunoensayo en un extremo del dispositivo se muestra en las Figuras 39-40.
- 10 Las Figuras 15-17 muestran vistas más detalladas de partes del dispositivo de inmunoensayo de película microcapilar cargada de acuerdo con una realización preferente de la presente invención.
- La Figura 18 muestra el ensamblaje de un sistema de inmunoensayo para múltiples muestras de acuerdo con una realización preferente de la presente invención.
- 15 La Figura 19 muestra una vista en planta del casete del sistema de inmunoensayo de la Figura 18.
- La Figura 20 muestra una vista lateral del casete de un sistema de inmunoensayo de la Figura 18.
- La Figura 21 muestra el casete de la Figura 18 siendo escaneado en un escáner de cama plana.
- 20 La Figura 22 muestra una vista ampliada de una porción de un dispositivo de inmunoensayo de MCF, tal como se ve a través de una ventana del casete.
- Las Figuras 23A y 23B muestran gráficas esquemáticas de la intensidad de píxel a través de diferentes dispositivos de inmunoensayo en el mismo casete.
- 25 Las Figuras 24A-C muestran la evaluación de la adsorción de anticuerpos y la detección de la señal en una MCF-FEP.
- 30 La Figura 24A muestra una representación esquemática de la adsorción de anticuerpos y detección en la MCF-FEP.
- La Figura 24B muestra una gráfica de una intensidad fluorescente media a través de la matriz capilar. Las concentraciones de IgG de ratón ($\mu\text{g/ml}$) en cada capilar se indican debajo de la gráfica.
- 35 La Figura 24C muestra una gráfica de la altura, h, de intensidad fluorescente gris medida a la entrada y salida de una bobina de MCF de 5 metros.
- Las Figuras 25A y 25B demuestran la detección multi-analito usando una matriz extruida de capilares.
- 40 La Figura 26 muestra una vista esquemática de una sección transversal del formato de un dispositivo de inmunoensayo usado para obtener los resultados mostrados en la Figura 27.
- 45 La Figura 27 muestra imágenes obtenidas de escanear un dispositivo de inmunoensayo de acuerdo con la presente invención usando un escáner de cama plana después de un inmunoensayo.
- La Figura 28 muestra la detección de la señal en las MCF extruidas usando otros materiales termoplásticos en un escáner de cama plana.
- 50 La Figura 29 muestra los resultados obtenidos usando cuerpos capilares FEP circulares de un solo orificio.
- Las Figuras 30A, 30B, 31 y 32 demuestran la sensibilidad de la realización preferente de la presente invención en comparación con una placa de microtitulación para un ensayo de detección de hepatitis B.
- 55 La Figura 30A muestra una representación esquemática del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima realizado en MCF-FEP.
- La Figura 30B muestra la intensidad lumínica promedio medida escaneando 8 tiras individuales de MCF-FEP en las que se realizó un inmunoensayo para detectar anticuerpos contra la hepatitis B para ensayar 8 concentraciones diferentes de anticuerpo anti-antígeno del núcleo de la hepatitis B. La intensidad lumínica promedio se representó con respecto a la distancia entre las tiras de MCF-FEP, con la concentración de anticuerpo en cada muestra indicada encima de las gráficas. La intensidad lumínica promedio se calculó para una longitud de aproximadamente 1 mm medida paralela al eje de los capilares.
- 60 La Figura 31 muestra un gráfico de la intensidad media de pico para todas las muestras con respecto a la concentración de anti-HB-CAg.
- 65

La Figura 32A muestra un gráfico de la intensidad pico media del escáner para las muestras seleccionadas trazadas en la Figura 31 en un intervalo de concentraciones de anti-HB-CAg que muestran una relación lineal entre la intensidad del escáner y la concentración de anti-HB-CAg.

5 La Figura 32B muestra una gráfica de densidad óptica y absorbancia con respecto a la concentración para un ELISA que se llevó a cabo en un inmunoensayo con placa de microtitulación de 96 pocillos sobre el mismo intervalo de concentraciones medidas en la Figura 31 y representadas en la Figura 32A.

10 La Figura 33 ilustra el efecto del índice de refracción del fluido en el gráfico del perfil para una MCF-FEP (descrito en la Tabla 1).

La Figura 34 ilustra el efecto del índice de refracción del fluido en el gráfico del perfil para una MCF-EVA (descrito en la Tabla 1).

15 La Figura 35A resume la variación de la señal y ruido con el índice de refracción para MCF-FEP y MCF-EVA (como se describe en la Tabla 1).

20 La Figura 35B resume la variación de la relación de señal con respecto al ruido en MCF-FEP y MCF-EVA (como se describe en la Tabla 1).

La Figura 36 muestra una comparación en general de la realización de in IE tipo sándwich realizado en MCF-FEP con un IE tipo sándwich realizado en una placa de 96 micropocillos. Abs/cm indica Absorbancia por cm.

25 La concentración del analito (biomarcador de cáncer PSA) en ng/ml se indica en el eje x.

La Figura 37 muestra una comparación de los principales tiempos de incubación para un IE de tipo sándwich realizado en una placa de 96 pocillos y un IE de tipo sándwich realizado en MCF-FEP.

30 Las Figuras 38-40 ilustran un método para fabricar un dispositivo de inmunoensayo de acuerdo con una realización de la presente invención.

En este caso, los capilares del dispositivo de inmunoensayo están separados en un extremo del dispositivo para facilitar la captación de diferentes muestras en cada uno de los capilares. En la Figura 39 los capilares están individualizados, permitiendo que cada capilar se ponga en contacto con una bandeja de muestra diferente. Como alternativa, los capilares se pueden separar en pares de dos capilares cada uno, tal como se muestra en la Figura 40. Los dos capilares pueden recibir después un tratamiento idéntico para proporcionar redundancia de mediciones en el dispositivo. También está previsto separar los capilares en otras disposiciones, por ejemplo, conjuntos de tres o más capilares. La separación puede variar dependiendo del número de muestras a analizar, del número de controles requeridos y de si se va a proporcionar redundancia de medición en el dispositivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERENTE Y CARACTERÍSTICAS PREFERENTES ADICIONALES DE LA INVENCION

45 En una realización preferida de la presente invención, se proporciona una plataforma para inmunoensayos (IE) cuantitativos multiplexados. Los presentes inventores han demostrado que las proteínas antigénicas y los anticuerpos se pueden inmovilizar con éxito en la superficie interna súper-hidrófoba de una matriz de 10 microcapilares que tienen un diámetro interno de aproximadamente 200 μm y están embebidos en una única película plástica sustancialmente plana extruida de un material fluoropolímero. Las secciones cortas de la película plástica (de hasta 5 cm de largo) se han interconectado con un micropipeteador estándar que permite la detección de múltiples analitos con un único puerto de alimentación de muestra y usando volúmenes mínimos de reactivos. La geometría plana y las excelentes propiedades ópticas de la película plástica permiten la interrogación cruzada directa de los capilares para la detección y cuantificación de la señal usando sistemas ópticos convencionales, tales como una cámara CCD o un escáner de cama plana. El pequeño volumen interno y el diámetro de los capilares permiten reducciones significativas en los costes de los reactivos y en el tiempo de ensayo en comparación con los IE en placas de microtitulación. Además, los costes de inversión relacionados con la adquisición de un equipo de detección especializado se pueden minimizar sin afectar a la sensibilidad del IE. Esta nueva plataforma de IE multiplexado encuentra una principal aplicación por ejemplo como una herramienta de diagnóstico clínico para la detección de enfermedades del corazón y de cáncer en países desarrollados o la detección de patógenos en países del tercer mundo.

60 En una realización preferente, la presente invención utiliza un cuerpo capilar fabricado de acuerdo con la divulgación del documento WO 2005/056272.

65 El documento WO 2005/056272 desvela aparatos para producir un producto de material extruido, el producto de material extruido que incluye una pluralidad de canales capilares a través del mismo, el aparato que comprende un producto extruido que tiene una entrada, un troquel que incluye un orificio que tiene una forma externa

predeterminada, una pluralidad de agujas, cada una de las cuales tiene un cuerpo que incluye un conducto interno para el flujo del fluido, cada aguja además comprende una salida del conducto interno a un extremo de salida, el extremo de salida de cada aguja se dispone en un patrón predeterminado, sustancialmente dentro del orificio del troquel, estando el conducto de cada aguja conectado de manera fluida a una fuente de fluido, en el que, en uso:

- 5
- a) Se introduce material extruible en la extrusora a través de la entrada;
 - b) la extrusora fuerza el material extruible alrededor de los cuerpos de las agujas hacia el troquel y a través del orificio en el troquel para producir un producto extruido que tiene sustancialmente la forma externa predeterminada;
 - 10 c) las agujas permiten que el fluido se extraiga de la fuente de fluido a través del conducto para entrar en el producto extruido para formar capilares de forma que el producto extruido incluye capilares a lo largo del patrón predeterminado.

15 Se ha descubierto que el problema del hinchamiento del troquel en los capilares se reduce de manera sustancial o se niega cuando se permite al fluido entrar en el capilar. Esto permite que el orificio de los capilares se controle de forma precisa, de manera que se puedan producir de manera fiable orificios capilares pequeños. Está previsto que los capilares que tiene un orificio entre aproximadamente 2 mm hasta 10 micrómetros se produzcan en una única etapa de procesamiento en estado fundido. Sin embargo, está previsto que una etapa adicional de procesamiento pueda producir capilares que tenga un orificio por debajo de 1 micrómetro. Podría entenderse que los orificios capilares también se denominan como microcapilares.

20 Es preferible que las salidas de aguja se distribuyan de manera sustancialmente uniforme en el orificio del troquel, ya que esto ayuda a prevenir la mala distribución del material extruido. Es preferible que cada salida de la aguja esté a una distancia sustancialmente igual de otras salidas y desde el orificio del troquel. Por ejemplo, si el orificio del troquel es sustancialmente rectangular y el patrón predeterminado de las salidas de aguja es una simple línea de salidas dentro del orificio, es preferible que la línea esté dispuesta sustancialmente de forma centrada en el lado corto del rectángulo y que las distancias entre las salidas de las agujas sean sustancialmente idénticas a la distancia entre las salidas exteriores de las agujas y los bordes cortos del orificio y la línea de salidas y los bordes largos del orificio. La salida de aguja puede ser de cualquier tamaño adecuado, pero está preferentemente entre 2 mm y 0,1 mm y más preferentemente entre 0,6 mm 0,2 m. Por ejemplo, con un tamaño de salida de la aguja de 0,3 mm, los orificios capilares de entre 200 micrómetros y 20 micrómetros se pueden producir fácilmente dependiendo de las condiciones de procesamiento.

25 Es preferible que la presión del fluido que entra en los capilares a través de las agujas sea sustancialmente igual a la presión del medio en el que el producto extruido se extrude, ya que se ha descubierto que esto produce un producto extruido más estable. Es preferible que el flujo del material extruible arrastre el fluido en el capilar, pero debe entenderse que el fluido puede entrar en los capilares a una presión por encima o por debajo de la presión del medio en el que se ha extruido el producto extruido, pero que se puede necesitar un mayor control. El fluido al que se le permite entrar en los capilares será normalmente aire a presión y temperatura ambiente, pero la extrusión puede ser en un baño líquido u otro medio infrecuente. La fuente de fluido puede ser aire a temperatura ambiente y presión si el producto extruido se extrude en tal ambiente y puede extraerse directamente de la atmósfera local. Sin embargo, debe entenderse que la fuente de fluido puede ser un gas inerte o un líquido, o una muestra gaseosa o líquida que ha de atraparse dentro de los capilares en el producto extruido.

30 Es preferible que se use una bomba de engranajes para estabilizar el flujo de material extruible entre la extrusora y el troquel. Esto ayuda a reducir cualquier anomalía de flujo que pueda resultar de variaciones en el funcionamiento de la extrusora.

35 El troquel se usa para tomar la alimentación de producto de la extrusora y cambiar la forma del flujo de material hasta que tenga la forma externa deseada y pueda salir a través del orificio del troquel que tiene sustancialmente la misma forma externa predeterminada. Debe entenderse que, debido a la dilatación del troquel, la forma externa del producto extruido podría no corresponderse exactamente con la forma predeterminada del orificio. Se prefiere que el troquel sea un troquel convergente. El troquel está preferentemente conformado para garantizar que el flujo sobre las agujas sea sustancialmente uniforme, ya que esto ayuda a crear un producto extruido regular y bien formado

40 Se prefiere que el orificio del troquel sea sustancialmente rectangular para que la forma externa resultante del producto extruido sea sustancialmente rectangular. Las dimensiones del orificio rectangular son preferentemente tales que el producto extruido sea una lámina o película. Preferentemente el orificio rectangular tiene un lado largo que tiene una longitud que es al menos varias veces más largo que el lado más corto. Preferentemente la relación es mayor de 10 ya que esto permitiría que la película se doblara más fácilmente. Debe entenderse que el orificio podría adoptar cualquier otra forma adecuada, incluyendo un anillo, cuadrado o círculo. Se ha constatado que con un troquel no circular, por ejemplo un troquel rectangular puede tener efectos periféricos que alteren la forma de los capilares en o cerca de un borde de la película. Tal efecto periférico puede anularse mediante el uso de un troquel anular que es, en efecto, una película continua que no tiene bordes. Un troquel anular podría permitir la producción de un producto extruido que tenga mayor consistencia del tamaño y con la forma de los capilares.

45 Por razones de simplicidad el aparato se describirá a continuación con referencia a una realización preferente en la

que el troquel tiene un orificio sustancialmente rectangular en el que se dispone una matriz de salidas de aguja en una línea sustancialmente paralela con el lado largo del rectángulo y sustancialmente en el centro de los lados cortos del orificio. Esto produce una película extruida que tiene una pluralidad de capilares a lo largo de la misma. Debe entenderse que podrían emplearse diferentes matrices y formas de orificio.

5 Se prefiere que las salidas de aguja tenga una forma sustancialmente circular. Esta forma de salida es fácil de formar, pero podrían usarse otras formas si así se desea. También se prefiere que el cuerpo de cada aguja sea sustancialmente cilíndrico y alargado a lo largo de un primer eje. Los cuerpos se disponen preferentemente de manera que el primer eje del cuerpo cilíndrico sea sustancialmente paralelo al flujo de material, ya que esto proporciona una
10 baja resistencia al flujo de material y es fácil de fabricar.

Debe entenderse que la pluralidad de agujas puede formarse individualmente, integralmente, o en grupos de dos o más agujas. Por ejemplo podría usarse un monolito sólido de metal para formar una pluralidad de agujas. El monolito podría incluir agujeros a través del mismo para formar las agujas que requiere la invención. Las agujas pueden incluir
15 una entrada común que se divide luego entonces en una pluralidad de conductos que lleven a una pluralidad de salidas. Las salidas de las agujas desde el monolito pueden sobresalir del monolito permitiendo que el producto extruido fluya alrededor de la protrusión antes de se extraiga el gas de la salida, o pueden no sobresalir en absoluto. El producto extruido fluirá alrededor del monolito y extraerá gas a través de las salidas como se ha descrito anteriormente.

20 Aunque se ha mencionado antes que se reduce o anula sustancialmente la dilatación del troquel dentro de los capilares, se sigue produciendo una dilatación en la salida del troquel. La forma externa del producto extruido se dilatará a medida que sale por el orificio. En el caso de la película, se ha descubierto que la dilatación es mayor a lo largo del eje corto del orificio rectangular que a lo largo del eje largo. El resultado es que los capilares sustancialmente
25 circulares dentro del producto extruido, antes de dilatarse, se distorsionan en una forma elíptica con el eje largo sustancialmente paralelo al eje corto de la sección transversal rectangular de la película. Debe entenderse que con variaciones en la forma externa y el procesado, puede variarse la sección transversal de los capilares.

30 El producto extruido preferentemente se extrae por el orificio a una tasa mayor que la tasa a la que se produce el producto. La relación de extracción es la relación de la tasa de producción de extruido sobre la tasa a la que se extrae el producto extruido. En algunas relaciones de extracción (entre 16 y 20) parece que el efecto de dilatación del troquel domina y los capilares son sustancialmente elípticos.

35 A relaciones de extracción más elevadas (por encima de 30) el cambio en geometría debido a la extracción del producto extruido domina. Como se ha mostrado en la literatura, durante la extracción de un producto extruido que tiene una sección transversal rectangular, la longitud del eje corto decrece a una tasa mayor que la longitud del eje largo del producto extruido y de ese modo los capilares se distorsionan para formar capilares sustancialmente elípticos que tienen su eje largo sustancialmente paralelo al eje largo de la sección transversal rectangular. El proceso de extracción normalmente reduce las dimensiones totales en sección transversal del producto extruido y por lo tanto
40 reduce las dimensiones de los capilares dentro del producto.

También se ha descubierto que puede ser posible procesar adicionalmente el producto extruido después de la extracción. Este proceso adicional puede ser bien extracción en frío o extracción en caliente a una temperatura elevada. Se ha descubierto que la extracción en frío puede reducir las dimensiones del producto entre dos y tres veces
45 y se ha de esperar una mayor reducción cuando se usa la extracción en caliente.

El aparato y un proceso que usa el aparato es capaz de producir un producto extruido de sección rectangular con múltiples capilares que discurren a lo largo de la longitud del producto.

50 El documento WO 2005/056272 divulga la producción de productos extruidos con múltiples capilares elípticos con una longitud del eje mayor de aproximadamente 65 μm y una longitud del eje menor de aproximadamente 35 μm . Cabe destacar que la relación de aspecto y el diámetro medio del capilar pueden variarse mediante cambios en las condiciones del proceso. El producto extruido normalmente adopta la forma de películas. Cada película normalmente tiene una longitud y una sección transversal sustancialmente rectangular, perpendicular a dicha longitud, incluyendo
55 dicha sección transversal dos lados largos y dos lados cortos, incluyendo la película una pluralidad de orificios capilares sustancialmente paralelos a la longitud de la película.

60 El documento WO 2005/056272 además divulga que la producción de una longitud de producto extruido de aproximadamente 20 m de largo permitía una investigación de las dimensiones de los capilares en cinco secciones a lo largo del extruido mediante microscopía electrónica de barrido. Esto reveló que la variación en las dimensiones de los capilares no era mayor que aproximadamente 10 % a lo largo de la longitud del producto.

65 El documento WO 2005/056272 además también divulga la formación de productos extruidos usando, por ejemplo LLDPE. Se ha encontrado que tales polímeros tienen una buena transparencia óptica, a pesar de cualquier contenido cristalino presente dentro del polímero.

El documento WO 2005/056272 sugiere que podría obtenerse transparencia óptica total o al menos un nivel

significativamente aumentado de transparencia óptica usando un polímero amorfo tal como un poliestireno. Sin embargo, cabe destacar que estos materiales no son necesariamente los materiales preferentes para su uso con las realizaciones de la presente invención.

5 La Figura 1 muestra un aparato de extrusión 1 para crear un producto extruido 2 que tenga orificios capilares a lo largo del mismo. El aparato de extrusión comprende una extrusora de tornillo 4 accionada por un motor 6. Se alimenta la extrusora de tornillo 4 de material extruible 8 mediante una tolva 10. A medida que el material extruible pasa a través de la extrusora de tornillo 4, el material se funde para formar un material fundido (no mostrado). La extrusora de tornillo 4 alimenta de material fundido a una bomba de engranajes 12 que mantiene un flujo sustancialmente constante de material fundido hacia un troquel 14. La bomba de engranajes 12 está conectada a la extrusora de tornillo 4 por una brida 16 que incluye un filtro de pantalla para retirar impurezas del flujo de material fundido. El motor 6 se controla usando un enlace 18 de retroalimentación de presión entre la entrada de la bomba de engranajes y el motor 6.

15 El material fundido pasa al troquel 14 a través de un cilindro 20 de extrusión que está conectado a la bomba de engranajes por una brida 22. En esta realización el cilindro de extrusión incluye una curva 24 de 90°. Los calentadores de banda 26 se usan para controlar la temperatura en diferentes estadios en el aparato de extrusión 1. Los calentadores de banda 26 pueden estar situados dentro de la extrusora, sobre las bridas 16, 22, en la bomba de engranajes 12, en el cilindro 5 20 de extrusión y también en el troquel 14.

20 El detalle de la disposición del troquel 14 se mostrará en mayor detalle en las siguientes figuras.

El material fundido pasa a través del troquel 14 y se conforma con la forma y sección transversal deseadas. A medida que el material fundido sale del troquel se convierte en un extruido 28. El extruido 28 se extrae hacia abajo sobre y entre los rodillos 30. El proceso de extracción, como se ha descrito antes, altera la sección transversal del extruido 28 para formar el producto extruido 2. Una longitud extraída (L) 29 se define entre el orificio y el primer rodillo 30. Se ha descubierto que L tiene un gran efecto en el producto extruido 2 formado por este aparato.

25 La Figura 2 muestra una sección transversal esquemática a través del troquel 14 de la Figura 1. El troquel incluye una parte de introducción 32, una parte convergente 34 y un orificio 36 que tiene una forma externa predeterminada. El producto fundido entra en la parte de introducción 32 del troquel 14, la parte convergente 34 lo conforma gradualmente hasta que el material fundido sale por el orificio 36.

30 El troquel 14 además incluye agujas 38 (de las cuales solo se muestra una en esta figura) posicionadas en el mismo. La aguja 38, una parte de cuerpo 40 que tiene un conducto 42 en el mismo que está conectado de manera fluida a una fuente de fluido 44 por medio de un segundo conducto 43 que pasa a través de una pared del troquel 14 alrededor del cual el material fundido debe fluir para pasar al orificio 36. La aguja 38 además incluye una salida 46 en un extremo 48 de la aguja 38. La aguja 38 está dispuesta de manera que la salida 46 esté situada dentro del orificio 36.

35 La Figura 3 muestra una vista esquemática del troquel 14 desde abajo. Este dibujo muestra que el orificio 36 tiene una forma externa rectangular. El orificio tiene un lado corto 50 sustancialmente paralelo a un eje corto 51 y un lado largo 52 sustancialmente paralelo a un eje largo 53.

40 En este ejemplo, el troquel incluye diez agujas 38 con las salidas 46 distribuidas de manera sustancialmente uniforme a lo largo del eje largo 53 dentro del orificio y sustancialmente de manera centrada en el orificio a lo largo del eje corto 51. En este ejemplo, el orificio del troquel tiene una dimensión de 1,5 mm en el lado corto, una dimensión de 18 mm en el lado largo y las agujas tienen 0,5 mm de diámetro externo y 0,3 mm de agujero interno.

45 En un ejemplo de proceso, se produce un polímero fundido en una extrusora de tornillo 4 y la tasa de flujo resultante se estabiliza por medio de una bomba de engranajes 12. Con este material fundido se alimenta entonces un troquel 14, en cuyo orificio se dispone una pluralidad de salidas de agujas 38 en un patrón predeterminado. Se alimenta un conducto 42 a través de cada aguja 38, desde un conducto 43 de alimentación orientado horizontalmente, cuya boca está abierta a la atmósfera fuera del troquel que es la fuente de fluido 44. El producto extruido resultante se hace pasar luego sobre una serie de rodillos 30 en un dispositivo de tracción (no mostrado). La velocidad del dispositivo de tracción puede alterarse de manera que puedan producirse productos extruidos 2 con diferentes relaciones de extracción.

50 El troquel 14 está diseñado de manera que el flujo entrante desde la extrusora, que está contenido en una tubería circular, se altere de manera que pueda pasar a través del orificio 36 del troquel 14. El troquel 14 debe efectuar este cambio de geometría y esto se consigue actualmente usando un troquel 14 convergente.

55 El troquel 14 también está diseñado de modo que el flujo sobre la matriz de agujas 38 sea sustancialmente uniforme. Un flujo uniforme de material fundido alrededor de las agujas 38 facilita la creación de un extruido 28 bien formado. Si, sin embargo, hubiera un flujo no uniforme, el material fundido preferentemente se canalizaría a lo largo de la trayectoria de menor resistencia. Esto tendría como resultado un extruido 28 distorsionado.

60 En el documento WO 2005/056272, el proceso se opera a aproximadamente 165 °C usando polietileno lineal de baja

densidad (LLDPE). El motor 6 se controla usando un bucle de retroalimentación de presión que se establece en 2,07 MPa (300 PSI) y esto, a su vez, provoca una presión de aproximadamente un cuantos bares en el troquel 14. Se arrastra aire como resultado del flujo de polímero sobre la matriz de agujas 38 y la alimentación a esta matriz de agujas 38 se deja abierta a la atmósfera. La velocidad del polímero fundido en el orificio 36 del troquel es del orden de un centímetro por segundo, la velocidad del dispositivo de tracción puede establecerse en cualquier punto entre cero y 9 metros por minuto.

Se descubrió que el parámetro que tiene una influencia sustancial en el producto final era la distancia L 29, mostrada en la Fig. 1 y que se ha definido que es la distancia entre la salida del troquel y el primer rodillo 30. De hecho, en este caso el primer rodillo es una varilla fija de acero inoxidable pulido, sumergida en un baño de agua.

El efecto de la variación de L se explica con más detalle en el documento WO 2005/056272.

Las Figuras 4-7 ilustran algunas consideraciones generales relacionadas con inmunoensayos llevados a cabo en pocillos de una placa de microtitulación en comparación con los orificios capilares. Es posible demostrar que la geometría de un capilar permite ahorros sustanciales en reactivos y en tiempo para llevar a cabo un inmunoensayo.

Se calculó el volumen de líquido de trabajo y el área superficial de plástico en contacto con el líquido de trabajo. (a) Un micropocillo de las dimensiones indicadas relleno con un intervalo de volúmenes de trabajo de 50 μ l a 300 μ l y (b) un capilar de diámetro interno de 50 μ m a 400 μ m con una longitud de 5 mm a 50 mm. El área superficial y el volumen para estos se representaron en (c) y la máxima distancia de difusión se representó en (d).

En las Figuras 4-7, se considera la relevancia del volumen y el área superficial para un inmunoensayo. La Figura 4 ilustra de manera esquemática un IE llevado a cabo en una placa de microtitulación de pocillos. La altura del pocillo es 11,3 mm y el diámetro es 6,5 mm. La profundidad del volumen de trabajo V_w es variable h y V_w varía entre 50 μ l y 300 μ l. Por el contrario, la Figura 5 muestra esquemáticamente el orificio de un capilar. La longitud es L y el diámetro es D_c . x_{max} es la máxima distancia a la que deben difundir las especies para alcanzar la superficie interna del orificio capilar. Para el capilar, el diámetro interno va desde 50 μ m a 400 μ m con una longitud desde 5 mm hasta 50 mm.

Las Figuras 6 y 7 muestran el impacto directo en la distancia de difusión proporcionada mediante longitudes prácticas de capilares (en el intervalo 5-50 mm), en comparación con los pocillos de una placa de microtitulación estándar. Se pueden extraer varias conclusiones importantes de estas figuras:

- En un microcapilar de 200 μ m de d.i. (diámetro interno), la máxima distancia de difusión es cinco veces más pequeña para una microtitulación de 50 μ l en una placa de micropocillos, (nótese que el volumen de muestra estándar para un ELISA en placas de micropocillos es de 100 μ l). Siguiendo la ley de Einstein para la distancia de difusión, $x = \sqrt{2Dt}$, donde x es la distancia de difusión y D es el coeficiente de difusión molecular de la proteína, se puede obtener una reducción en los tiempos de incubación de 25 a 100 veces para un proceso de inmovilización controlada por difusión usando un microcapilar. Para un ELISA sensible, donde todos los analitos disponibles se deben dar lo suficientemente largos como para difundir a una superficie con un anticuerpo de captura inmovilizado, el intervalo en los tiempos de duración se puede reducir desde 2-16 horas hasta 1-40 minutos.
- El volumen de los capilares es mucho más bajo para un área superficial dada. Esto significa que se requiere menos reactivo y muestra para llevar a cabo el mismo IE.
- En un microcapilar, la relación de superficie sobre volumen es mucho mayor que para un pocillo de placa de microtitulación, por lo tanto, la sensibilidad del IE no se reduce.

La Figura 8 muestra el proceso de un ELISA de forma esquemática. Se captura (inmoviliza) un anticuerpo 100 en la superficie 102. El analito 104 presente en una muestra se une al anticuerpo 100. Un anticuerpo de detección 106 se une al analito y un anticuerpo secundario ligado a enzima 108 se une al anticuerpo de detección 106. El sustrato 110 interactúa con el anticuerpo secundario ligado a enzima 108 para proporcionar una señal detectable 112

La Figura 9 ilustra las diferentes etapas de un ELISA en más detalle. Normalmente, el tiempo total tomado para un ELISA está en el intervalo de 3-48 horas.

La Figura 10 ilustra las etapas de un inmunoensayo llevado a cabo en un orificio capilar.

Los inventores han comprendido que un inconveniente para usar inmunoensayos conocidos basados en capilares se relaciona con la interrogación óptica del orificio capilar. Esto se ilustra en la Figura 11A-D. Las Figuras 11A y 11B muestran un dispositivo capilar típico formado a partir de sílice condensada. Una muestra de fluido acuoso (agua en este caso) está situada en el orificio capilar. Tal como se muestra en la Figura 11A, la refracción de la luz que transita por el dispositivo se produce en la interfaz entre el aire y el cuerpo del dispositivo y también en la interfaz entre el cuerpo del dispositivo y la muestra de fluido en el orificio. Esto es debido a cambios en el índice de refracción en estas interfaces. El índice de refracción del aire es de 1,0, el índice de refracción del agua es 1,33 y el índice de refracción de sílice condensada es 1,46.

Sin embargo, como se muestra en las Figuras 11C y 11D, El efecto de la refracción en la interfaz entre el cuerpo del

dispositivo y el orificio puede reducirse o incluso evitarse formando el cuerpo del dispositivo usando un material que tenga un índice de refracción cercano o igual al de la muestra de fluido (en este caso agua). Los materiales adecuados incluyen Etileno-polipropileno fluorado (FEP) con un índice de refracción de 1,34; Tetrafluoroetileno/hexafluoro-propileno/fluoruro de vinilideno (THV) con un índice de refracción de 1,35; Perfluoroalcoxi (PFA) con un índice de refracción de 1,34; Etileno-Tetrafluoroetileno (ETFE) con un índice de refracción de 1,40; y Poli(clorotrifluoroetileno) (PCTFE) con un índice de refracción de 1,39.

El Etileno-propileno fluorado (FEP) se considera particularmente adecuado para aplicaciones de inmunoensayos porque es hidrófobo. Es, por tanto, eficaz para adsorber proteínas en las paredes de los capilares. Sin embargo, no es esencial que el material sea hidrófobo. Como el experto en la materia entenderá, pueden hacerse muchos tipos diferentes de modificaciones superficiales para inmovilizar anticuerpos.

Además, los presentes inventores se han dado cuenta que se puede llevar a cabo un inmunoensayo en uno o más orificios capilares de una película microcapilar extruida (MCF). El inmunoensayo puede multiplexarse, usando los distintos orificios capilares disponibles en las MCF.

Puede usarse una MCF para formar la base de una nueva plataforma (en el presente documento se denomina InmunoEnsayo de Matriz Extruida, IEME) para IE, proporcionando un método simple y rentable para IE multiplexados usando una única conexión de muestra. Los aspectos clave de las realizaciones preferentes de esta invención implican:

1. Recubrir cada microcapilar individual con un antígeno específico o anticuerpo de captura. Esto puede hacerse pasando soluciones apropiadas hacia abajo a canales respectivos de una MCF que pueden tener una longitud de varios metros. De este modo, donde la MCF tiene 20 orificios capilares, 20 recubrimientos diferentes se aplican a una MCF de 20 canales.
2. La MCF puede entonces cortarse a longitudes de, por ejemplo, 1 cm. Cada longitud puede entonces encajarse en un tubo de succión simple. Esto representa una ruta de fabricación muy efectiva para cada comprobador de lote.
3. La operación se efectúa extruyendo el fluido de muestra al interior de los canales de la MCF y luego siguiendo el contraste de color para cada canal individual de MCF.
4. La detección puede ser visual o automática con el fin de hacer una medición cuantitativa.

El FEP MCF Extruido está disponible en Lamina Dielectrics, Ltd., Daux Road, Billingshurst, West Sussex RH14 9SJ, Reino Unido.

Las Figuras 12-14 ilustran un método para fabricar un dispositivo de inmunoensayo de acuerdo con una realización de la presente invención.

En la Fig. 12, se proporciona una longitud de la película microcapilar 200 sobre una bobina 202. La película se fabrica a partir de FEP, como se ha expuesto anteriormente. La longitud total de la película microcapilar puede ser, por ejemplo, de al menos 1 m. También pueden fabricarse longitudes más largas, por ejemplo, de hasta 10 m, 20 m o más largas mediante el proceso de extrusión expuesto anteriormente.

Posteriormente, es posible cargar cada microcapilar con un antígeno o anticuerpo de captura. Esto puede efectuarse, por ejemplo, usando una jeringa y una aguja. Esta es la ruta preferente cuando se ha de cargar cada microcapilar con un antígeno o anticuerpo de captura diferente o con una concentración diferente de tales especies. Como se explica con más detalle a continuación, los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, la uniformidad de la adsorción del antígeno o anticuerpo de captura a lo largo de la longitud de los microcapilares es muy alta. De manera conveniente, la etapa de carga puede llevarse a cabo mientras la MCF permanece en una bobina. Cuando se quiere cargar cada microcapilar de manera idéntica, esto puede efectuarse mojando un extremo de la MCF en una única solución de carga, aspirándose esta solución de carga en cada orificio microcapilar usando un único aspirador (no mostrado) en el extremo opuesto de la MCF. Cuando se quiere cargar uno o más microcapilares de manera diferente, los microcapilares pueden separarse en un extremo de la MCF, bien en microcapilares individuales o en conjuntos de microcapilares. La separación puede obtenerse cortando la película entre los capilares. El separar los microcapilares de esta forma, facilita el contacto con cada microcapilar o conjunto de microcapilares, con una solución de carga diferente. Esto resulta útil cuando cada microcapilar o conjunto de microcapilares se ha de cargar de manera diferente. La solución de carga puede aspirarse en cada orificio microcapilar o conjunto de orificios microcapilares, usando un único aspirador. Como alternativa, puede usarse un aspirador separado para cada capilar o conjunto de capilares. El aspirador puede, por ejemplo, ser una pipeta o una jeringa.

Como se muestra en la Figura 12, a cada capilar se le designa con una letra A-J. En este caso, se cargan diferentes orificios microcapilares con diferentes antígenos o anticuerpos de captura.

Posteriormente, el microcapilar cargado se corta a la longitud deseada (por ejemplo, 5-50 mm), como se muestra en la Figura 13, para formar un dispositivo 204 de inmunoensayo. Como se entenderá, la larga bobina de MCF puede usarse para formar muchos dispositivos de inmunoensayo. Por lo tanto, solo se requiere una única etapa de carga, aunque se producen muchos dispositivos de inmunoensayo.

A continuación, como se muestra en la Figura 14, el dispositivo 204 de inmunoensayo puede usarse para llevar a cabo un inmunoensayo. Un extremo del dispositivo está conectado a un adaptador 206. En este ejemplo, el adaptador 206 tiene una estructura simple, sellándose al dispositivo por un extremo y proporcionando un orificio 208 en su extremo opuesto. El orificio 208 permite sellarse con un aspirador, mostrado en este caso como un pipeteador 210 convencional de laboratorio. Cuando el extremo libre del dispositivo 204 se moja en una muestra de fluido, el accionamiento del pipeteador aspira el fluido a lo largo de los orificios. Las etapas posteriores (por ejemplo, las indicadas en las Figuras 9 y 10) pueden llevarse a cabo de manera similar.

Otro método de fabricación de un dispositivo de inmunoensayo de acuerdo con una realización de la presente invención, se muestra en las Figuras 38-40. La Figura 38 es idéntica a la Figura 12 que ya se ha descrito anteriormente. Como antes, la película microcapilar cargada se corta a la longitud deseada (por ejemplo, 5-50 mm), para formar un dispositivo 204 de inmunoensayo (Fig. 39). En la Fig. 39, los microcapilares se separan además en un extremo. La separación puede obtenerse cortando la película entre los capilares. Esto facilita, por ejemplo, la carga de los microcapilares con diferentes muestras. La carga de muestras puede, por ejemplo, hacerse poniendo en contacto cada microcapilar o conjunto de microcapilares con una bandeja de muestras diferente (Figura 40). Esto resulta útil cuando cada microcapilar o conjunto de microcapilares se ha de usar para analizar diferentes muestras o la misma muestra pero a diferentes niveles de dilución. La muestra de fluido puede aspirarse en cada orificio de microcapilar usando un único aspirador. Como alternativa, puede usarse un aspirador separado para cada capilar o conjunto de capilares. El aspirador puede, por ejemplo, ser una pipeta o una jeringa. En la Fig. 40, el dispositivo 204 de inmunoensayo está conectado a un adaptador 206. En este ejemplo, el adaptador 206 sella el dispositivo por un extremo y proporciona un orificio 208 en su extremo opuesto. El orificio 208 permite sellarse con un aspirador, mostrado en este caso como un pipeteador 210 convencional de laboratorio. Cuando los extremos libres del dispositivo 204 se mojan en las muestras de fluido provistas en diferentes bandejas, el accionamiento del pipeteador aspira el fluido a lo largo de los orificios. Las etapas posteriores se llevan a cabo como se ha descrito anteriormente.

La Figura 15 muestra una vista más detallada de parte del dispositivo 204 de inmunoensayo en la película microcapilar cargada. La Figura 16 muestra una vista a lo largo de la sección A-A y la Figura 17 muestra una vista a lo largo de la sección B-B en la Figura 15. Como puede observarse en estos dibujos, el dispositivo 204 tiene una superficie inferior plana y una superficie superior plana. Estas superficies se corresponden con la medición de la primera superficie y la medición de la segunda superficie, ya que durante la interrogación óptica, la luz se transmite hacia y desde los orificios capilares a través de estas superficies.

Como se muestra en la Figura 15, los orificios microcapilares 220 individuales tienen una forma general oval. La matriz 222 de plástico del dispositivo se forma de FEP y es transparente a la luz visible.

La anchura del dispositivo está en el intervalo de 5-20 mm. El espesor del dispositivo (incluyendo los orificios microcapilares 220) está en el intervalo de 0,2-2 mm.

La Figura 16 ilustra que cada orificio capilar puede tener una carga diferente de antígeno o anticuerpo de captura. Como se muestra, en la Figura 16, se prefiere formar un capilar de referencia que no tenga carga.

Se prefiere que las superficies superior 224 e inferior 226 de la MCF (véase la Figura 17) sean sustancialmente planas. La razón de esto es que una superficie plana, normal a la dirección de luz transmitida durante la interrogación del dispositivo de inmunoensayo, normalmente producirá mínimos efectos ópticos desventajosos (o incluso cero).

La Figura 18 muestra el ensamblaje de un sistema de inmunoensayo de acuerdo con una realización preferente de la presente invención. El sistema tiene tres componentes principales: un casete 250, una bandeja de muestras 252 y un soporte del casete 254. El casete 250 y la bandeja de muestras 252 se muestran con más detalle en las Figuras 19 y 20.

Como se muestra en la Figura 19, hay varios (ocho, en este ejemplo) dispositivos 204 de inmunoensayo de MCF contenidos en el casete 250. Los extremos libres de los dispositivos de inmunoensayo se extienden desde la parte inferior del casete para mojarse en pocillos 256 de la bandeja de muestras. Los extremos superiores de los dispositivos de inmunoensayo están contenidos en el casete de manera que los orificios capilares estén en comunicación sellada con un colector 258 de flujo de fluido, llevando el colector 258 a un orificio de conexión 260 en la parte superior del casete, para su conexión con un dispositivo aspirador. Como se muestra en la Figura 20, el sellado entre los dispositivos de inmunoensayo y el colector está provisto mediante un sellador 264.

Para efectuar un IEME, por ejemplo, el usuario final procesa cada casete secuencialmente a lo largo de las diferentes filas de ranuras del soporte del casete, correspondiéndose las filas a una serie de etapas de lavado (posición 1), carga de muestras (posición 2) e incubación (posición 2b) (Figura 18). Cabe destacar que para la etapa de incubación, los extremos del dispositivo de inmunoensayo de MCF no se mojan en ningún pocillo de muestra. Las soluciones de muestras y anticuerpos pueden precargarse en la bandeja de muestras desechable para evitar una contaminación cruzada. Tras mojar los extremos del dispositivo de inmunoensayo de MCF en un conjunto dado de pocillos, se aspira el fluido de los pocillos a los orificios capilares usando un colector de flujo de fluido. No es necesario vaciar los orificios

capilares entre las diferentes etapas del ensayo, ya que el nuevo fluido que se aspira a los orificios capilares sustituye cualquier fluido ya presente.

5 El casete 250 incluye unas orejetas de guía 262 en el soporte para permitir situar el casete en cada una de las posiciones deseadas en el soporte del casete. El casete también tiene una ventana 266 para permitirle al usuario observar el progreso de cualquier cambio visual disponible en los dispositivos de inmunoensayo. Además, la ventana proporciona acceso óptico a los dispositivos de inmunoensayo durante la interrogación óptica, por ejemplo, usando una cámara digital o (más preferentemente) usando un escáner de cama plana. Esto se muestra en la Figura 21, escaneándose el casete 250 sobre un escáner de cama plana 270.

10 Al usar el escáner 270, la luz transmitida a través de cada dispositivo de inmunoensayo de MCF puede determinarse basándose en un análisis de píxeles de la imagen escaneada. El experto en la materia entenderá cómo esto puede hacerse usando un software estándar de tratamiento de imágenes.

15 La Figura 22 muestra una vista ampliada de una porción de un dispositivo 204 de inmunoensayo de MCF, tal como se ve a través de la ventana 266 del casete. En el proceso de escaneado, se toma la imagen de cada uno de los orificios capilares sustancialmente en las mismas condiciones. Además, las superficies planas superior e inferior del dispositivo de inmunoensayo y la pequeña diferencia (o nula) en el índice de refracción entre el material del dispositivo de inmunoensayo y el fluido contenido en el orificio garantiza que se pueda hacer una medición útil de la intensidad de pixel a través de toda (o al menos la mayor parte de) la anchura de cada orificio capilar.

20 Las Figuras 23A y 23B muestran gráficas esquemáticas de la intensidad de pixel a través de diferentes dispositivos de inmunoensayo en el mismo casete. Así pues, mediante esta simple técnica es posible hacer mediciones cuantitativas del inmunoensayo.

25 Las Figuras 24A-C muestran la evaluación de la inmovilización de proteínas y la detección de señal en una MCF-FEP. Los capilares de la bobina de 5 m de MCF-FEP se cubrieron de forma individual con las concentraciones indicadas de IgG o tampón control, seguido de un bloqueo y un lavado. Después, se cortaron piezas de 50 mm de largo, se unieron a un adaptador y se incubaron con HRP-anti-ratón (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante), seguido de un lavado y una captación del sustrato FDP. Después de 60 minutos, se crearon imágenes del FDP convertido a fluorescente usando microscopía confocal de barrido láser.

30 La Figura 24A muestra una representación esquemática del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima en la MCF-FEP. La Figura 24B muestra una gráfica de una intensidad fluorescente media a través de la matriz capilar. La concentración de IgG de ratón presente en cada capilar se indica debajo del gráfico.

35 La Figura 24C muestra una gráfica de la altura, h, de la intensidad fluorescente gris medida en la entrada y salida de una bobina de 5 metros de MCF, indicando la no eliminación del IgG después de pasarlos a través del capilar. Este resultado ilustra la sorprendente uniformidad de carga posible en el dispositivo de inmunoensayo, incluso cuando la carga se lleva a cabo en una sola etapa en una bobina de la película microcapilar extruida.

40 Las Figuras 24A-c muestran que las proteínas antigénicas o los anticuerpos pueden inmovilizarse de manera efectiva en la superficie interna de la matriz extruida de microcapilares. Estas figuras resumen la eficacia de la inmovilización de anticuerpos en la superficie interna de una FEP-MCF de 10 capilares. Se demuestran varios puntos para el uso de un sustrato fluorescente y microscopía confocal:

- La cantidad de proteína unida a la entrada y salida de una bobina de 5 m de longitud es la misma a lo largo del intervalo de aportación de concentraciones de proteína; esto demuestra la posibilidad de recubrimiento en una tira larga, seguido del corte de múltiples piezas para diferentes muestras.
- Las diferentes concentraciones de proteína de recubrimiento en capilares individuales lleva claramente a diferentes señales de respuesta, validando por lo tanto la plataforma para IE cuantitativos.

Las Figuras 25A y 25B muestran que la detección multi-análisis es posible usando la matriz de capilares extruida.

55 Se recubrieron los capilares en una bobina de MCF-FEP con 4 antígenos diferentes (A-D), a saber, tampón control (A), control positivo de IgG de ratón (B) o los antígenos péptido FLAG (C) o antígeno del núcleo de hepatitis B (D). El orden de estos recubrimientos se indica mediante la relevante letra A-D cerca del respectivo orificio capilar, mostrado en el lado izquierdo de la Figura 25A. Después del bloqueo y lavado, se cortaron piezas de 50 mm de largo, se unieron a un adaptador y se incubaron con 3 diferentes muestras de ensayo (1-3) que contienen los anticuerpos anti-HB/CaG o anti-FLAG o tampón control. Después de lavar, se incubaron las piezas anti-IgG de ratón-HRP seguido de un lavado exhaustivo y de la adición del sustrato FDP. Después de 5 minutos se crearon imágenes del sustrato convertido a fluorescente usando microscopía confocal de barrido láser. Se puntuó la presencia o ausencia de una señal fuerte como + para una señal positiva, - para una señal negativa, y +/- para un capilar con una señal intermedia; estas puntuaciones se indican junto a la clave que muestra qué antígenos se recubrieron en el capilar.

65 Así pues, se demuestra la capacidad para detectar más de un anticuerpo usando una única etapa de suministro de

muestra de fluido. Se inmovilizaron tres antígenos diferentes (más un control negativo) en diferentes capilares en un patrón definido. Cuando se ensayaron diferentes muestras que contenían diferentes antisueros en piezas MCF separadas, se obtuvo el patrón esperado de positivos y negativos.

- 5 La matriz de capilares extruida también se puede usar para realizar IE de tipo sándwich. Muchos IE se basan en un proceso de tipo sándwich. Por ejemplo, el biomarcador de cáncer antígeno específico de próstata (PSA) se mide frecuentemente en muestras biológicas tales como orina o sangre usando dos anticuerpos (un anticuerpo 'de captura' y un anticuerpo 'de detección') que se unen a dos epítomos distintos en la molécula de PSA. Para detectar el PSA usando un IE de tipo sándwich, el anticuerpo 'de captura' se inmoviliza en la superficie de ensayo. El anticuerpo de
- 10 captura se une a la proteína PSA presente en una muestra. El PSA capturado por el anticuerpo de captura se detecta usando un anticuerpo 'de detección', que está marcado con biotina. La cantidad de anticuerpo de detección unido se detecta después mediante incubación con una enzima conjugada con una molécula de unión a biotina tal como estreptavidina.
- 15 Se llevó a cabo un IE de tipo sándwich con PSA en MCF-FEP usando reactivos suministrados en forma de kit de R&D Systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos, n.º de catálogo DY1344). Se realizaron una serie de experimentos de optimización para determinar las concentraciones de reactivo y los tiempos de incubación más apropiados para realizar un IE de tipo "sándwich" para detectar el PSA en MCF-FEP. Estos experimentos demostraron lo siguiente:

- 20 1) Se descubrió que la concentración óptima de anticuerpo de captura para recubrir el interior de los capilares en MCF-FEP era 10 µg/ml, en contraste con la concentración óptima de 1 µg/ml para los ELISA de placa de microtitulación. Esto fue lo esperado debido a la diferencia en la relación de área superficial sobre volumen en capilares de MCF-FEP en comparación con las placas de microtitulación.
- 25 2) La concentración óptima de los anticuerpos de detección no fue significativamente diferente entre los capilares de MCF-FEP con respecto a las placas de microtitulación. Esto también fue lo esperado, ya que los anticuerpos de detección se usan a menudo en excesos significativos y por tanto la reducción de la concentración a menudo tiene poco efecto sobre la sensibilidad del ensayo.
- 30 3) La concentración óptima de sustrato de orto-fenilendiamina (OPD) fue más alta en MCF-FEP en comparación con las placas de microtitulación. De nuevo, esto fue lo esperado debido a la diferencia en la relación de área superficial sobre volumen en capilares de MCF-FEP en comparación con las placas de microtitulación.
- 35 4) Para una sensibilidad óptima, los tiempos de incubación de una muestra y de anticuerpos de detección se redujeron significativamente para IE llevados a cabo en MCF-FEP, en comparación con los tiempos de incubación mínimos requeridos por los ensayos de placa de microtitulación.
- 5) El reactivo y los volúmenes de lavado requeridos para ensayos realizados en MCF-FEP fueron de 2 a 4 veces más bajos que para el ensayo de placa de microtitulación.

- 40 Habiendo optimizado este protocolo de IE para MCF-FEP, se hizo una comparación entre el IE MCF-FEP optimizado con un IE en placa de microtitulación realizado de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante del kit. Para permitir la comparación directa de la señal de ensayo, se convirtió la señal de detección óptica del escáner de cama plana en una lectura de absorbancia y se normalizó a unidades de absorbancia por centímetro de longitud del
- 45 camino usando las ecuaciones 1 y 2:

$$Abs = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1)$$

$$Abs = \epsilon l [C] \quad (2)$$

- 50 Para el ensayo de placa de microtitulación, la longitud del camino es 0,3 cm, mientras que para la MCF es 0,02 cm.

La Figura 36 muestra la sensibilidad de los IE de tipo sándwich realizados en MC-FEP y las placas de microtitulación son comparables.

- 55 Una principal ventaja de los IE de tipo sándwich realizados en la matriz capilar extruida es el tiempo requerido para realizar el ensayo. Esto se representa en la Figura 37, que muestra los reducidos tiempos de incubación requeridos cuando se llevan a cabo inmunoensayos de tipo sándwich en MCF-FEP en contraste con los largos tiempos de incubación para los ensayos realizados en placas de microtitulación. Se espera que el requisito de tiempos de incubación reducidos se aplique a todos los tipos de IE realizados en la matriz capilar extruida en comparación con los IE realizados en placas de microtitulación. Las matrices capilares extruidas descritas en el presente documento son,

por lo tanto, adecuadas para realizar ensayos de alto rendimiento.

La Figura 26 muestra una vista esquemática de una sección transversal del formato de un dispositivo de inmunoensayo usado para obtener los resultados mostrados en la Figura 27.

La Figura 27 muestra imágenes obtenidas de un escáner de cama plana. Dos piezas cortas de MCF-FEP se lavaron en una solución de PBS- Tween y luego se llenaron todos los capilares con una solución de PBS-T o un sustrato totalmente convertido de diclorhidrato de orto-fenilendiamina (OPD) y después se escanearon a 3.200 dpi usando un modo de luz transmitida en un escáner fotográfico HP ScanJet 4050. Se muestran gráficos promediados de la intensidad de píxel a través de la película o del capilar, junto con una barra de escala. El canal azul también se muestra por separado para ilustrar la elevada absorbancia de luz azul por el OPD convertido; de nuevo, se muestra la intensidad de píxel promediada.

Así pues, se puede hacer individualmente una interrogación cruzada de los capilares usando detectores ópticos económicos.

Cabe destacar que al obtener los resultados mostrados en la Figura 27, se succionaron dos soluciones a través de los 10 capilares en dos piezas de MCF y luego se adquirió una imagen RGB y se grabó en formato TIF. La imagen se dividió posteriormente en los tres canales RGB (es decir, Rojo, Verde y Azul) y se representó la intensidad de gris para obtener la distancia y de la película, usando ImageJ. Las imágenes se escanearon usando un simple escáner de cama plana en modo de transmitancia. Este es un método sencillo y barato de detección óptica y formación de imágenes, sin embargo, se puede esperar la misma detección de señal para cualquier otra técnica óptica. Este medio de detección y cuantificación de señal es factible debido a la superficie plana de la MCF y a las excelentes propiedades ópticas del material de fluoropolímero usado para la extrusión de la MCF (que tiene un índice de refracción similar al del agua, por lo tanto los capilares de MCF rellenos de agua son "invisibles"). Esto queda además avalado por las siguientes Figuras 28 y 29.

Las excelentes propiedades ópticas de la MCF-FEP rellena con líquidos acuosos y los beneficios de la misma para una simple detección de señal quedan demostradas por el amplio intervalo de diferentes dispositivos de formación de imágenes que pueden usarse para interrogar la MCF- FEP. Además del microscopio confocal usado para detectar un sustrato fluorescente (por ejemplo, figuras 24 y 25) y del escáner de cama plana HP Scanjet G4050 que se usó en modo de transmitancia utilizando una luz fluorescente de cátodo frío y un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) de adquisición de imágenes para medir un sustrato ELISA y colorante azul dentro de la FEP MCF (por ejemplo, figuras 26-34), se descubrió que también los siguientes dispositivos de formación de imágenes eran eficaces para formar imágenes de MCF-FEP y medir señales ópticas:

1) Un escáner de cama plana que opera en modo de reflectancia (en oposición al de transmitancia). La absorbancia del sustrato de OPD convertido se midió en modo de reflectancia y transmitancia en un escáner de cama plana HP Scanjet G4050 y se observó una absorbancia similar en cualquiera de los modos. La expresión "interrogación óptica" tal y como se usa en el presente documento, engloba cualquier tipo de interrogación óptica, ya se haya llevado a cabo en modo de transmitancia o en reflectancia.

2) Un escáner de cama plana compacto y portátil. Un escáner de cama plana (Canon LiDE modelo 700F) compacto y portátil, alimentado por USB, iluminado por un Diodo Emisor de Luz (LED) con detector de sensor de imagen por contacto (CIS), que opera en modo de transmitancia fue igualmente sensible que el HP Scanjet G4050 en la medición del sustrato de OPD.

3) Una cámara digital compacta. Se usó una cámara digital compacta de 12 megapíxeles, Konica Minolta, para tomar fotografías del agua comparada con una solución acuosa naranja de yodo. Mientras que la MCF-FEP rellena con agua no mostró cambio alguno en intensidad de píxel a través de la película, la solución naranja de yodo mostró una alta absorbancia en el canal azul. Sin personalizar una cámara digital compacta para optimizar una detección, un anti antígeno del núcleo de la hepatitis B, tan minúsculo como 2 ng/ml, pudo detectarse simplemente fotografiando la MCF-FEP después de la incubación del sustrato, usando una protocolo de ELISA estándar directo; la sensibilidad usando una cámara digital compacta no optimizada fue tan solo 5 veces menor que cuando se usó un escáner de cama plana en modo de transmitancia.

4) Se descubrió que un LED de un único color era una fuente de luz eficaz para medir la absorbancia de sustancias coloreadas en soluciones acuosas. Se observó una señal óptica más fuerte usando una cámara digital compacta para tomar imágenes de una MCF-FEP rellena con una solución coloreada de naranja con respecto a agua, cuando la MCF-FEP estaba iluminada con una fuente de luz que comprendía un LED azul que emitía una estrecha banda de longitudes de onda de luz azul.

5) Una cámara integrada en un teléfono inteligente (teléfono móvil manual con cámara y ordenador integrados). Se pudieron detectar anticuerpos contra antígenos del núcleo de la hepatitis B y cuantificarse simplemente fotografiando las tiras de análisis de MCF-FEP con una cámara digital integrada en un móvil inteligente después de la incubación del sustrato usando un protocolo de ELISA estándar directo.

6) Un dispositivo portátil que comprende un LED más una matriz fotodetectora.

5 La Figura 28 muestra la detección de la señal en las MCF extruidas usando otros materiales termoplásticos. Se ensayaron las propiedades ópticas de MCF extruidas a partir de materiales termoplásticos alternativos, usando el mismo procedimiento que se ha indicado antes. Como se muestra en la Figura 28, se muestran distorsiones ópticas en las imágenes y estas afectan en gran medida a la señal obtenida mediante el tratamiento de imágenes. Se considera que esto es debido a la diferencia relativamente grande en el índice de refracción de estos materiales alternativos comparados con agua. Así pues, estas distorsiones ópticas limitan el uso de estos materiales para cuantificar la señal de color generada. Los materiales ensayados fueron (Figuras 28(a)-(e): (a) MCF-EVA, (b) MCF-EVOH, (c) MCF-LV-LLDPE, (d) (c) MCF-COC, (e) MCF-HV-LLDPE. La tabla 1 muestra la geometría de MCF testadas.

Tabla 1. Ensayo de MCF extruidas a partir de diferentes materiales termoplásticos

Referencia MCF	Material de la realización	Diámetro interno promedio del capilar (µm)	N.º de capilares	Índice de refracción
MCF-FEP	Etileno-propileno fluorado (FEP)	206	10	1,34
MCF-EVA	Acetato de etilenvinilo (EVA),	142	19	1,48
MCF-EVOH	Etilen-vinil-alcohol (EVOH),	109	19	1,51-1,52
MCF-LV-LLDPE	Polietileno lineal de baja densidad (LLDPE),	167	19	1,51
MCF-COC	Copolímero de olefina cíclica (COC)	119	19	1,53
MCF-HV-LLDPE	Polietileno lineal de baja densidad (LLDPE),	200	17	1,51

15 Como se muestra en la Figura 28, se observaron MCF extruidas de diferentes materiales termoplásticos con un índice de refracción significativamente diferente al del agua, una elevada distorsión y ruido de fondo, lo que por lo tanto impedía el uso de las MCF para IE cuantitativos.

20 La Figura 29 muestra los resultados obtenidos usando cuerpos capilares FEP circulares de un solo orificio. Esto muestra que el uso de cuerpos con una geometría plana proporciona una mejor detección de señales debido a que se evitan las distorsiones ópticas. Este es particularmente el caso si se desea proporcionar una interrogación cruzada directa de diferentes capilares.

La geometría de los capilares FEP ensayados en la Figura 29 se muestra en la Tabla 2.

25

Tabla 2. Geometría de los capilares FEP ensayados en la Figura 29

Capilar	Material	D.O. (mm)	D.I. (mm)
FEP1-32x0,016	FEP	0,794	0,406
FEP1-16x0,008	FEP	1,59	0,203

30 La detección de señales en estos capilares FEP circulares se ensayó usando el mismo procedimiento mencionado anteriormente para la Figura 27. Se ensayaron capilares de dos D.O./D.I. diferentes. Las elevadas relaciones de ruido sobre señal significan que la geometría circular de los capilares no es adecuada para la detección de señales de una interrogación cruzada directa del capilar, soportando por lo tanto, el uso extensivo en la literatura de láseres de gran potencia para medir luz evanescente en inmunoensayos capilares.

35 Cuando se escanean capilares FEP circulares individuales, se producen dos problemas. Para un capilar fino con una pared fina la difracción que se produce en los lados del capilar da un ruido alto, que enmascara la señal debido al color de la solución en el capilar. Por otra parte, para un capilar de paredes gruesas, la difracción en los lados del cuerpo del capilar supone un menor problema, sin embargo, la absorbancia del plástico da un elevado ruido de fondo que enmascara la señal.

40 Así pues, la realización preferente de la presente invención (película microcapilar extruida formada a partir de FEP) produce unas relaciones muy superiores de señal sobre ruido que los capilares FEP circulares por dos motivos:

(a) Aunque hay difracción y distorsión óptica que da un elevado ruido de fondo en el borde de la película (relacionado con los bordes redondeados de la MCF), los 8 capilares del medio no están afectados por esta señal

de borde.

(b) Las finas paredes plásticas no ofrecen una absorbancia de fondo que permita la detección de bajas concentraciones de colorante de absorción.

5 Las Figuras 30A, 30B, 31 y 32 demuestran la sensibilidad de la realización preferente de la presente invención en comparación con una placa de microtitulación para un ensayo de detección de Hepatitis B.

10 Todos los capilares dentro de una longitud de 2 m de MCF-FEP se revistieron con antígeno del Núcleo de la Hepatitis B, seguido de un bloqueo, lavado y cortado en piezas de 50 mm. Cada pieza se fijó a un conector individual y luego se aspiraron concentraciones crecientes de monoclonal anti-HB-CAG a través de los 10 capilares en cada pieza diferente, seguido de la detección con anti-IgG de ratón-HRP, un lavado exhaustivo y rellenar con sustrato OPD. Después de 40 minutos, las piezas de película se escanearon con un Foto escáner HP ScanJet 4050 en modo de transmitancia.

15 La Figura 30A muestra una representación esquemática del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima realizado en la MCF-FEP.

20 La Figura 30B muestra los resultados obtenidos por las secciones escaneadas de MCF-FEP para cada muestra analizada. Las imágenes en bruto RGB se dividieron entre los canales rojo, verde y azul. Se observó una fuerte absorción de luz para el OPD convertido en el canal azul. Para el canal azul, se muestra un gráfico de intensidad de pixel para una única línea a través de la película, para su comparación con el gráfico promediado (panel inferior). Por cada RGB o canal de color se muestra también un gráfico de la intensidad de pixel promediada a través de la película, tal y como se ha determinado con ImageJ.

25 Se midieron las intensidades de los picos de absorbancia azul individuales para los 8 capilares del medio que se ven en parte en la Figura 30B. La Figura 31 muestra un gráfico de la intensidad media de pico para todas las muestras con respecto a la concentración de anti-HB-CAG. Se muestran todas las barras de error e indican una desviación típica +/- 1.

30 Usando el mismo antígeno, anticuerpos y sustrato, se llevó a cabo un ELISA en una placa de inmunoensayo de microtitulación de 96 pocillos. La densidad óptica (D.O., solo para la Figura 32) o la absorbancia obtenida del ensayo de micropocillos con un lector de microtitulación se representó con respecto a la concentración y estos valores se compararon con la respuesta del escáner para el mismo intervalo de concentraciones de anti-HB-CAG medidas en la Figura 31.

35 Estos resultados muestran que la sensibilidad de un inmunoensayo en una MCF-FEP es idéntica a un ELISA convencional en placa de microtitulación, a pesar de los diferentes volúmenes, áreas superficiales, métodos de procesamiento, material plástico y método de detección.

40 La Figura 33 muestra que el escaneado de secciones de MCF-FEP rellenas de diferentes soluciones de agua-glicerol da un índice de refracción diferente para el fluido en el intervalo de 1,33 a 1,47. El índice de refracción de MCF-FEP es 1,34 como se resume en la Tabla 1. Los pares de imágenes se corresponden a mezclas de agua-glicerol sin colorante (izquierda) y coloreadas de azul (derecha). Cada una de las soluciones coloreadas de azul incluye concentraciones idénticas de colorante azul. Los gráficos de los perfiles muestran la variación de la intensidad de pixel promediada a través de las secciones de MCF-FEP.

45 La Figura 34 muestra secciones escaneadas de MCF-EVA rellenas con 0 % en peso y 100 % en peso de agua-glicerol que da un índice de refracción de 1,33 y 1,47, respectivamente, para el fluido. El índice de refracción de MCF-EVA es 1,48 como se resume en la Tabla 1. Los pares de la imagen se corresponden a mezclas de agua-glicerol sin colorante y coloreadas de azul. Los gráficos de los perfiles muestran la variación de la intensidad de pixel promediada a través de las secciones de MCF-FEP. Cabe destacar en este caso, que el EVA tiene propiedades de transmisión de luz relativamente pobres en comparación con el FEP. Por este motivo, las imágenes de la Figura 34 no muestran un fuerte contraste entre el EVA y el fluido coloreado de azul.

50 La Figura 35A resume la variación de la altura de pico media tal y como se ha determinado a partir de los gráficos de los perfiles de las Figuras 33 y 34 para las mezclas de agua-glicerol sin colorante (ruido) y las coloreadas de azul (señal) en MCF-FEP y MCF-EVA a un índice de refracción creciente del fluido.

55 La Figura 35B resume la variación de la relación de señal media sobre ruido en MCF-FEP y MCF-EVA a un creciente índice de refracción de mezclas de agua y glicerol.

60 Se considera que la elevada relación de superficie sobre volumen (A/V) que presentan capilares individuales en una MCF (hasta 2 órdenes mayores de magnitud en comparación con la de un micropocillo) permite obtener los resultados divulgados anteriormente para IE heterogéneos. La elevada relación A/V de los capilares permite un ahorro significativo en reactivos y en tiempo para llevar a cabo un IE, debido a las menores escalas de volumen y longitud para difusión molecular en los capilares.

65 Los IEME, tal como se describen en el presente documento, son útiles para muchas aplicaciones diferentes,

incluyendo el cuidado de la salud, el procesado de alimentos, el control químico y ambiental y los laboratorios de investigación. En particular, la principal aplicación para los IEME es como herramientas para su uso en el diagnóstico de enfermedades, por ejemplo en la detección de marcadores de enfermedad, tales como biomarcadores de cardiopatías o cáncer y patógenos. La simplicidad de los sistemas desvelados en el presente documento y el requerimiento de solo volúmenes bajos de reactivos y muestra de fluido, los hace particularmente útiles para los diagnósticos en los países del tercer mundo y para su uso en laboratorios de investigación.

Las realizaciones preferentes de la invención se han descrito a modo de ejemplo. Las modificaciones de estas realizaciones, las realizaciones adicionales y las modificaciones de las mismas serán evidentes para el experto en la materia al leer esta divulgación y, como tales, están dentro del alcance de la presente invención.

Referencias

Zick et al., Capillary Radioimmunoassay for Insulin, *Eur. J. Nucl. Med.* 5, (1980) 423-425.

Healey et al., A rapid semi quantitative capillary enzyme immunoassay for digoxin, *Clinica Chimica Acta*, 134 (1983) 51-58.

Hemmil, Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays, *Clin chem.* 31/3 (1985) 359-370.

Nagainis et al., A rapid quantitative capillary tube enzyme immunoassay for human chorionic gonadotropin in urine, *Clinica Chimica Acta* 160 (1986) 273-219.

Shekarch et al., Capillary Enzyme Immunoassay for Rapid Detection of Herpes Simplex Virus in Clinical Specimens, *Journal of clinical microbiology* (1987) 320-322.

Misiakos & Kakabakos, A multi-band capillary immunosensor, *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1998) 825-830.

Rose et al., GDH biosensor based off-line capillary immunoassay for alkylphenols and their ethoxylates, *Biosensors and Bioelectronics* 17 (2002) 1033-1043.

Mastichiadis et al., Simultaneous Determination of Pesticides Using a Four-Band Disposable Optical Capillary Immunosensor, *Anal. Chem.* (2002) 74 (23) 6064-6072.

Petrou et al., Multi-analyte capillary immunosensor for the determination of hormones in human serum samples, *Biosensors & Bioelectronics* 17 (2002) 261-268.

Bange et al., Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2488-2503

Lionello et al., Protein adsorption in static microsystems: effect of the surface to volume ratio, *Lab Chip* (2005) 5, 254-260.

Herrmann et al., Enzymatically-generated fluorescent detection in micro-channels with internal magnetic mixing for the development of parallel microfluidic ELISA, *Lab Chip* (2006) 6, 555-560.

Yager et al., Microfluidic diagnostic technologies for global public health, *Nature*, 442(27) (2006)

Yacoub-George et al., Automated 10-channel capillary chip immunodetector for biological agents detection, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1368-1375.

Henares et al., Multiple enzyme linked immunosorbent assay system on a capillary-assembled microchip integrating valving and immuno-reaction functions, *Analytica Chimica Acta* 589 (2007) 173-179.

Mastichiadis et al., Capillary-based immunoassays, immunosensors and DNA sensors - steps towards integration and multi-analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 27, No. 9, (2008).

Schroeder et al., User Configurable Microfluidic Device for Multiplexed Immunoassays Based on DNA-Directed Assembly, *Anal. Chem.* (2009) 81 (3) 1275-1279.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para llevar a cabo un inmunoensayo, teniendo el dispositivo:

5 un cuerpo unitario con una superficie exterior, y
al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo unitario, en donde para cada
orificio capilar una población de primeros miembros de un respectivo par de unión específica está inmovilizada al
menos en una porción de la superficie del orificio capilar, siendo cada primer miembro capaz de unirse
específicamente a un segundo miembro del respectivo par de unión específica,

10 en el que el cuerpo unitario es sustancialmente transparente a luz visible para permitir la interrogación óptica de los
orificios capilares, y en donde el dispositivo está formado por un material que tiene un índice de refracción que está en
el intervalo de 1,26 a 1,40 y está dentro de más o menos 0,07 del índice de refracción de la muestra de fluido,
midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm.

15 2. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el orificio capilar tiene un diámetro interno de al menos 10
µm y como máximo de 1 mm.

20 3. Un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que un orificio capilar en el dispositivo tiene una
superficie tratada de forma diferente de al menos otro orificio capilar en el dispositivo, proporcionando la diferencia en
el tratamiento de la superficie una diferencia medible en la realización del inmunoensayo entre los orificios.

25 4. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 3,
en el que dicho un orificio tiene una concentración diferente de primeros miembros adsorbidos a su superficie en
comparación con dicho al menos un otro orificio; o
en el que dicho un orificio tiene unos primeros miembros de un diferente par de unión específica adsorbidos a su
superficie en comparación con dicho al menos un otro orificio.

30 5. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1,
en el que dos o más orificios capilares tienen superficies tratadas de manera idéntica, con el fin de proporcionar
redundancia de medición en el dispositivo; o
en el que dos o más orificios capilares tienen superficies tratadas de manera idéntica y uno u otros orificios más en el
mismo dispositivo tienen una superficie tratada de manera diferente.

35 6. Un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la superficie exterior del cuerpo
incluye una primera superficie de medición y una segunda superficie de medición, de manera que, en uso, la luz se
transmite a través del dispositivo desde la primera superficie de medición a la segunda superficie de medición, al
menos una (y preferentemente ambas) de la primera superficie de medición y la segunda superficie de medición se
extiende sustancialmente paralela a los ejes principales de los dos o más orificios capilares.

40 7. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la primera superficie de medición y la segunda superficie
de medición son sustancialmente planares.

45 8. Un sistema de inmunoensayo para llevar a cabo inmunoensayos, teniendo el sistema una pluralidad de dispositivos
de inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un soporte para mantener la pluralidad
de dispositivos de inmunoensayo.

50 9. Un sistema de inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el soporte está adaptado para mantener
los dispositivos de inmunoensayo en una matriz sustancialmente planar.

10. Un sistema de inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en el que el soporte
proporciona medios de observación para permitir la observación de al menos una parte de cada dispositivo de
inmunoensayo.

55 11. Un sistema de inmunoensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que el soporte
proporciona medios para aspirar el fluido a través de los orificios capilares de los dispositivos de inmunoensayo, y en el
que el sistema de inmunoensayo además incluye de manera opcional una bandeja que tiene una disposición de los
pocillos adaptada para recibir reactivos, muestras de fluido u otros líquidos requeridos para el inmunoensayo, estando
la bandeja adaptada para recibir al menos un extremo de cada dispositivo de inmunoensayo cuando los dispositivos de
60 inmunoensayo se mantienen en el soporte.

12. Un método para realizar un inmunoensayo para detectar la presencia o la ausencia del segundo miembro de unión
en una muestra de fluido usando un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
incluyendo el método las etapas:

65 proporcionar una muestra de fluido en los orificios capilares del dispositivo; e

interrogar ópticamente los orificios capilares.

13. Un método para fabricar un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, incluyendo el método:

5 proporcionar un cuerpo extruido que tiene al menos dos orificios capilares que se extienden internamente a lo largo del cuerpo, en donde el cuerpo está formado de un material que tiene un índice de refracción en el intervalo de 1,26 a 1,40, midiéndose el índice de refracción a 20 °C con una luz de longitud de onda de 589 nm; e
10 insertar una respectiva carga de fluido en cada orificio capilar del cuerpo extruido, comprendiendo cada carga de fluido dichos primeros miembros del respectivo par de unión específica, para inmovilizar los primeros miembros de al menos una porción de la superficie del orificio capilar y formar un cuerpo extruido cargado.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13,

15 en donde el método además incluye la etapa de cortar el cuerpo extruido cargado para formar el dispositivo para un inmunoensayo de una longitud requerida, en donde el cuerpo extruido cargado, antes de cortarlo, opcionalmente tiene una longitud de al menos 20 cm; o

20 en donde el método es un método para fabricar un conjunto de n dispositivos, incluyendo el método además cortar el cuerpo extruido cargado para formar el conjunto de n dispositivos, teniendo cada dispositivo una longitud de al menos X, en donde el cuerpo extruido cargado, antes de cortarlo, tiene una longitud de al menos nX, o una longitud de al menos 20 cm.

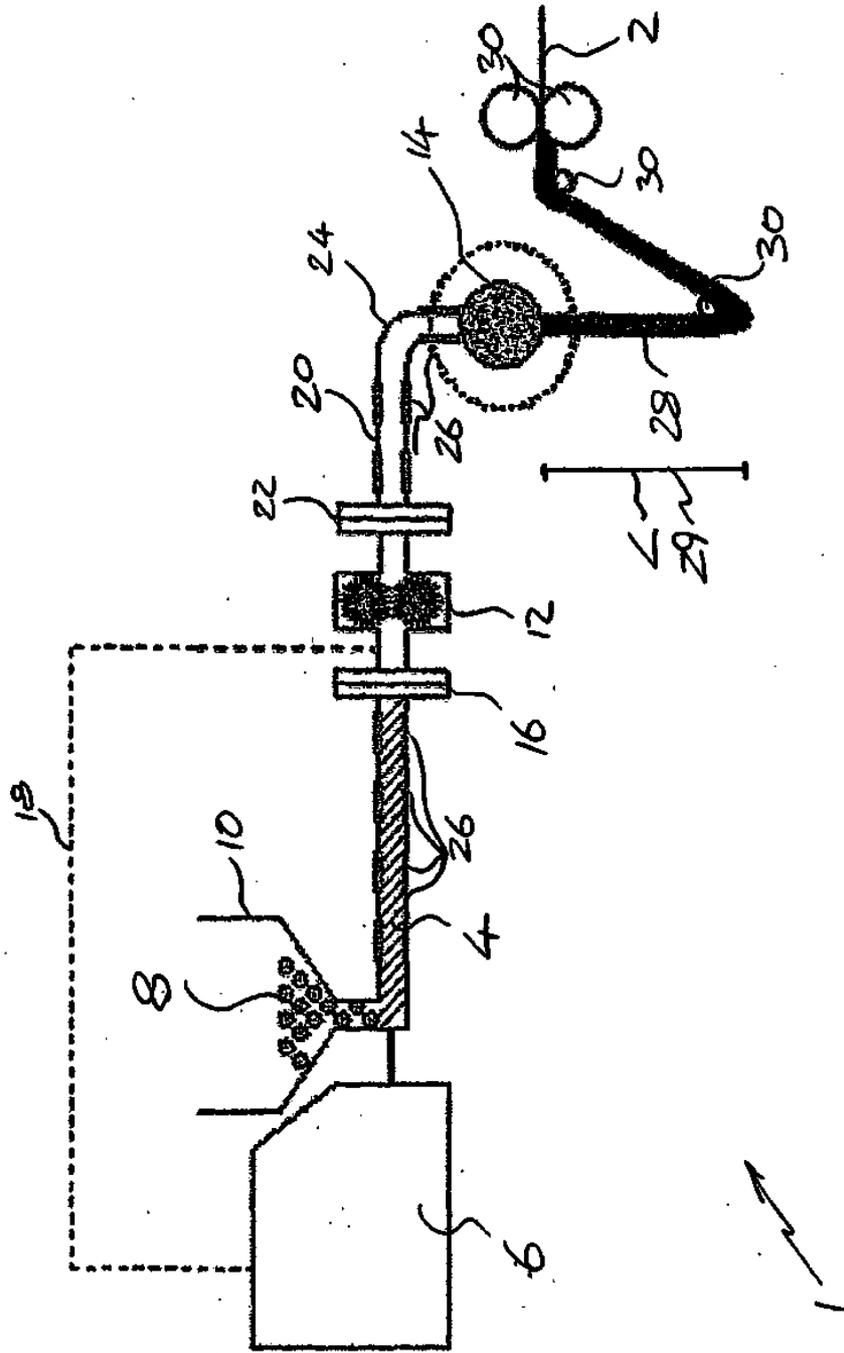


Fig. 1

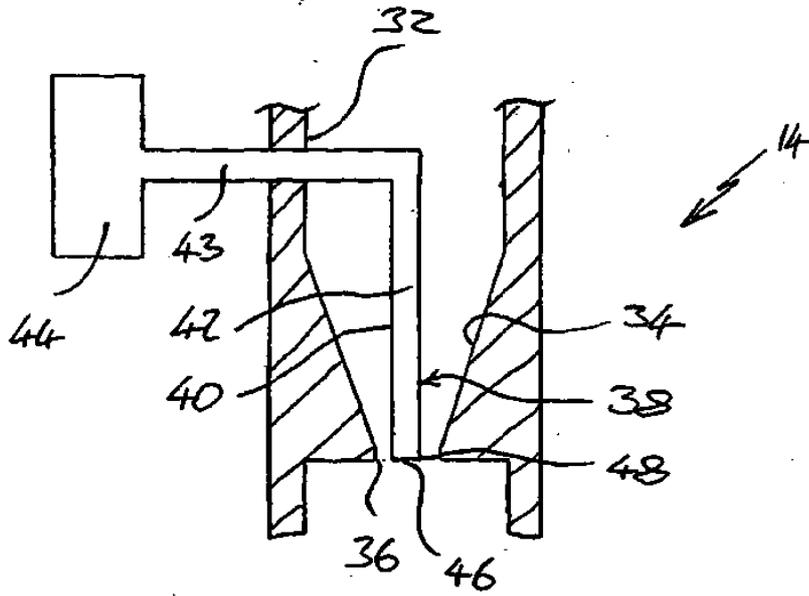


Fig. 2

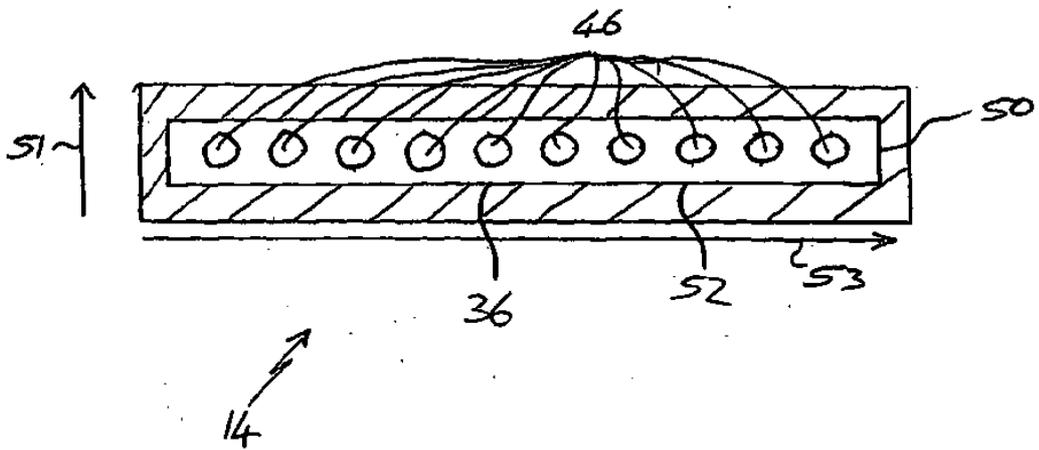


Fig. 3

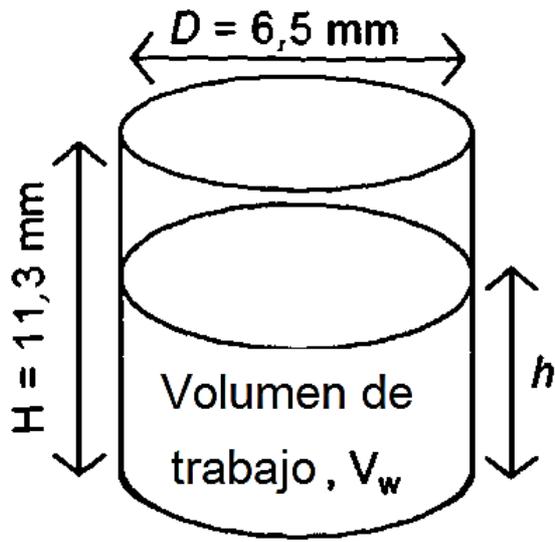


Fig. 4

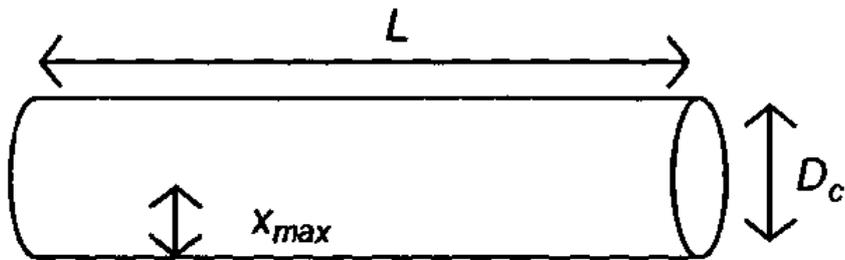


Fig. 5

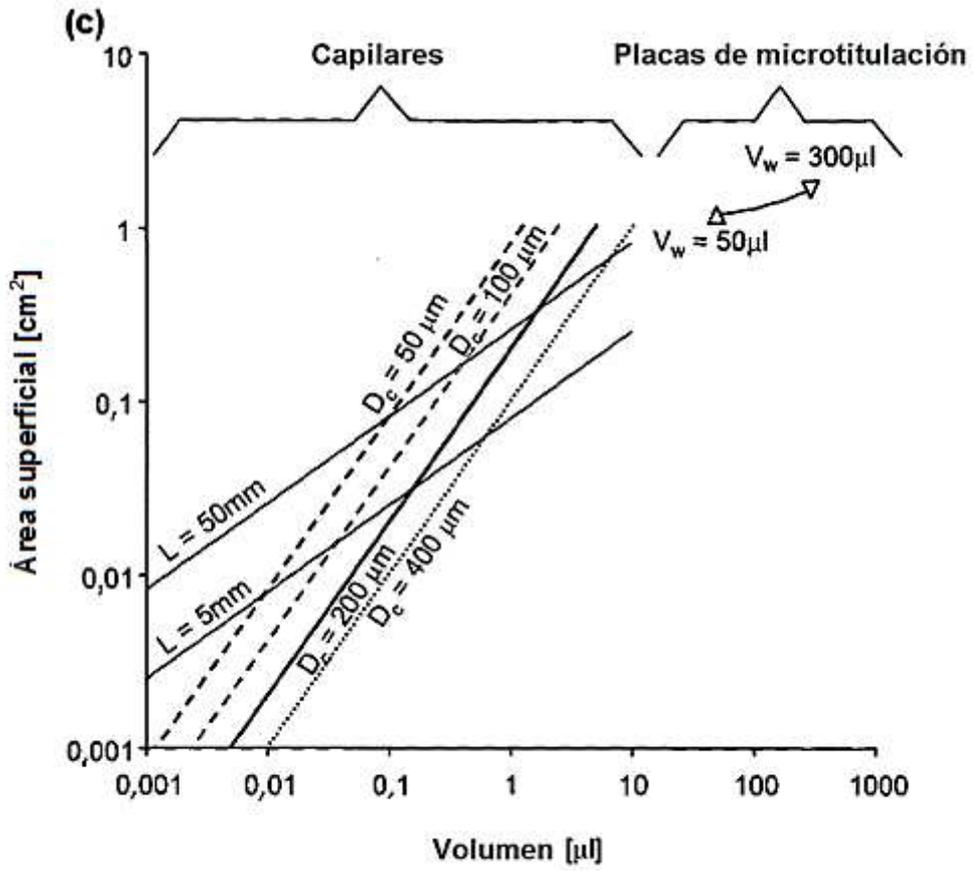


Fig. 6

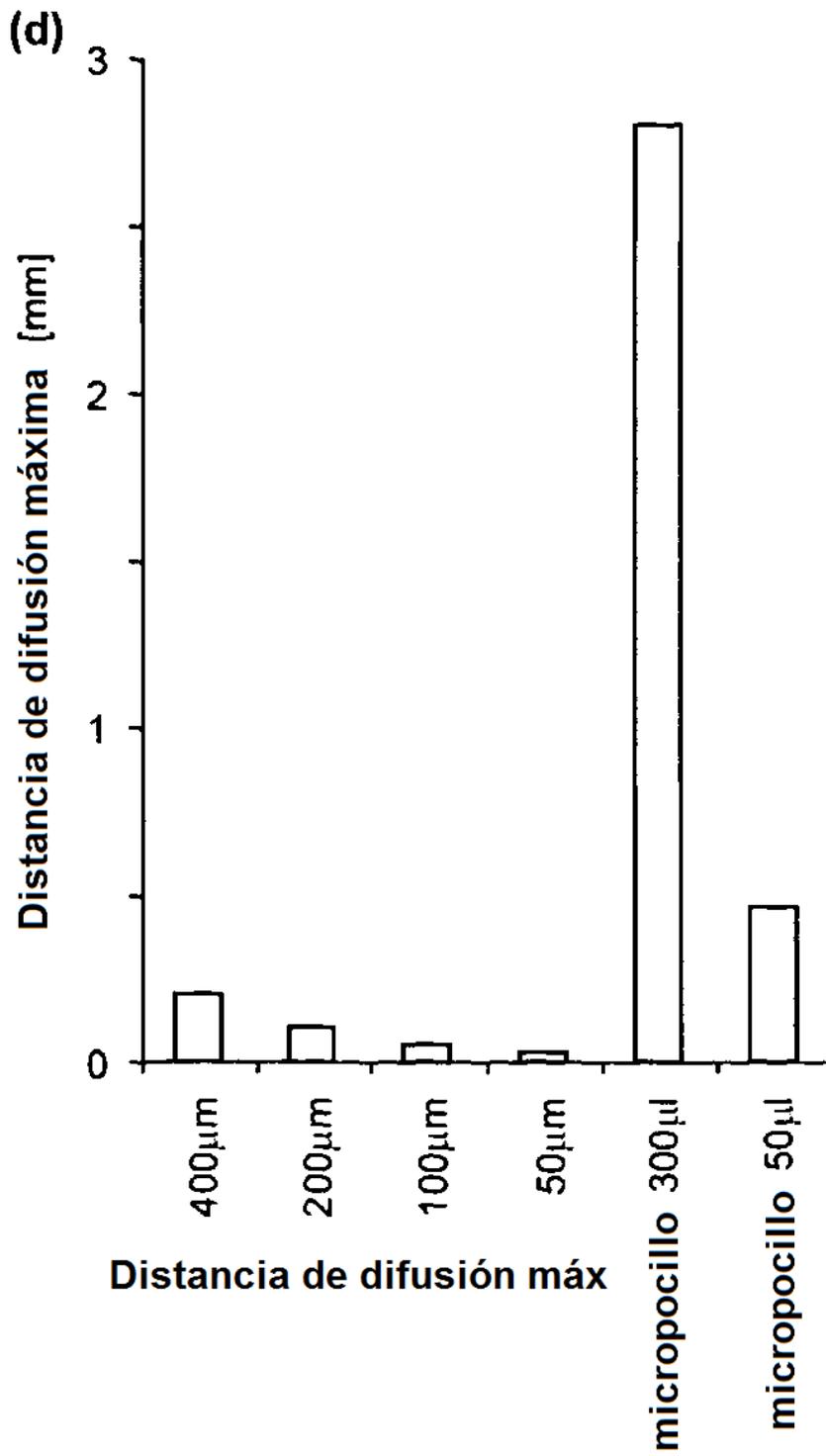


Fig. 7

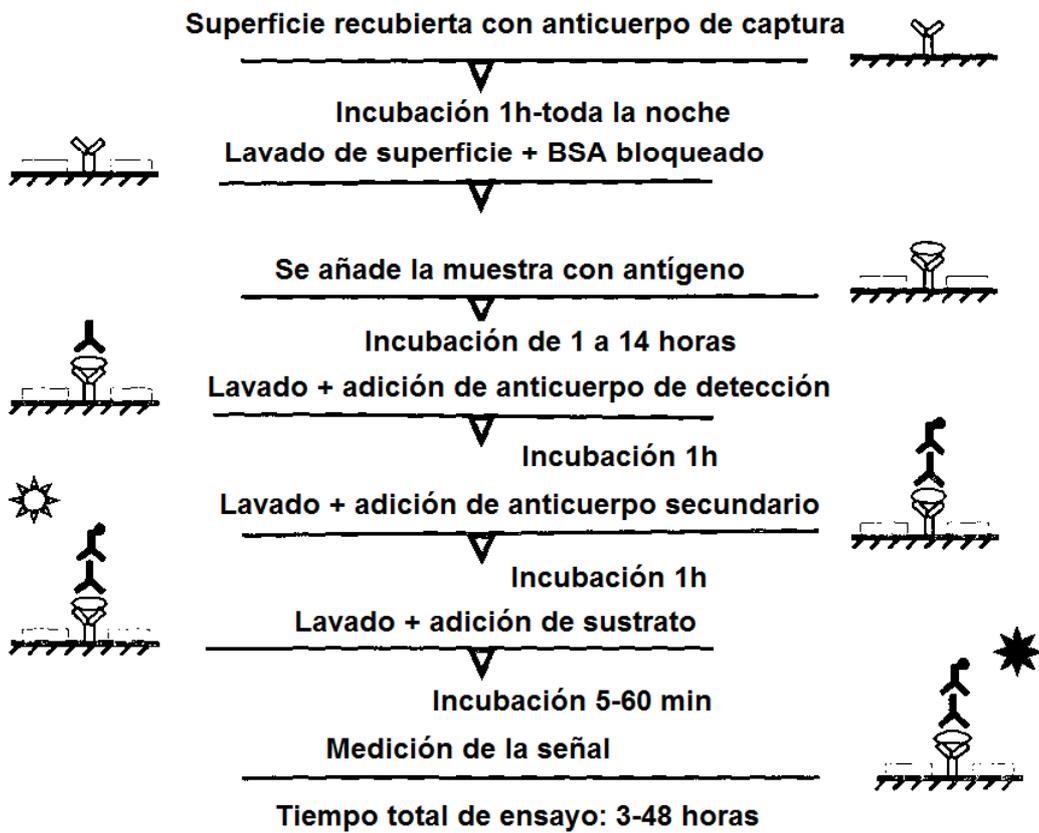
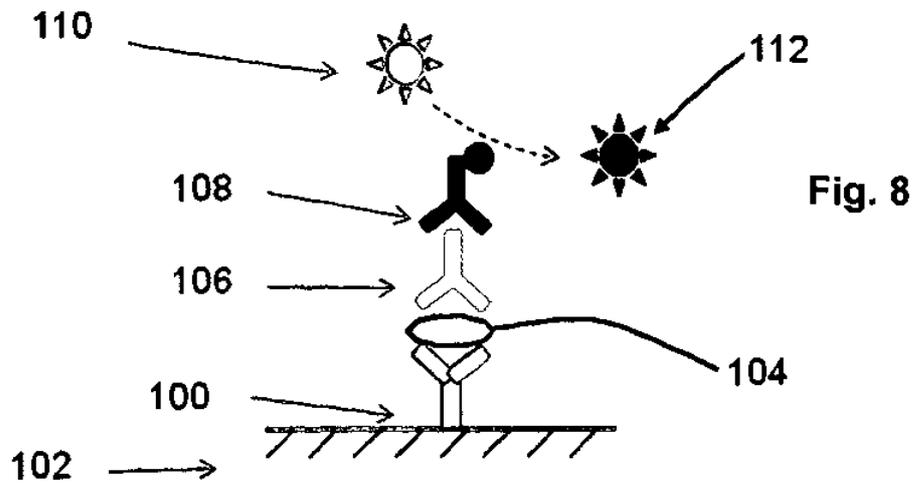


Fig. 9

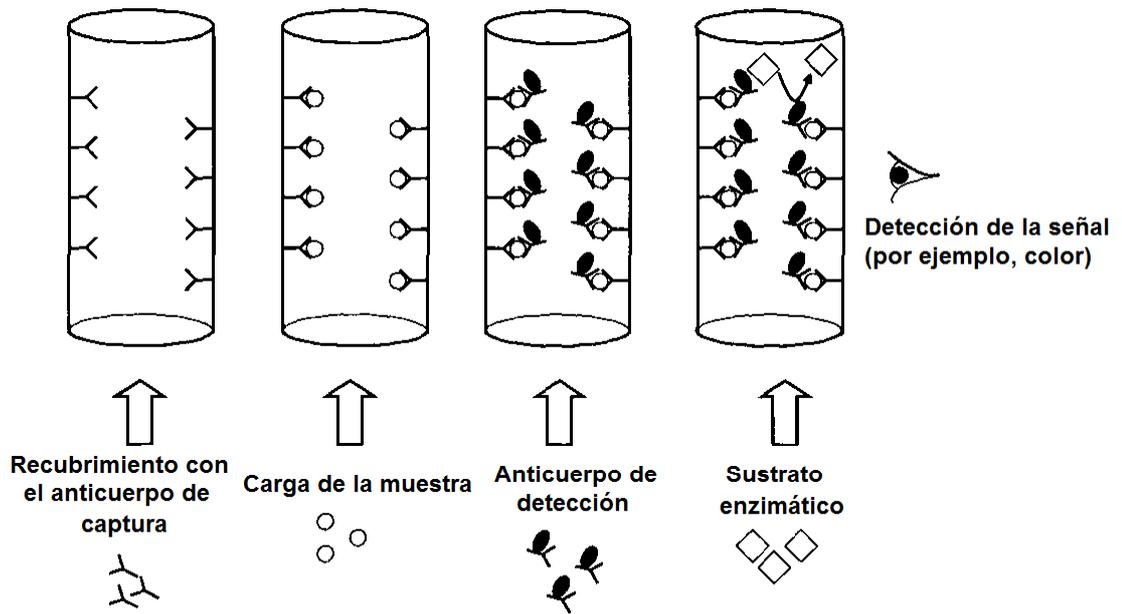
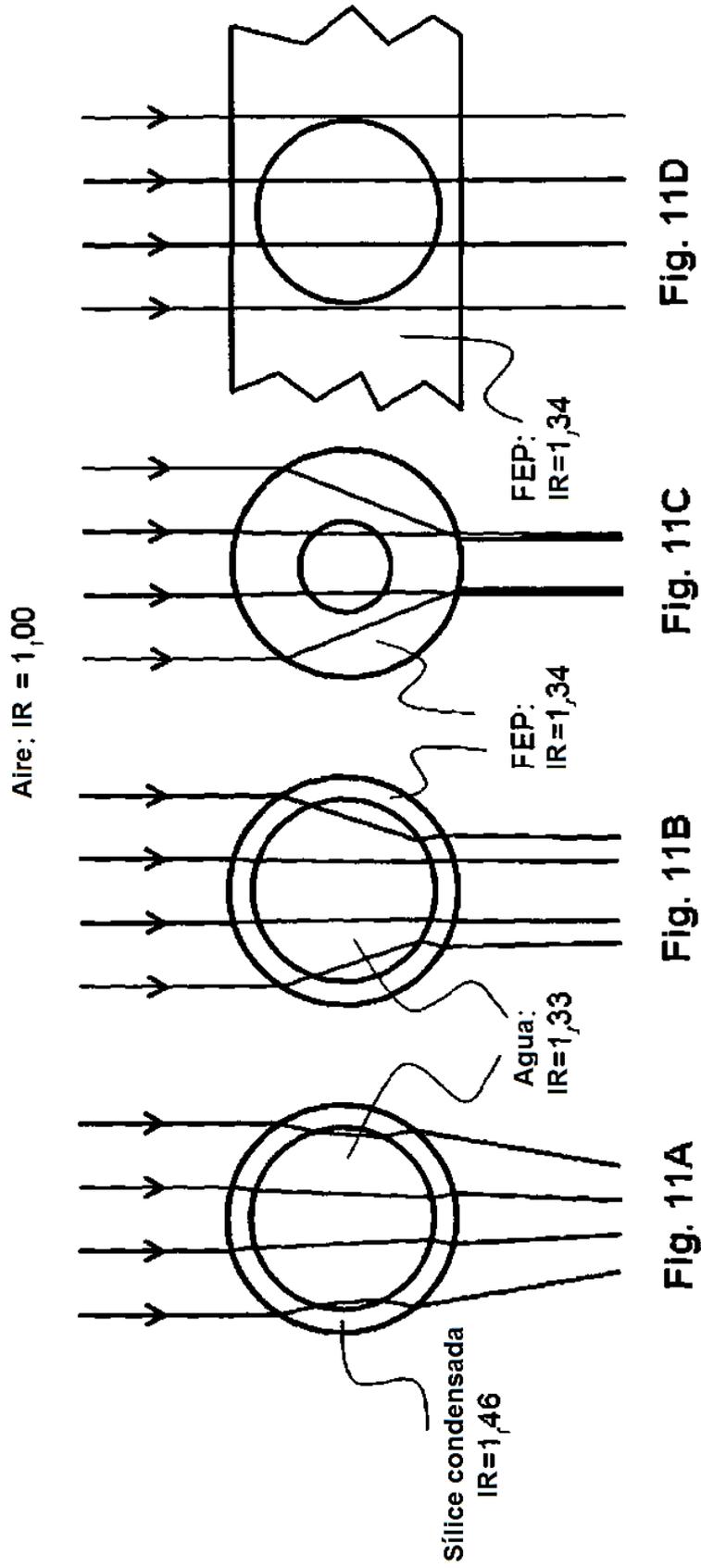
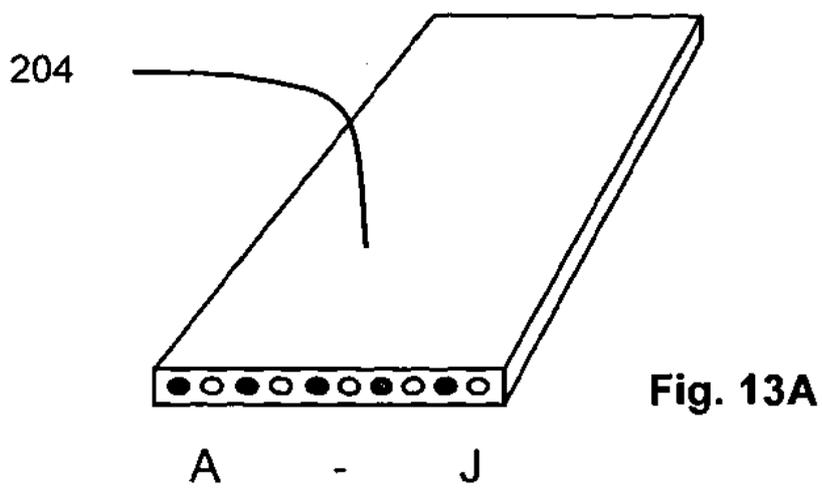
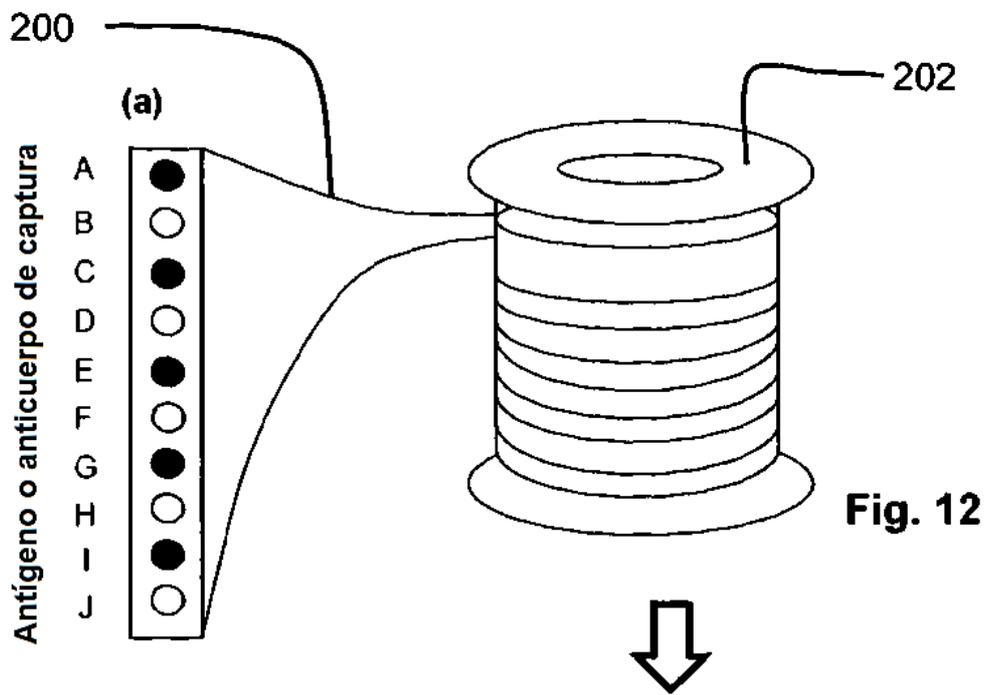


Fig. 10





(b)

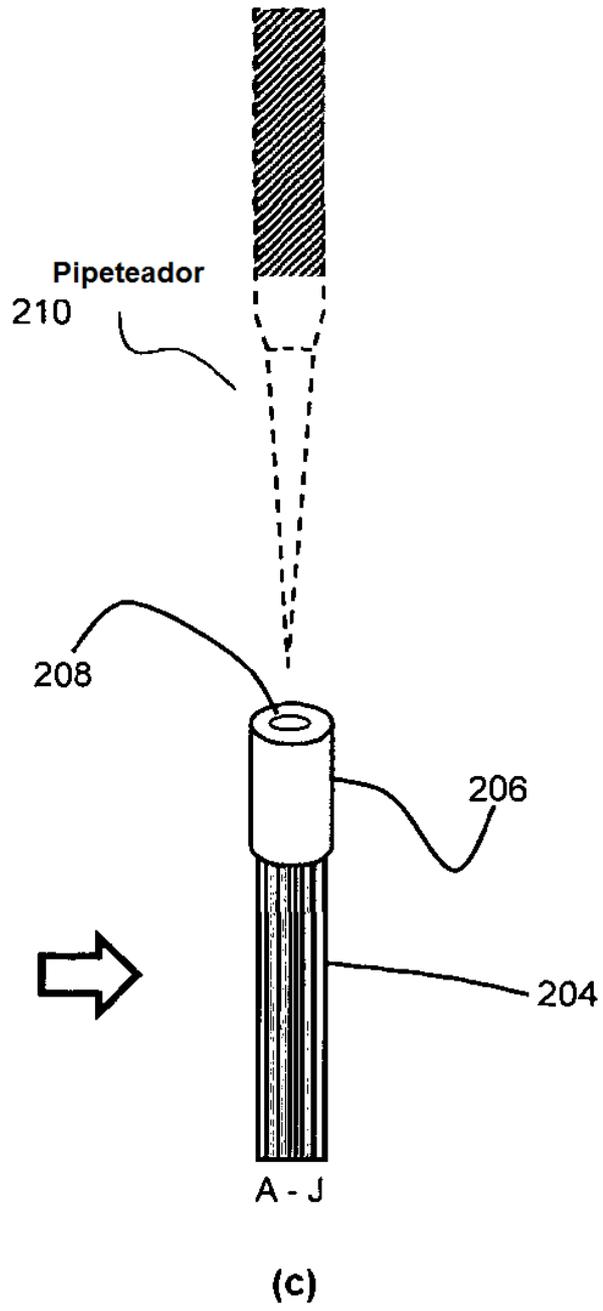
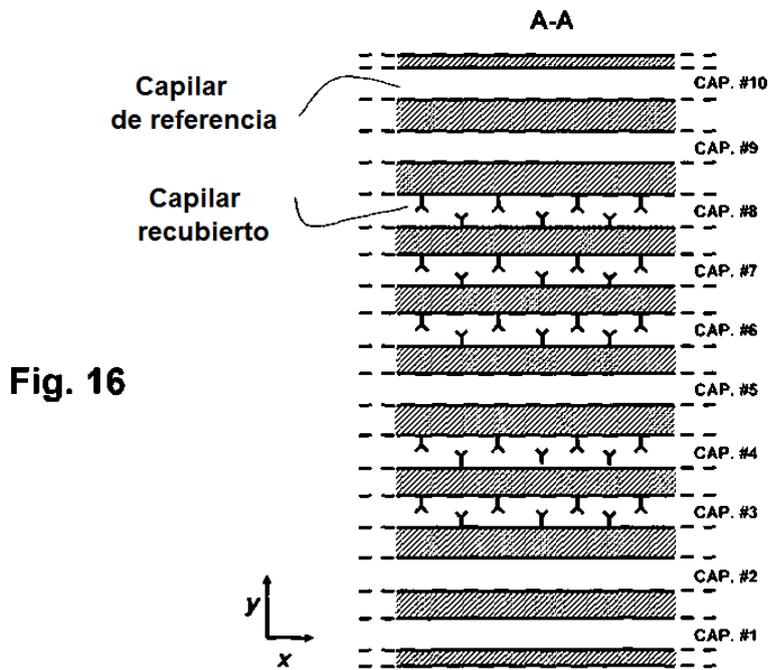
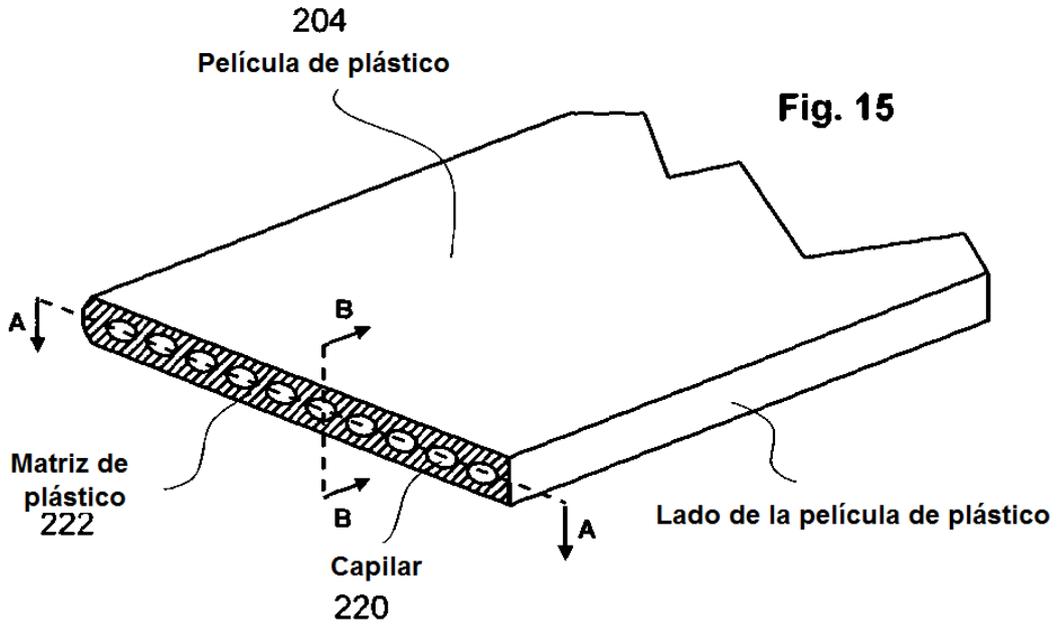


Fig. 14



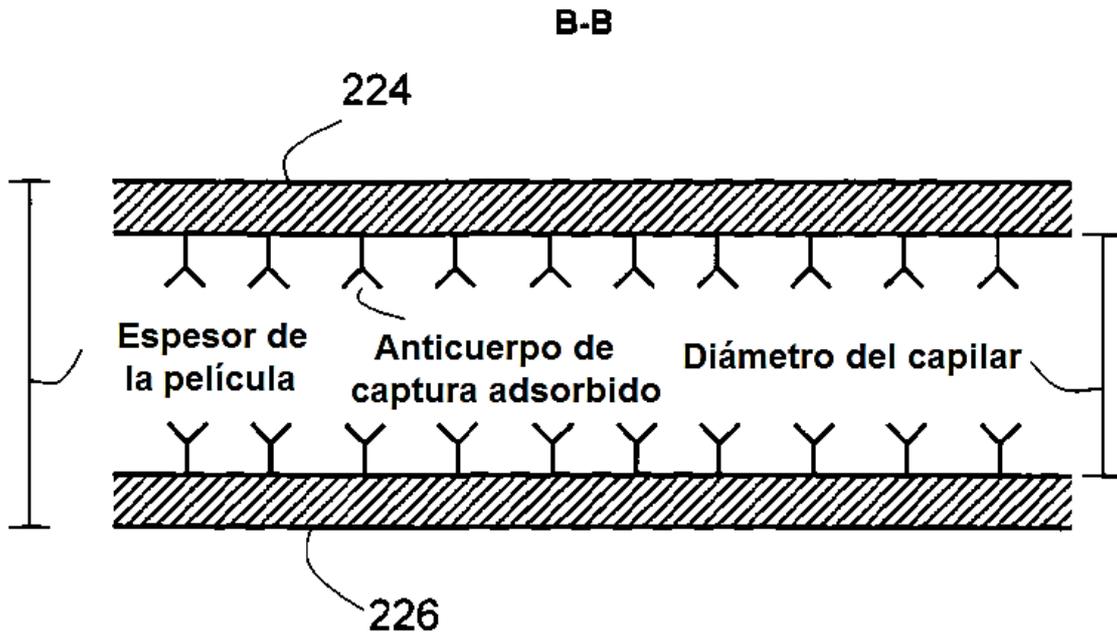


Fig. 17

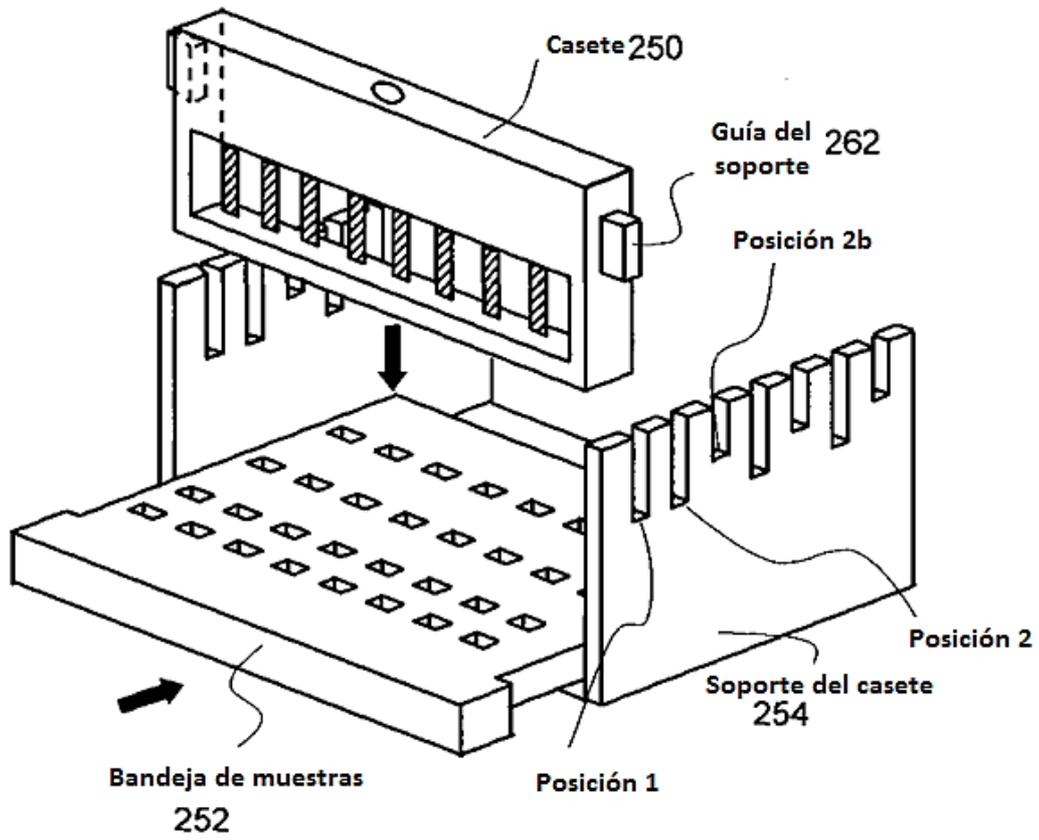


Fig. 18

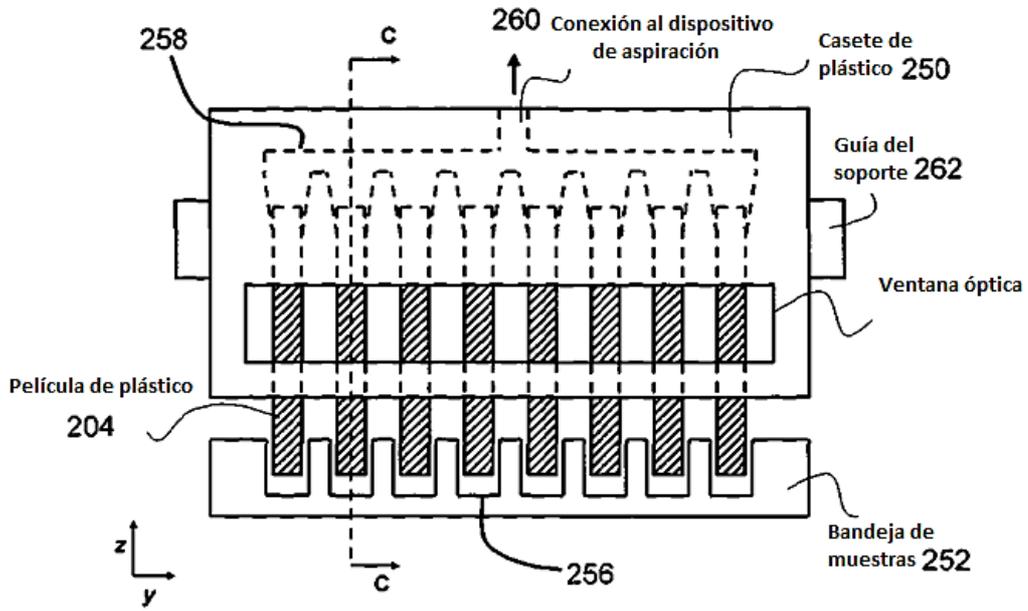


Fig. 19

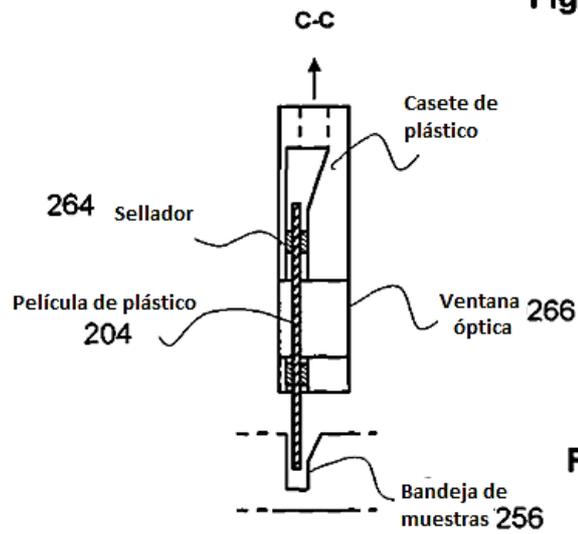


Fig. 20

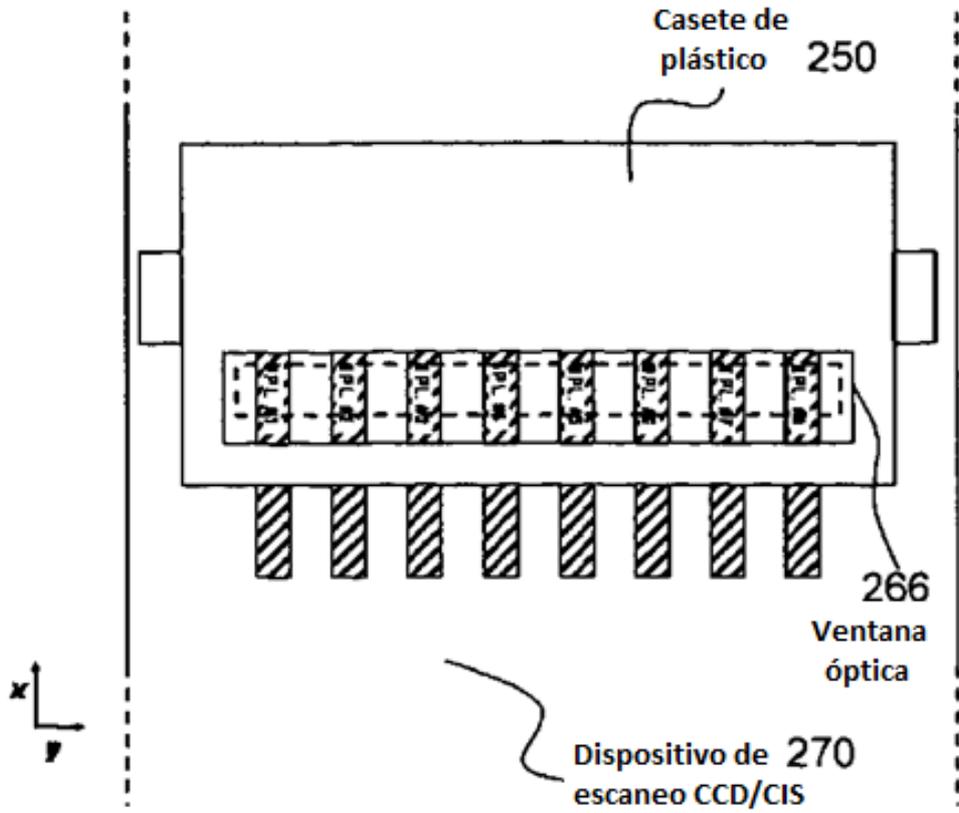


Fig. 21

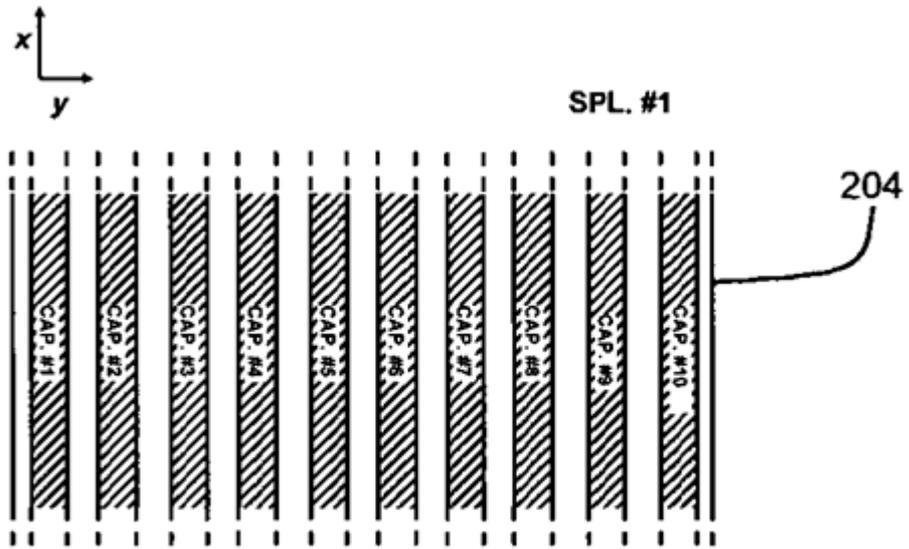


Fig. 22



Fig. 23A

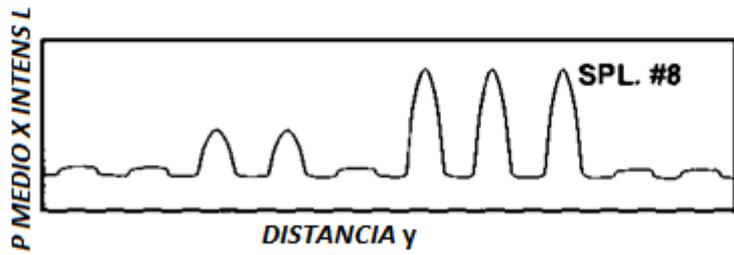


Fig. 23B



Fig. 24A

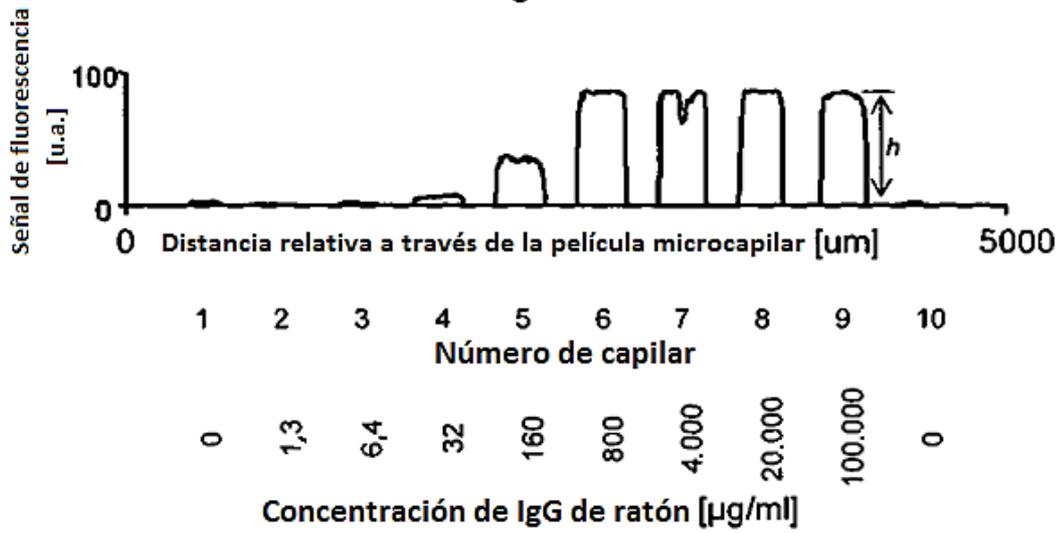


Fig. 24B

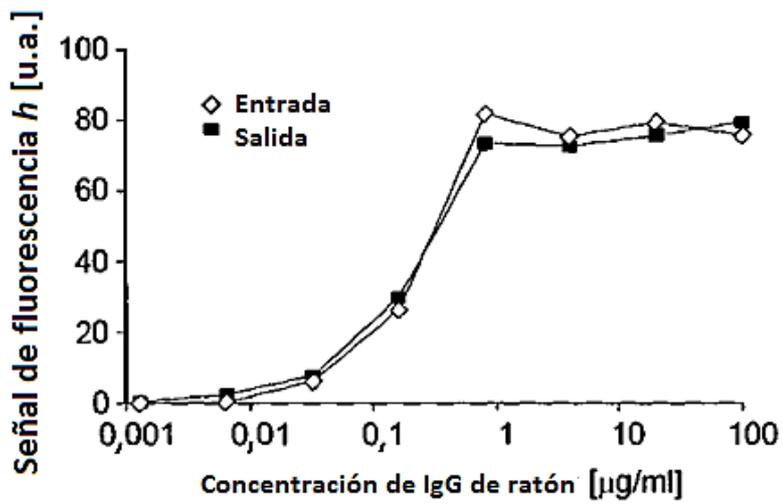
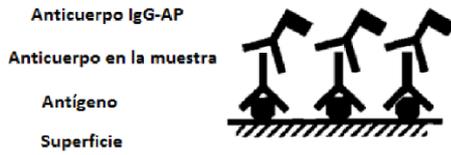


Fig. 24C

Fig. 25A



Antígenos

- A - Tampón PBS
- B - IgG de ratón
- C - Péptido FLAG
- D - Ag del núcleo de la hepatitis B

Muestras

- 1 - Tampón
- 2 - Anti-HB CAg (
- 3 - Anti-FLAG

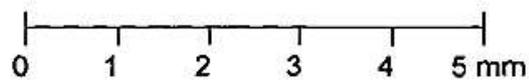
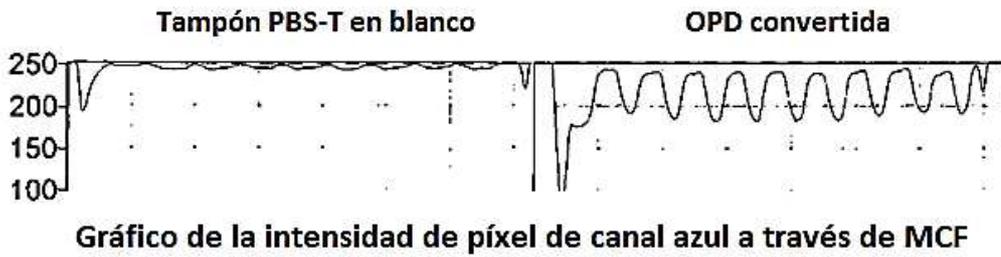
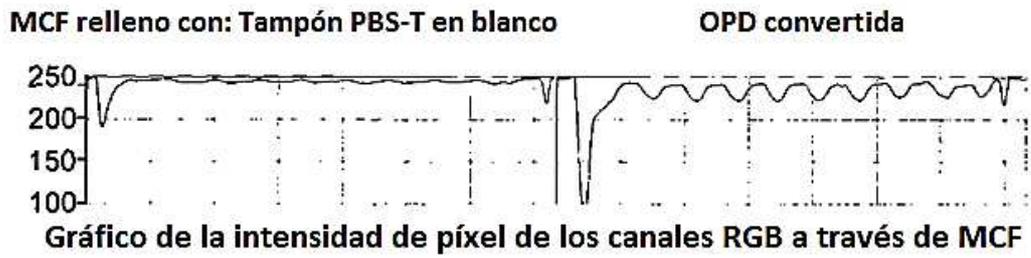
Fig. 25B

- A - Tampón PBS
- B - IgG de ratón
- C - Péptido FLAG
- D - Ag del núcleo de la hepatitis B

	Tampón	Anti-Hb CAg	Anti-FLAG
A	-	-	-
B	+	+	+
A	-	-	-
B	+	+	+
C	-	+	-
D	-	-	+
C	-	+	-
D	-	-	+
C	-	+	+/-
D	-	-	+



Fig. 26



Escala de la distancia

Fig. 27

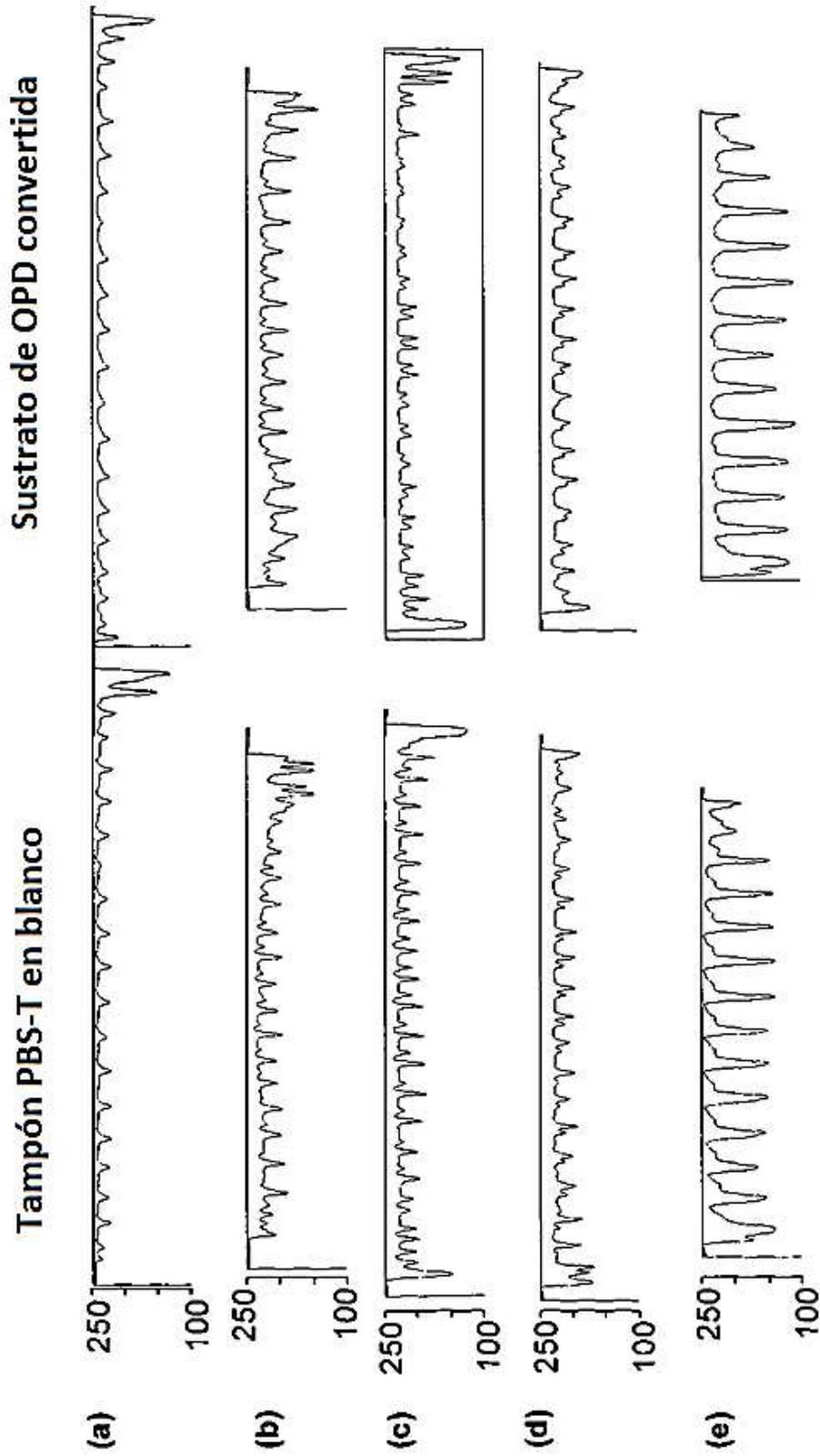


Fig. 28

Capilares rellenos con:

- (1) Tampón en blanco, PBS-T
- (2) Sustrato de OPD convertida

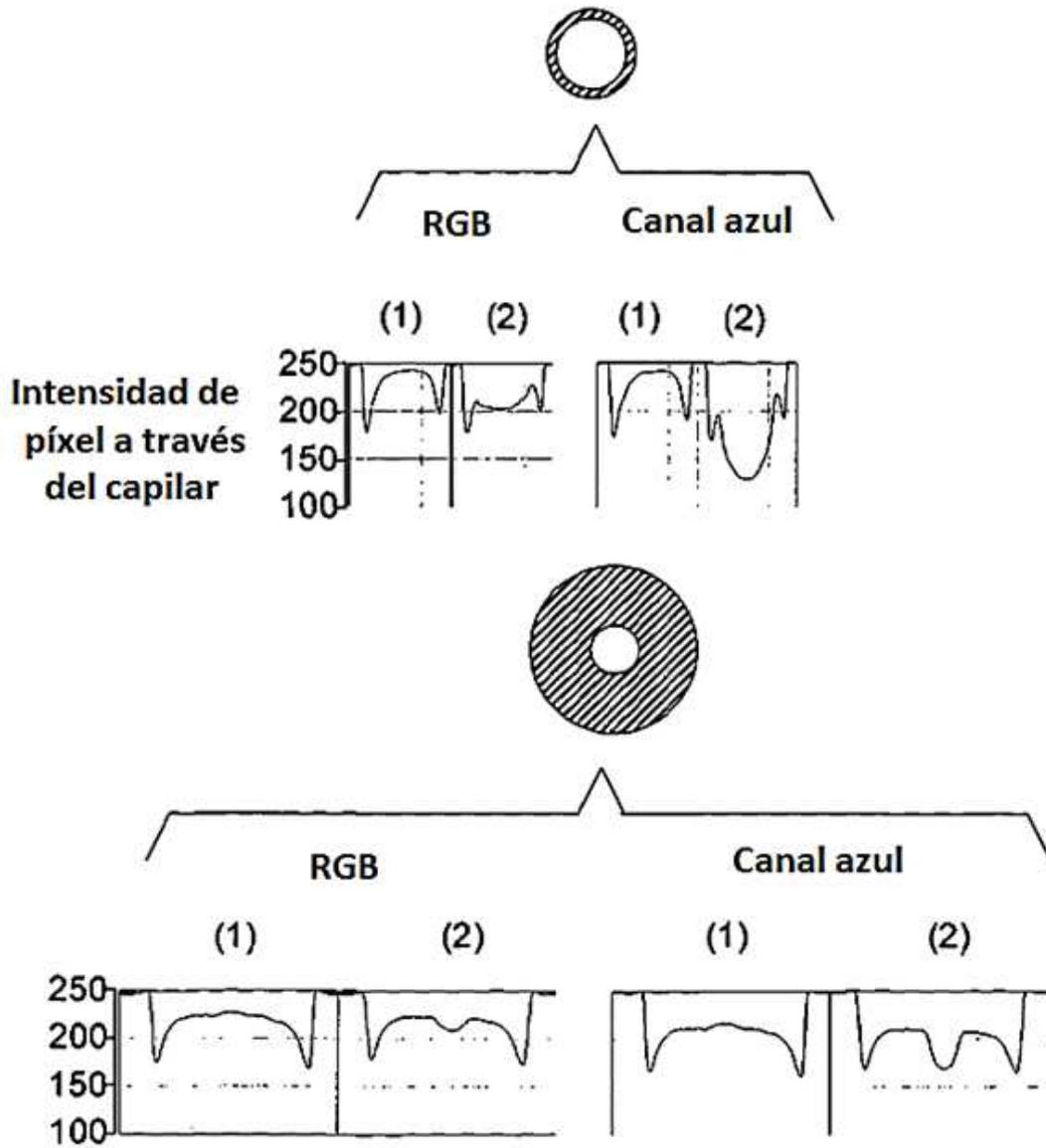


Fig. 29

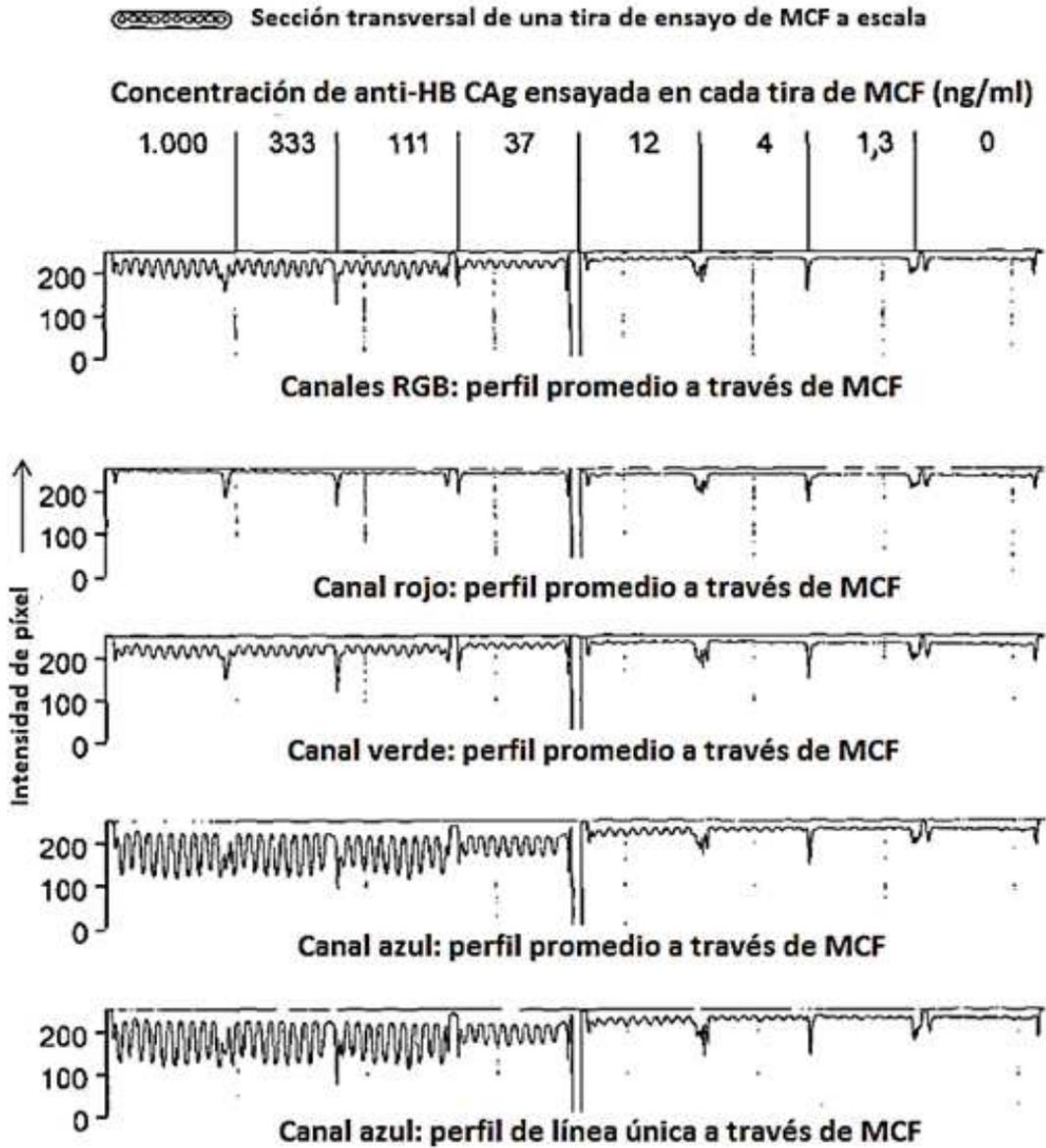
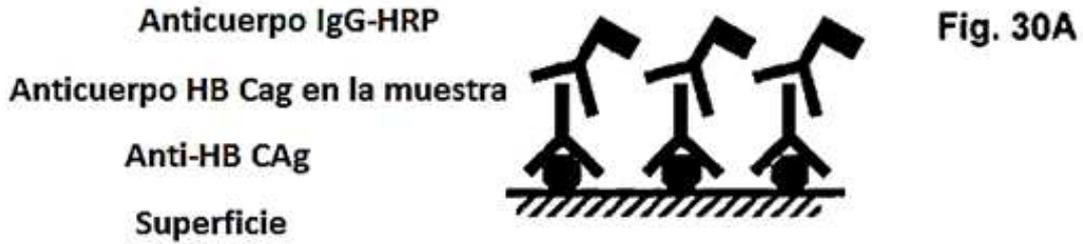


Fig. 30B

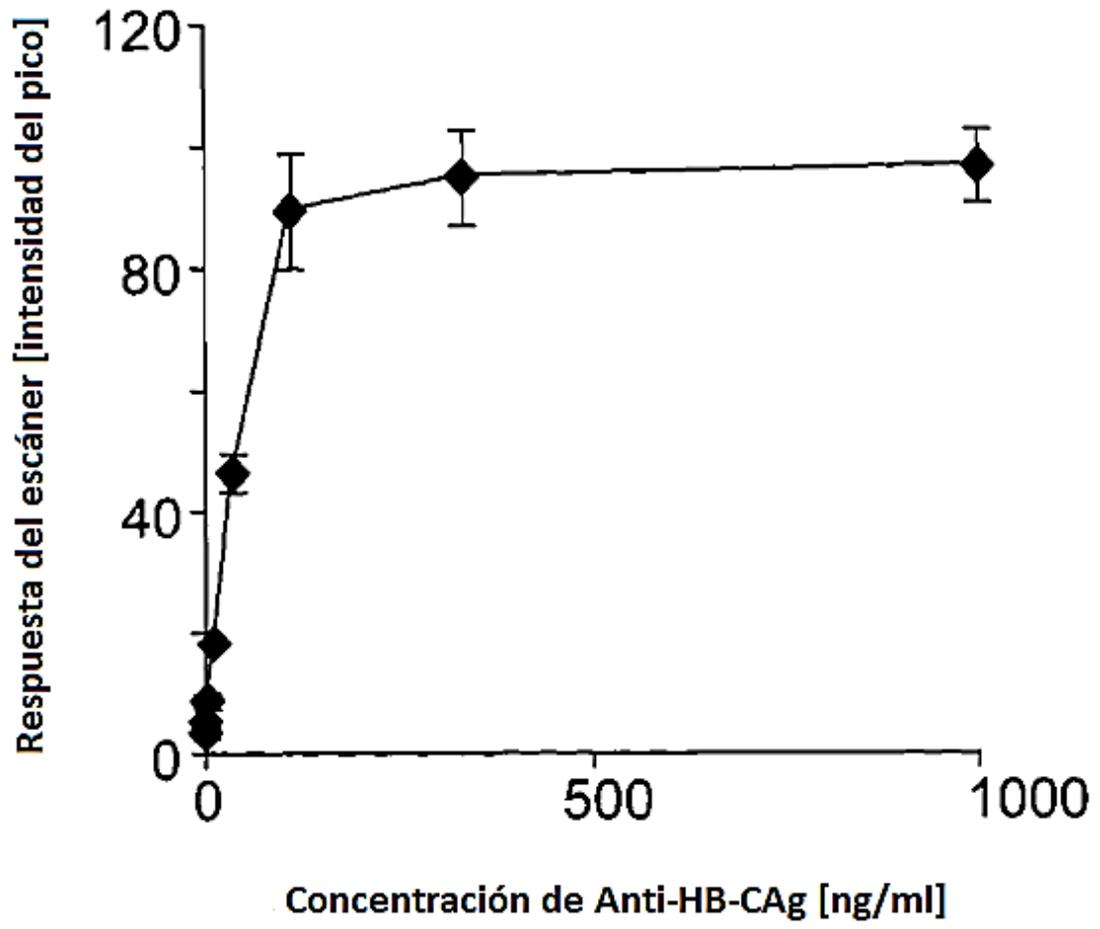


Fig. 31

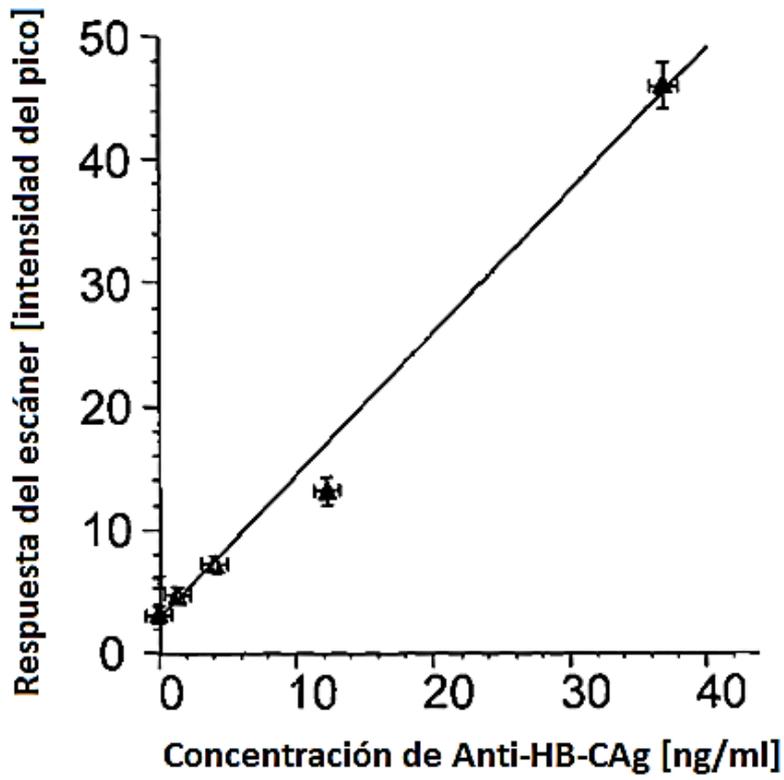


Fig. 32A

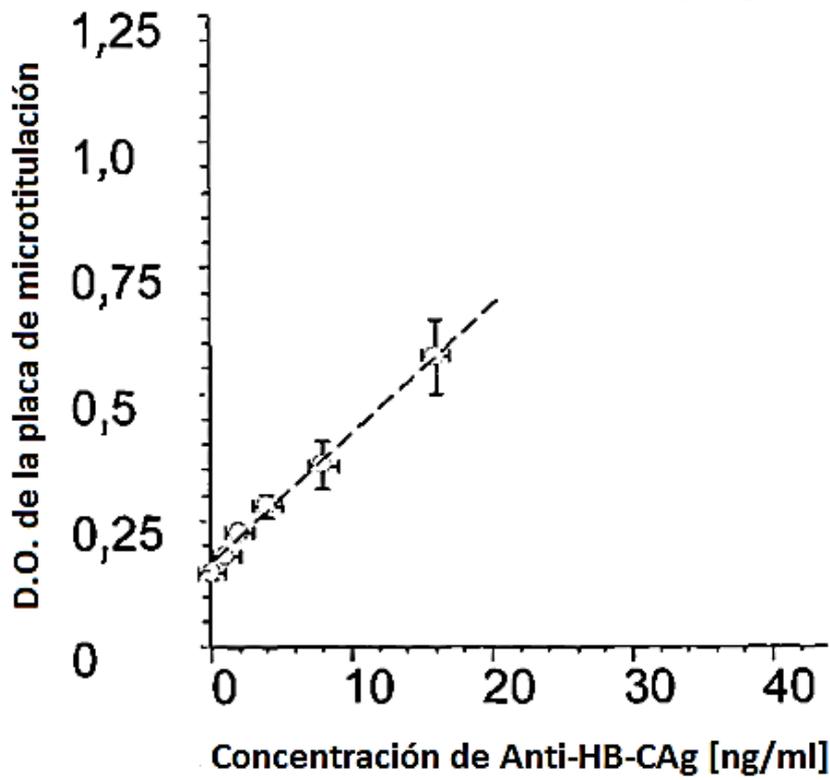


Fig. 32B

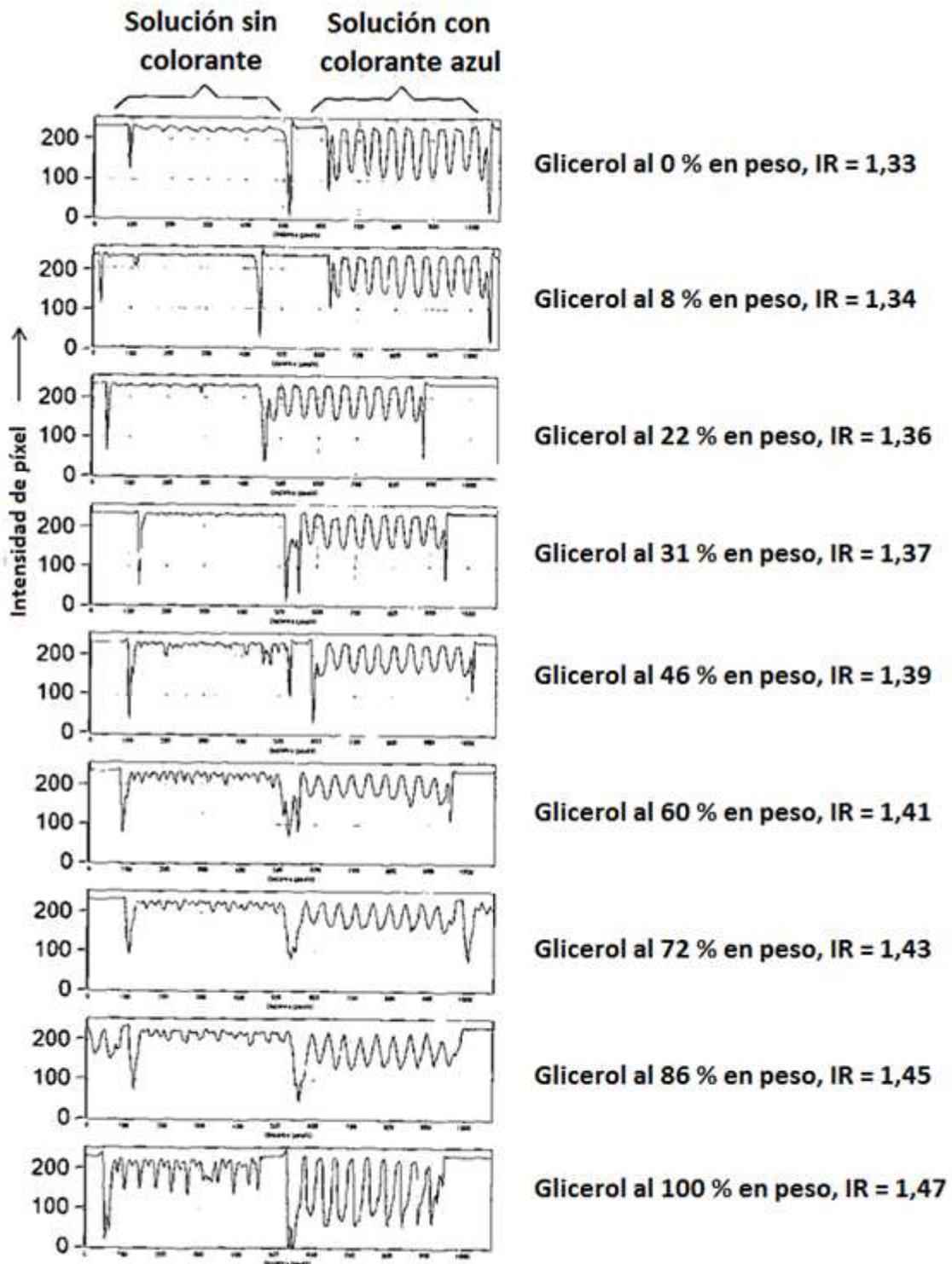


Fig. 33

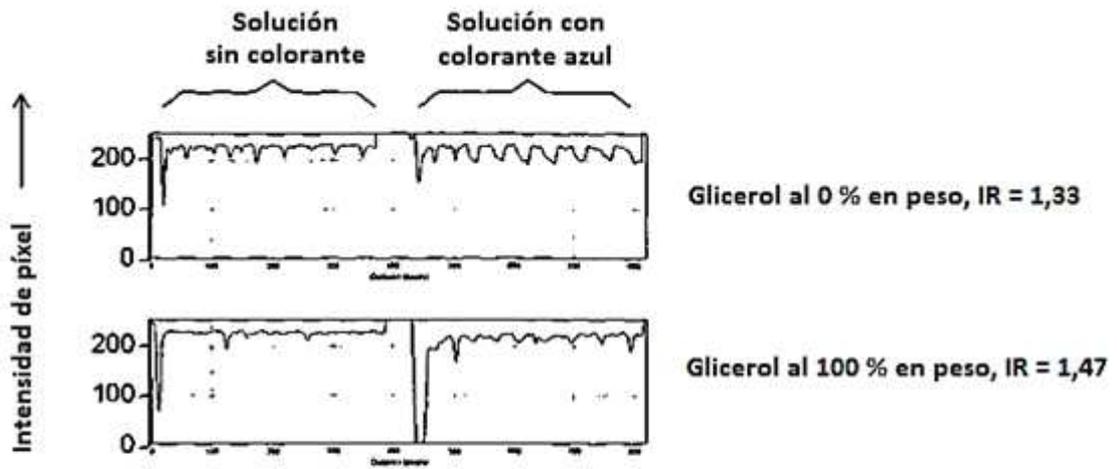


Fig. 34

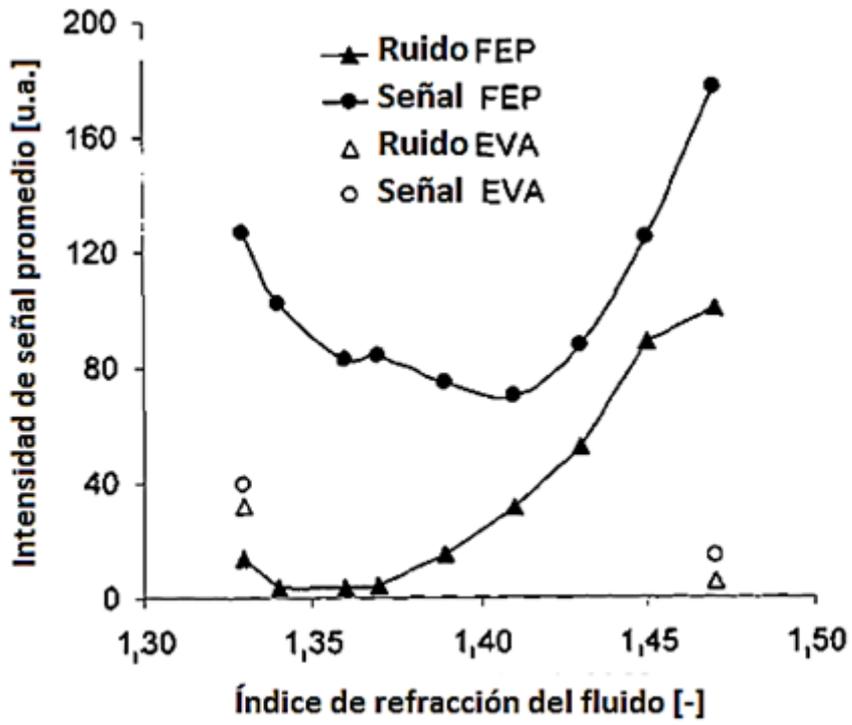


Fig. 35A

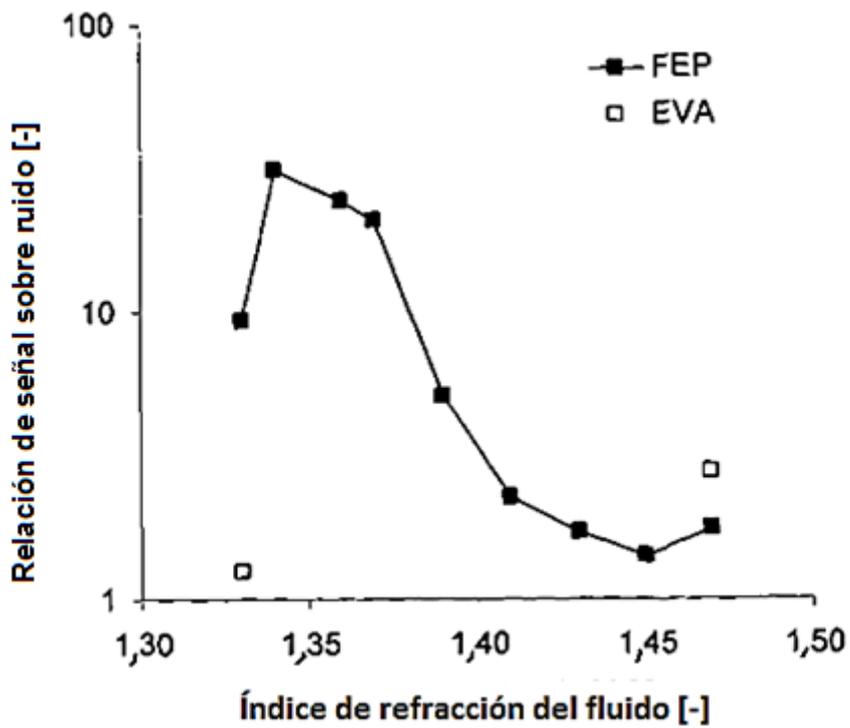


Fig. 35B

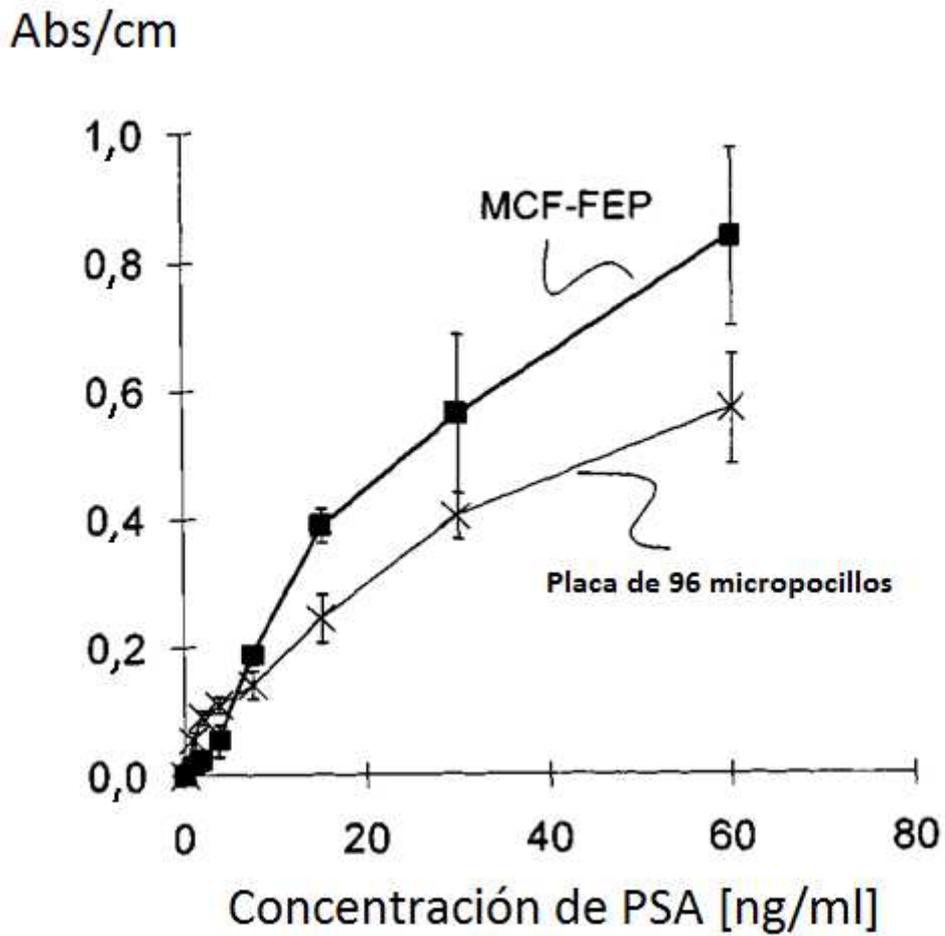
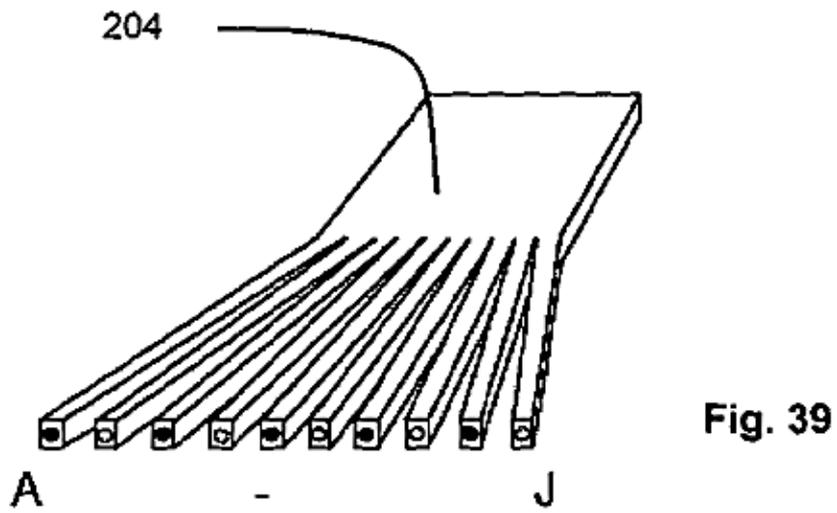
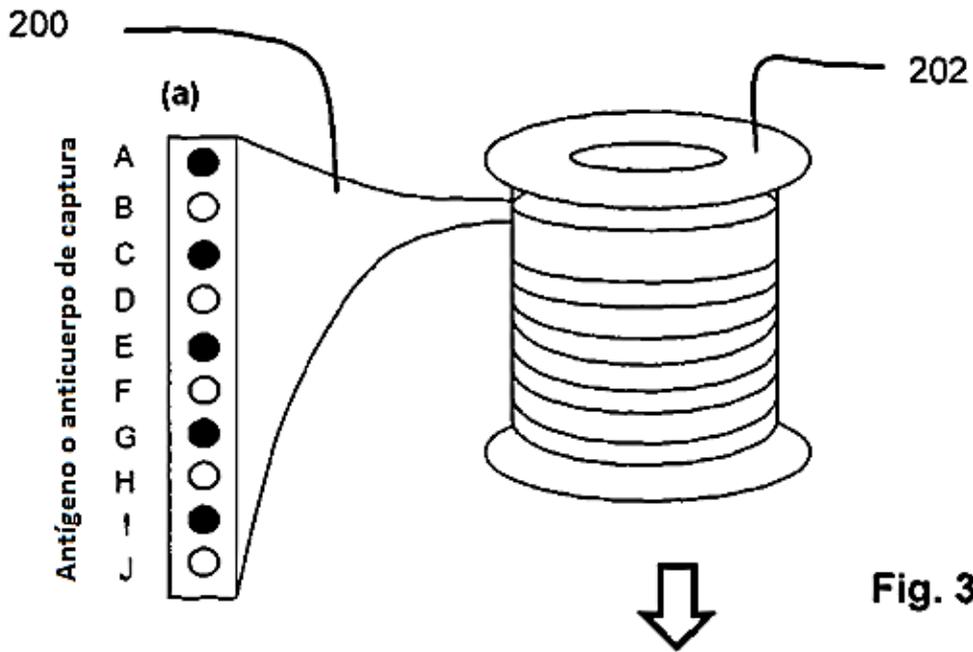


Fig. 36

Etapa	Tiempo [min]	
	96 micropocillos	MCF-FEP
1. Muestra o estándar	120	10
2. Anticuerpo de detección	120	10
3. Complejo enzimático	20	10
4. Sustrato colorimétrico	25	20
Tiempo total de ensayo	285	50

Fig. 37



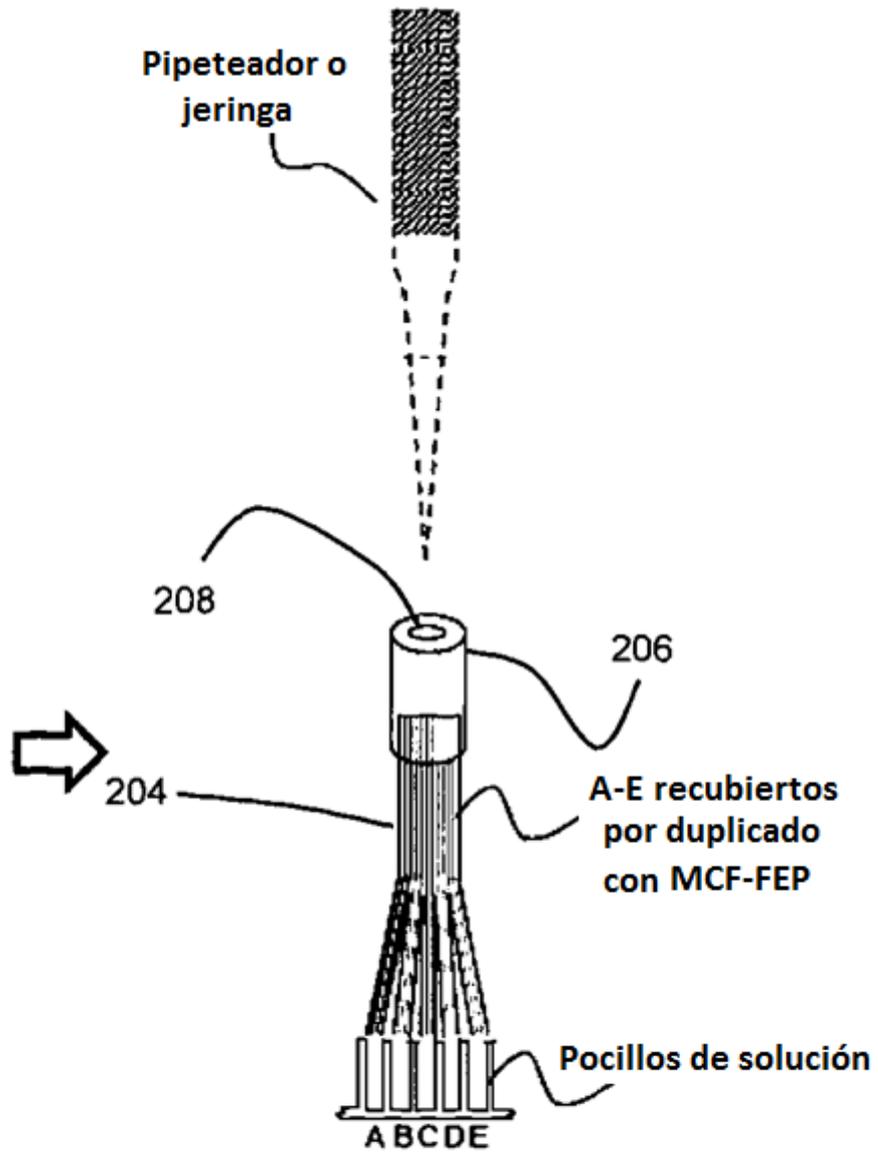


Fig. 40